

Ecole Doctorale
"Science des procédés-science des aliments"

Université Montpellier II

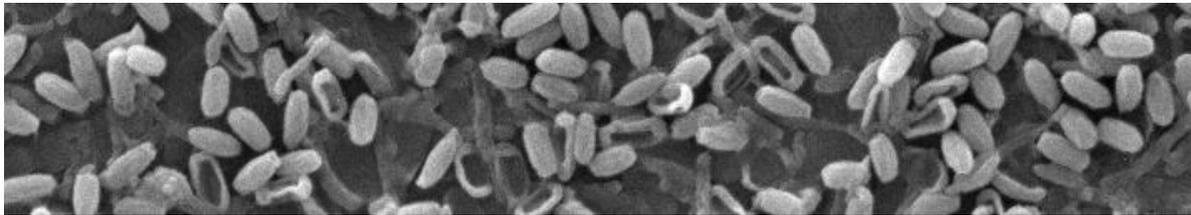
Thèse

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Discipline: Biotechnologie, Microbiologie

Caroline LEVY



Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires

Soutenue le 17 décembre 2010 devant le jury composé de:

Rapporteurs	Mme Brigitte CARPENTIER - Directeur de recherche - ANSES M. Frank DEVLIEGHÈRE - Professeur - Université de Gand
Examineurs	Mme Catherine DUPORT - Professeur - Université d'Avignon M. Christophe RIEDEL - Directeur de société - CLARANOR M. Eric METTLER - Ingénieur de Recherche - SOREDAB
Directeur de Thèse	M. Frédéric Carlin - Directeur de Recherches – INRA

Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR A408, Sécurité et qualité des produits d'origine végétale, INRA, Avignon

**" L'homme et sa sécurité doivent constituer la première
préoccupation de toute aventure technologique."**

A. Einstein

Remerciements

Je remercie Christophe N'Guyen The pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci à Frédéric Carlin, mon maître de thèse, de m'avoir encadrée et supportée durant ces trois années, de m'avoir appris tant de choses et de m'avoir permis d'arriver à ce niveau.

Un Merci tout particulier à Christophe Riedel, mon responsable à Claranor, pour m'avoir engagée, soutenue et aidée à chaque moment, pour avoir cru en moi et guidée jusqu'à la fin et même au delà.

Je remercie sincèrement les membres du jury, qui ont accepté de juger mon travail de thèse.

Un merci particulier à tous les membres de la société Claranor, pour leur travail remarquable, leur aide et leur bonne humeur

Un grand merci à tous mes collègues du laboratoire INRA, pour leur bonne humeur, leur aide précieuse, leur dévouement, et leurs super gâteaux, sans oublier Aline et Claire, qui ont grandement contribué à la réalisation de ce travail!

Je voudrais à présent remercier mes parents, sans qui je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui, pour leur amour et leur dévouement à chaque instant. Merci de croire en moi aussi fort, d'effacer mes doutes et mes angoisses, et surtout de m'avoir donné une vie aussi merveilleuse et pleine de bonheur.

Merci également à mon frère, Johann, d'avoir été un grand frère trop cool, qui m'a fait aimer et connaître tous les jeux auxquels on joue tout le temps, et qui m'a supportée (plus ou moins facilement) depuis 28 ans!

François, merci pour ton soutien et pour ta façon parfois très spéciale de m'aimer et de me comprendre. Merci pour ton attention et ton écoute, je sais que parfois il faut travailler dur!!!

Et puis merci à toute ma famille, pour être toujours présents pour moi, et puis ma belle famille, pleine d'attention et de gentillesse...

Un grand merci à mes amis, Karine, David, Guigui, ma Juju, Doudou, Franck, Charlotte, Minus...et j'en oublie... pour tout ce qu'ils m'apportent au quotidien, pour les soirées, cinés, week-ends en vadrouille...

Je voudrais enfin remercier ma perle noire, Gaïa... une petite merveille qui fait les meilleurs câlins du monde!

Table des matières

Avant propos	1
Etude bibliographique	2
1. Introduction	2
2. Le traitement thermique	3
1) Principe.....	3
2) Mécanismes d'inactivation des microorganismes	6
3) Efficacité microbiologique du traitement thermique	7
4) Equipements industriels	11
5) Avantages du traitement thermique, limites, produits cibles	13
3. Techniques non thermiques alternatives	14
1) Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH) et Hautes Pressions à Dioxyde de Carbone (HPDC).....	14
a. Principe.....	14
b. Mécanismes d'inactivation des microorganismes	15
c. Efficacité microbiologique	16
d. Equipements industriels	18
e. Législation	19
f. Avantages de la technologie, limites, produits cibles	20
2) Champs électriques pulsés (CEP)	21
a. Principe.....	21
b. Mécanismes d'inactivation	22
c. Efficacité microbiologique	22
d. Equipements industriels	25
e. Législation	25
f. Avantages de la technologie, limites, produits cibles	26
3) Irradiations	26
a. Principe.....	26
b. Mécanismes d'inactivation	27
c. Efficacité microbiologique	28
d. Equipements industriels	29
e. Législation	30
f. Avantages de la technologie, limites, produits cibles	31
4) UV continus.....	34
a. Principe.....	34
b. Mécanismes d'inactivation	35
c. Efficacité microbiologique	36
d. Equipements industriels	39
e. Législation	39
f. Avantages de la technologie, limites, produits cibles	40
4. La lumière pulsée:	41
1) Principe.....	41
2) Mécanismes d'inactivation	42
3) Efficacité microbiologique	44
4) Equipements industriels	49
5) Législation	50
6) Avantages de la technologie, limites, produits cibles	51
7) L'étude approfondie de la lumière pulsée présente-t-elle un réel intérêt par rapport aux autres techniques physiques de décontamination?	52

Présentation du travail de thèse	55
1. Objectifs scientifiques et technologiques	55
2. Démarche expérimentale	56
1) Réalisation d'un pilote afin de déterminer l'efficacité de la lumière au niveau microbiologique	56
2) Influence de la méthode d'inoculation et de la surface	57
3) Principaux facteurs influençant l'efficacité germicide de la lumière pulsée	58
4) Une application industrielle.....	59
Résultats	60
1. Un équipement de lumière pulsée délivrant une fluence homogène pour la décontamination de larges surfaces expérimentales.....	60
Article 1.....	62
Perspectives issues du travail présenté dans l'article 1	81
2. Une méthode d'inoculation par spray pour étudier la décontamination de surfaces par la lumière pulsée.....	85
Article 2.....	87
Données complémentaires.....	101
3. Décontamination des microorganismes par lumière pulsée: importants facteurs influençant l'efficacité germicide.	106
Article 3.....	108
Influence du stade de culture de cellules ou du milieu de sporulation sur la résistance de <i>B. subtilis</i> à la lumière pulsée	129
4. Décontamination de sirop de sucre par lumière pulsée.....	134
Article 4.....	136
Etude d'un équipement pilote industriel de lumière pulsée pour la décontamination de sirop de sucre en dynamique sur ligne.....	148
Discussion générale	150
Références bibliographiques:	156
Valorisation du travail de thèse	173

Avant propos

Le développement de nouveaux procédés technologiques visant à l'amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires et de leur durée de vie présente un réel intérêt pour le secteur agroalimentaire. Dans un contexte actuel qui tend vers une responsabilisation environnementale des industries, la société CLARANOR met au point des solutions de décontamination des surfaces sans produits chimiques et sans consommation d'eau, mettant en œuvre la technologie de la lumière pulsée. Étudiée en laboratoire depuis les années 80, la technologie a manqué jusqu'à récemment de fondements scientifiques solides permettant l'obtention de résultats fiables et satisfaisants pour des applications industrielles. Afin de combler ces lacunes et d'être en mesure de garantir l'efficacité de la technologie aux utilisateurs industriels, CLARANOR a mis en place une stratégie de recherche et développement visant à consolider les connaissances scientifiques concernant la lumière pulsée. La maîtrise de la technologie nécessite en particulier l'étude des phénomènes physiques qui interviennent lors du procédé, et des mécanismes microbiologiques s'y rapportant. Dans l'optique de corréler les paramètres de l'émission lumineuse constituant le traitement et l'efficacité de décontamination microbienne, un projet de recherche a été initié par CLARANOR au sein d'un laboratoire spécialisé en microbiologie, en collaboration étroite avec l'équipe de physiciens de CLARANOR. Cette thèse CIFRE (soutenue par l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) a pour but d'établir les bases scientifiques de l'effet de la lumière pulsée CLARANOR, afin d'évaluer l'efficacité décontaminante de la technologie sur des microorganismes d'intérêt industriel.

Etude bibliographique

1. Introduction

La conservation des aliments est un combat constant contre les microorganismes d'altération ou les pathogènes de l'homme. Depuis longtemps le coût des produits, leur qualité, mais surtout la sécurité sanitaire des aliments ont été les principaux centres d'intérêt des industriels. A l'heure actuelle, la chaîne alimentaire est devenue plus complexe, multipliant les possibilités de contamination et de développement des agents pathogènes (Codex Alimentarius, 2003). Aux Etats-Unis, environ 76 millions de cas de toxi-infections alimentaires (TIA) sont estimés chaque année, menant à 325000 hospitalisations et 5000 décès (Keklik & Demirci, 2009). Selon le rapport de l'INVS (Institut de Veille Sanitaire) (INVS, 2009), 1124 foyers de TIAC (Toxi-infections Alimentaire Collectives) ont été déclarés en France en 2008, avec 12549 personnes contaminées, dont 5 décédées. Les techniques de décontamination sont très étudiées et présentent un intérêt central dans les industries agroalimentaires au niveau mondial. D'un autre côté, il faut faire face à une demande croissante des consommateurs de produits frais, sains et satisfaisants sur le plan organoleptique, avec une durée de conservation de plus en plus longue. Nous sommes tournés vers une alimentation qui allie qualités gustatives et nutritionnelles. C'est pourquoi l'industrie alimentaire est sans cesse à la recherche de nouvelles techniques de conservation, visant à préserver la qualité des aliments, tout en optimisant au maximum la durée de conservation.

De nombreuses techniques sont étudiées, visant dans l'idéal l'obtention d'un produit microbiologiquement maîtrisé, sans altération de saveur, se rapprochant le plus possible du produit original. Il est cependant très difficile de concilier sécurité microbiologique et qualités organoleptiques, du fait de la grande variabilité existante, tant au niveau biologique (aliments crus, microorganismes différents), qu'au niveau pratique (temps de stockage, températures, vie des produits chez le consommateur...). De nombreuses espèces microbiennes peuvent être à l'origine d'altérations des aliments ou encore de toxi-infections alimentaires. Parmi elles, les spores bactériennes sont souvent le problème le plus difficile à résoudre pour la conservation. En effet, les spores sont connues comme une des formes de vie les plus résistantes (Nicholson *et al.*, 2000) et leur inactivation complète est souvent impossible sans altérer la qualité de l'aliment (Smelt *et al.*, 2008). Les traitements thermiques, très utilisés en industrie (Spilimbergo *et al.*, 2002), sont des méthodes physiques sûres, et bénéficient d'une image

nettement plus positive que les traitements faisant intervenir des composés chimiques. Mais ils altèrent parfois fortement les qualités organoleptiques des aliments. Il y a donc un réel besoin de trouver des traitements alternatifs, moins dénaturants, mais permettant la même efficacité de décontamination microbiologique.

Parmi les technologies innovantes, les techniques dites "athermiques" présentent une alternative séduisante. Les techniques physiques, visant à remplacer les additifs chimiques, offrent une meilleure image (préservation du naturel). Ces techniques physiques regroupent, entre autres, les hautes pressions, les champs électriques pulsés, l'irradiation (Rayons X, Rayons γ), les UV continus, la lumière pulsée... Certaines d'entre elles, comme les ultraviolets, sont de bons candidats pour l'utilisation en industrie, en tant que techniques athermiques d'inactivation microbiologique (Koutchma, 2009). Il est important de connaître les principes de ces différentes méthodes, mais également les limites qu'elles peuvent présenter, dans le but de déterminer les applications possibles, et les intérêts industriels de ces nouvelles technologies.

Afin de mieux cibler les besoins et les problèmes rencontrés, il est indispensable d'avoir un certain recul sur les traitements appliqués. Le traitement thermique, encore reconnu comme référence dans ce domaine, sera étudié dans une première partie. Quelques unes des nouvelles technologies athermiques les plus utilisées seront détaillées et comparées dans une seconde partie. Enfin, le nouveau procédé de décontamination par lumière pulsée, sujet principal de cette étude, fera l'objet d'une troisième partie. Nous expliquerons pourquoi cette technologie se distingue des autres, et quelle pourrait être sa place dans le secteur industriel actuel.

2. Le traitement thermique

1) Principe

Le traitement thermique est aujourd'hui la technique de décontamination la plus communément utilisée en industrie agroalimentaire (Farkas, 2007). En termes de sécurité alimentaire, il a pour objectif de détruire ou d'inhiber totalement, d'une part les enzymes, et d'autre part les microorganismes et leurs toxines, dont la présence ou la prolifération pourrait altérer la denrée considérée ou la rendre impropre à l'alimentation humaine (Décret n°55-241, 1955). Les premiers procédés industriels de traitement thermique datent de 1809, avec

Nicolas Appert (1749-1841). Ce dernier a mis au point une méthode de conservation des aliments en les traitant par la chaleur dans des bouteilles en verre hermétiquement scellées (Appert, 1810; Gaillard, 2003). Mais ses travaux ne se limitent pas à la conservation; il découvre le procédé de chauffage du lait à une température proche de 70°C permettant une conservation limitée dans le temps, qu'il applique également au vin et à la bière, procédé dit maintenant « pasteurisation ». Soixante ans plus tard, Pasteur (1822-1895) expliquera scientifiquement le processus et reconnaîtra en Appert un précurseur. Par la suite, il mettra au point la méthode permettant de réduire le niveau de contamination d'un milieu grâce à un chauffage de quelques minutes entre 55°C et 60°C en l'absence d'air.

Depuis cette époque de nombreuses études ont été menées sur le traitement thermique, dans le but d'optimiser les procédés pour allier le mieux possible sécurité et conservation des aliments. De nos jours, on utilise plusieurs procédés, selon le couple temps/température appliqué. La pasteurisation nécessite un chauffage généralement inférieur à 100°C et la stérilisation, un couplage temps/température plus élevé.

La **pasteurisation** est un traitement thermique modéré permettant la destruction des microorganismes pathogènes et d'un grand nombre de microorganismes d'altération. La température du traitement est généralement inférieure à 100°C et la durée, de quelques secondes à quelques minutes. Ce traitement thermique doit être suivi d'un brusque refroidissement afin de ralentir le développement des germes encore présents. Les aliments pasteurisés sont ainsi habituellement conservés au froid. En dehors de la réfrigération, d'autres moyens de conservation peuvent être utilisés parallèlement pour contrer le développement des microorganismes survivants: ajout d'agents chimiques de conservation, emballage sous vide, réduction de l'activité de l'eau (a_w),... La pasteurisation reste néanmoins inefficace pour détruire les spores bactériennes, beaucoup plus résistantes à la chaleur que les cellules végétatives. La technique est spécifique au produit traité, chacun d'eux possédant un barème de pasteurisation (table 1). La durée de conservation des aliments pasteurisés est tout de même limitée.

Table 1: Exemple de barèmes de pasteurisation, établis pour différents produits alimentaires (Leyral & Vierling, 2007)

Exemple de barème de pasteurisation		
Produits	Température pasteurisation	Durée traitement
Lait	62°C	30 minutes
	72°C	15 secondes
Crème/crème dessert	71°C	30 minutes
	82°C	16 secondes
Jus de pomme en bouteille	77°C	30 minutes
Boissons gazeuses à base de jus de fruit	66°C	30 minutes
Bière	82-88°C	1 à 2 minutes

La **stérilisation** est un traitement thermique qui a pour finalité de détruire toute forme microbienne vivante. Le traitement à ultra haute température (UHT) consiste à chauffer le produit à une température assez élevée, entre 135°C et 150°C, pendant un temps très court, de 1 à 5 secondes. Le produit stérilisé est ensuite refroidi puis conditionné aseptiquement. Ce procédé est utilisé par exemple pour la stérilisation des produits liquides (lait, jus de fruits...) ou de consistance plus épaisse (desserts lactés, crèmes, jus de tomate, soupes...). L'appertisation (Appert, 1810) consiste à stériliser par la chaleur des denrées périssables dans des contenants hermétiques (boîtes métalliques, bocaux). Sont considérées comme conserves les denrées alimentaires, d'origine animale ou végétale périssables, dont la conservation est assurée par un procédé associant le conditionnement dans un récipient étanche à l'eau, aux gaz et aux microorganismes, à toute température inférieure à 55°C et un traitement par la chaleur (Décret n°55-241, 1955). L'appertisation est largement utilisée aujourd'hui pour la conservation à long terme des denrées alimentaires pouvant aller de plusieurs mois à quelques années.

De nombreux progrès ont été faits depuis les travaux de Nicolas Appert. En effet, depuis la découverte de l'efficacité de la chaleur, diverses études ont permis de sélectionner et d'optimiser des techniques en fonction des produits à traiter (Cerf, 1987), afin de trouver le meilleur compromis entre qualité et sécurité. Dans les années 1920, on s'intéressait déjà à la résistance de différents microorganismes sur des produits alimentaires (Bigelow, 1921).

Chaque année, les travaux scientifiques centrés sur les traitements thermiques se comptent en centaines, voire en milliers d'articles. Sur les 10 dernières années, des journaux tels que

Journal of Food Protection (JFP), Applied and Environmental Microbiology (AEM), International Journal of Food Microbiology (IJFM), Journal of Applied Microbiology (JAM) ou encore Food Microbiology (FM), font état de plus de 600 publications concernant les applications de traitements thermiques sur des aliments, des liquides, ou même des emballages alimentaires.

2) Mécanismes d'inactivation des microorganismes

La chaleur humide tue le microorganisme par dénaturation des acides nucléiques, des protéines de structure et des enzymes (Farkas, 2007). D'une façon générale, la stabilité thermique des ribosomes correspond à la température maximale de croissance d'un microorganisme. Les membranes cytoplasmiques semblent être les sites majeurs de dommages causés par la chaleur humide. Les microorganismes y sont plus sensibles qu'à la chaleur sèche, du fait de la forte influence de l'activité de l'eau (Lund *et al.*, 2000). En effet, la chaleur sèche nécessite de plus hautes températures et des temps de chauffage plus longs pour arriver au même taux de destruction. Les spores bactériennes sont, de manière générale, plus thermorésistantes que les cellules végétatives. En effet, la spore est une structure déshydratée, et la teneur en eau est directement corrélée à la thermorésistance (Nicholson *et al.*, 2000). Ainsi, des spores produites à haute température, ayant une teneur en eau plus faible que les spores produites à plus basse température, présentent une résistance accrue à la chaleur. Ceci est vrai jusqu'à un certain point. En effet, la thermorésistance des spores augmente jusqu'à une température optimale de sporulation, puis diminue ensuite. Le taux et le type d'ions minéraux contenus dans le cœur de la spore jouent également un rôle de protection, tout comme la saturation de l'ADN par les SASP (small acide soluble proteins). Les spores sans acide dipicolinique (DPA) sont également plus sensibles que celles à forte teneur en DPA (Setlow, 2006). En revanche, les protéines HSP (Heat shock proteins) ne semblent jouer aucun rôle dans la thermorésistance des spores (Melly & Setlow, 2001), contrairement aux cellules végétatives. Le rôle précis de ces protéines n'est pas clairement défini, même si l'on sait que chez la plupart des microorganismes leur synthèse est induite après un choc thermique. Les mécanismes de développement de la thermotolérance ne sont pas précisément identifiés. En effet, il est fréquent qu'un stress environnemental imposé par les procédés industriels induise des réponses protectrices chez les microorganismes (Farkas, 2007).

3) Efficacité microbiologique du traitement thermique

Le traitement thermique est caractérisé par le couple temps/température. Les premiers travaux de thermorésistance microbiologique se sont focalisés sur l'expression de la réponse des microorganismes. L'expression de la cinétique de destruction en base décimale a permis d'introduire le terme de "durée de réduction décimale". Cette durée, appelée D, correspond au temps nécessaire (en minutes) pour réduire la population d'un facteur 10, à une température donnée (Katzin *et al.*, 1942). La cinétique de destruction des microorganismes est, dans la grande majorité des cas, décrite par l'équation suivante (1):

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

avec t le temps de traitement, N_0 la population initiale, N la population survivante au temps t et D la durée de réduction décimale (Gaillard, 2003).

Un autre paramètre, appelé paramètre de thermorésistance z, correspond à l'élévation de température nécessaire pour réduire au dixième la durée de réduction décimale. Cette cinétique d'inactivation est encore actuellement la plus utilisée, et sert de référence au traitement thermique, ainsi qu'à la classification des espèces microbiennes. Pourtant, ces mesures mathématiques ont des limites. En effet, on considère souvent la réduction logarithmique comme **(log) linéaire** (figure 1A), qui sous-entend que toute la population microbienne de la solution testée présente la même thermorésistance. Mais des courbes de survie non linéaires, sont fréquemment rencontrées (figure 1B). Dans ce cas, le concept classique de modélisation log linéaire ne convient plus à ajuster les courbes, et les valeurs de D et z ne sont plus suffisantes.

Plusieurs modèles non linéaires sont disponibles pour ajuster des courbes de destruction présentant différentes allures: un épaulement initial, un effet de traîne, une allure sigmoïde (avec épaulement et traîne), une convexité ou concavité, une allure biphasique (avec 2 portions linéaires présentant des pentes différentes, ou encore avec épaulement)... (Mafart *et al.*, 2010). De nombreuses équations (Xiong *et al.*, 1999) permettent une modélisation généralement satisfaisante de courbes de destruction d'allures différentes (Geeraerd *et al.*, 2000). Geeraerd *et al.* (2005) proposent 9 modèles pouvant décrire chacune des allures évoquées précédemment. Parmi eux, le modèle de Mafart prend en compte la diversité de distribution au sein de la population bactérienne, inspirée de la distribution statistique de

Weibull (Mafart *et al.*, 2002). Ce modèle simplifié peut s'adapter à des courbes concaves ou convexes (équation 2).

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

Avec N la population survivante après un traitement thermique de temps t, N₀ la population initiale, δ le temps de première réduction décimale, et p un paramètre de distribution de la courbe, décrivant une courbe concave (p>1), convexe (p<1) ou linéaire (p=1).

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

Toujours dans le but d'améliorer l'ajustement des courbes de destruction microbiennes, un nouveau modèle appelé modèle de Weibull modifié est proposé par Albert et Mafart en 2005. Ce modèle est décrit par l'équation 3:

$$\gamma \left(\frac{t}{\delta} \right) = (N_0 - N_{res}) 10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p} + N_{res} \quad (3)$$

avec t le temps, γ(t) la concentration bactérienne au temps t, N₀ (>0) la concentration initiale à t₀, N_{res} (≥0) la concentration résiduelle à la fin de l'observation, δ (>0) le temps de première réduction décimale et p le paramètre décrivant la convexité ou la concavité de la courbe (concave : p > 1, convexe p < 1 ou linéaire p = 1).

Ce modèle présente l'avantage de s'ajuster à une large gamme de courbes de destruction, avec ou sans épaulement ou effet de traîne, et ainsi d'obtenir une bonne estimation des paramètres issus des courbes (Albert & Mafart, 2005).

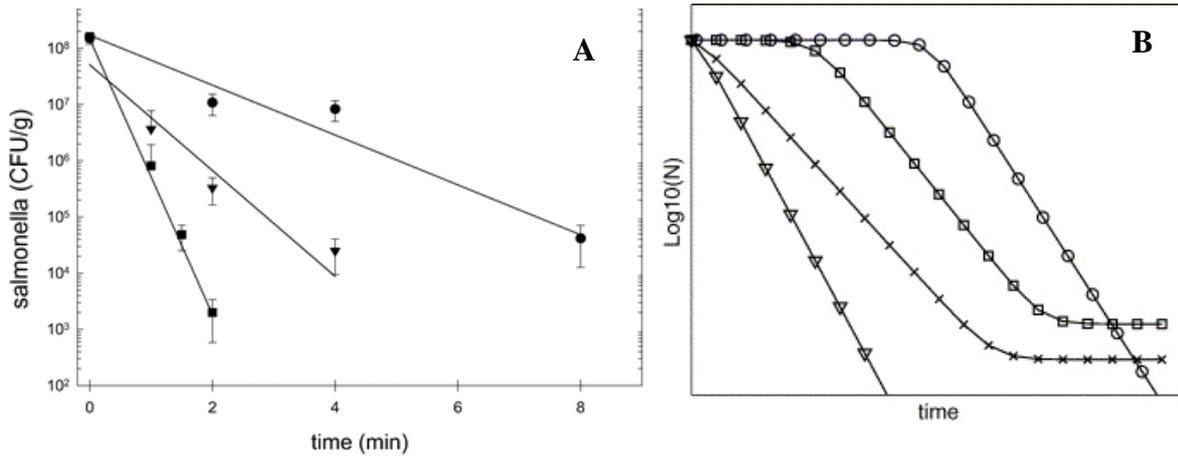


Figure 1: Exemple de courbes de réduction obtenues lors d'un traitement thermique. A) réduction log linéaire de *Salmonella senftenberg* W775 à 53°C (●), 55°C (▲) and 58°C (■) (Weiss & Hammes, 2005). B) Type de courbes d'inactivation fréquemment observées: linéaire (Δ), linéaire avec effet de traîne (x); sigmoïde (□) linéaire avec épaulement (○) (Geeraerd *et al.*, 2005)

Même si de nombreux travaux définissent différents paramètres pour évaluer l'efficacité des traitements thermiques, le modèle linéaire et les paramètres D et z sont encore largement utilisés. De nombreuses données exploitant ces paramètres sont accessibles, aussi bien pour des spores que pour des cellules végétatives. Les tables 2 et 3 montrent quelques uns des exemples de valeurs de D et z rencontrés dans la littérature.

Table 2: Niveaux de thermorésistance approximatifs de cellules végétatives bactériennes (Aguirre *et al.*, 2009).

Microorganisme	Milieu	Température (°C)	D (min)	Z (°C)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Solution saline	56	22.03	6.75
		59	7.81	
		61	4	
<i>Listeria innocua</i>	Solution saline	50	45.66	5.16
		54	6.61	
		57	2.03	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Solution saline	45	54.9	4.19
		47	18.2	
		49	6.1	
<i>Salmonella enteritidis</i>	Solution saline	50	14.1	5.74
		54	3.71	
		59	0.39	

Table 3: Niveaux de thermorésistance de spores bactériennes (Farkas, 2007)

Type d'aliments et microorganismes	D value (min) à:		Z value (°C)
	121°C	100°C	
Aliments peu acides (pH>4.6)			
Aérobies thermophiles			
<i>Bacillus stearotherophilus</i>	4.0-4.5	3 000	7
Anaérobies mésophiles			
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.1-1.5		9-13
<i>Clostridium botulinum types A et B</i>	0.1-0.2	50	10
<i>Clostridium perfringens</i>		0.3-20	10-30
Aérobies mésophiles			
<i>Bacillus licheniformis</i>		13	6
<i>Bacillus subtilis</i>		11	7
<i>Bacillus cereus</i>		5	10
<i>Bacillus megaterium</i>		1	9
Aliments acides (pH≤4.6)			
Aérobies thermotolérants			
<i>Bacillus coagulans</i>	0.01-0.1		
Aérobies mésophiles			
<i>Bacillus polymyxa</i>		0.1-0.5	

Les premières évaluations de la résistance de certaines espèces sont anciennes et donnent des éléments clés pour préserver la sécurité microbiologique des aliments. Par exemple, après l'étude de 109 souches de *C. botulinum*, Esty et Meyer, ont conclu en 1922, que pour les spores de ces microorganismes qui montraient la plus grande thermorésistance, les traitements thermiques devaient être de 4 minutes à 120°C, 10 minutes à 115°C, 33 minutes à 105°C et 330 minutes à 100°C (Lund *et al.*, 2000).

Divers facteurs (composition du milieu environnant pendant ou après traitement, caractéristiques du traitement, facteurs propres au microorganisme...) peuvent fortement influencer la thermorésistance des microorganismes. Certains peuvent agir à plusieurs niveaux. Ainsi, un pH acide (pH = 4) du milieu lors du traitement va provoquer une résistance thermique plus faible de spores de *B. coagulans*, comparé à un pH neutre (Palop *et al.*, 1999). Un pH acide lors de la sporulation peut, selon le microorganisme, avoir un effet sur la thermorésistance. Les spores de *B. cereus* ATCC 4342 ont montré une résistance plus faible lorsque le pH de sporulation était de 5.5, par rapport à un pH égal à 7. En revanche, la souche *B. cereus* ATCC 7004 n'a montré aucune différence de thermorésistance en fonction du pH de

sporulation (Mazas *et al.*, 1997). L'activité de l'eau est, tout comme le pH, un élément essentiel dans la détermination de la thermorésistance des microorganismes. Une faible a_w lors du traitement provoquera une augmentation de la résistance à la chaleur (Kaur *et al.*, 1998). En revanche, une faible activité de l'eau (<0.98) du milieu de récupération a montré une inhibition de la germination et de la croissance de spores de *B. cereus* (Martinez *et al.*, 2007). La faible teneur en eau du cœur des spores et la forte minéralisation favorisent leur thermorésistance. Une haute température appliquée lors de la sporulation entraînera une faible teneur en eau du cœur, et ainsi une forte thermorésistance. Des spores de *B. subtilis* produites à 48°C ont montré une résistance beaucoup plus importante à un traitement thermique que celles produites à 22°C (Melly *et al.*, 2002), résultat corrélé à l'hydratation du cœur, s'élevant à 39% dans les spores obtenues à 22°C, contre 34,25% dans celles obtenues à 48°C. Un choc thermique lors de la formation des spores de *B. subtilis* a également induit une augmentation de leur thermorésistance (Movahedi & Waites, 2000). La composition du milieu de reprise ou de traitement ont fait l'objet de diverses études. De manière générale, la thermorésistance des microorganismes est plus importante lorsque le milieu de traitement est riche en matières grasses (Kaur *et al.*, 1998). En revanche, l'addition de calcium (100 ppm) ou d'amidon dans le milieu de reprise a entraîné une plus forte reprise de croissance des spores de *Geobacillus stearothermophilus* préalablement chauffées à 120°C (Lopez *et al.*, 1997). La présence ou non d'oxygène dans le milieu après un traitement thermique peut aussi être déterminante pour la reprise de croissance des microorganismes. Par exemple, la croissance d'*E. coli* O157:H7 après un choc thermique est plus importante en anaérobiose qu'en aérobie, ce qui démontre ici, une augmentation de leur sensibilité au stress oxydant provoquée par la chaleur (George & Peck, 1998). Il est important de connaître l'influence de chaque facteur, mais aussi les possibles interactions existantes, afin d'optimiser les traitements thermiques en fonction de l'aliment traité mais aussi du microorganisme.

4) Equipements industriels

Les équipements de chauffage ohmique, de micro-ondes, les autoclaves, sont quelques uns des nombreux exemples de procédés de traitements thermiques. Il existe ainsi une très large gamme d'équipements industriels, plus ou moins coûteux selon leur taille et leur consommation d'énergie. Par exemple, les systèmes d'autoclave (figure 2) sont utilisés depuis plus de 100 ans pour stériliser les aliments peu acides au delà de 100°C (Lund *et al.*, 2000).

Le premier autoclave fût mis au point par Denis Papin (qui inventa également le premier moteur à vapeur). Le procédé fut ensuite breveté en 1820 par Pierre-Alexandre Lemare. Il sera amélioré par Nicolas Appert pour l'adapter à la conserve. L'autoclave (*traitement discontinu*) fonctionne en 3 phases: la montée en pression et en température (injection d'air comprimé et de vapeur surchauffée dans la chambre hermétique), le palier (maintien des pressions et température pendant un temps donné) et la descente en pression et en température (évacuation de l'air et projection d'eau froide).



Figure 2: Deux exemples de stérilisateur statiques (Exapro, 2010; Steriflow thermal processing, 2010).

L'autoclave n'est qu'un des nombreux exemples d'équipements utilisés pour les traitements thermiques. Des systèmes continus d'échangeurs (à plaque, à spirale...) sont fréquemment utilisés pour la pasteurisation de liquides. Le produit circule parallèlement à un fluide thermique, généralement à contre courant (Tobaly, 2002). Les deux fluides sont séparés par une surface d'échange, pouvant être une plaque, une spirale, ou encore un tube. Certains peuvent couvrir des débits de plusieurs milliers de litres de produits liquides par heure (par exemple jusqu'à 30000 L/h pour certains jus de fruits).

Le traitement thermique permet de décontaminer des produits avec leur emballage (cas de l'autoclave). Il faut pour cela que ledit emballage soit résistant à la chaleur et n'entraîne aucune migration indésirable au sein de l'aliment. Dans d'autres cas, ils peuvent être traités séparément. Certains emballages thermoformés acquièrent leur géométrie finale par chauffage

rapide et à forte température. Ce procédé combine à la fois fabrication et décontamination. C'est le cas par exemple des bouteilles en plastique ou des pots de yaourt. Différentes matières sont utilisées, notamment des matières plastiques comme le polystyrène, le polyéthylène, le PET (polyéthylène téréphtalate) ou encore le polycarbonate.

5) Avantages du traitement thermique, limites, produits cibles

Les techniques de décontamination par traitement thermique sont anciennes et bien maîtrisées. Mais il faut, pour chaque produit, trouver le bon équilibre entre un chauffage en excès (qui réduit les qualités organoleptiques et nutritionnelles et peut produire des composés toxiques et des goûts indésirables) (Spilimbergo *et al.*, 2002) et un chauffage insuffisant (qui ne détruit pas suffisamment les microorganismes). Certains produits ont des contraintes encore plus marquées, comme par exemple la pasteurisation des œufs liquides, qui est limitée à des températures basses (et donc des temps plus longs) à cause de la coagulation des protéines (Huang *et al.*, 2006).

Les traitements thermiques peuvent être appliqués dans un but de cuisson des aliments. Tous les procédés de cuisson (grillage, fumage, rôtissage...) modifient les qualités organoleptiques ainsi que les propriétés nutritionnelles des produits dans le but de les rendre consommables (Fellows, 2000). Dans cette configuration où de telles modifications sont souhaitées, il n'est pas nécessaire d'utiliser un autre moyen de décontamination. En revanche, dans le cas où ces traitements thermiques sont utilisés seulement dans un but de stabilisation microbiologique des produits (pasteurisation, stérilisation), l'augmentation de température (et donc les modifications organoleptiques) peut être qualifiée d'indésirable.

D'autres traitements physiques de décontamination sont aujourd'hui connus et utilisés, et sont une alternative très intéressante aux traitements thermiques. Tout comme la chaleur, ces traitements physiques sont propres, c'est à dire sans nécessité d'ajout de produits chimiques, mais ils peuvent également être athermiques, ce qui permettrait, dans le cas du traitement d'aliments, de préserver les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits.

3. Techniques non thermiques alternatives

"En raison d'une part de la demande croissante pour des produits possédant d'excellentes qualités sanitaires, organoleptiques et nutritionnelles, et d'autre part de l'importance de la réduction de l'impact énergétique et environnemental des procédés de transformation ou d'entreposage des aliments, il est probable que les professionnels de l'alimentation feront de plus en plus appel à des techniques limitant l'usage des traitements thermiques [...]. Diverses techniques ou "nouvelles technologies" sont actuellement proposées." *Avis du conseil national de l'alimentation sur le développement des nouvelles technologies dans la fabrication, le conditionnement et la conservation des denrées alimentaires, 10 juin 2009.*

1) Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH) et Hautes Pressions à Dioxyde de Carbone (HPDC)

a. Principe

Le procédé des hautes pressions consiste à soumettre un produit alimentaire liquide ou solide, avec ou sans emballage, à des pressions comprises entre 100 et 800 MPa (Devlieghere *et al.*, 2004), à température ambiante ou inférieure à 50°C. La durée de traitement est généralement comprise entre 5 et 30 min. Contrairement aux traitements utilisant la température, la pression est transmise instantanément et uniformément à travers le produit, indépendamment de sa taille, forme et composition (la montée en pression est généralement de 200 MPa/min). La pression étant la même dans toutes les directions, elle est qualifiée d'hydrostatique. Cela permet de conserver la forme d'origine du produit (Goodridge *et al.*, 2006). Même si la taille, la forme et la composition de l'emballage ne sont pas importants, il doit comporter une partie flexible, pour éviter tout risque de rupture. Durant le traitement, le volume du produit diminue en fonction de la pression qui lui est imposée (environ 5% pour 100 MPa) et une expansion équivalente se produit durant la décompression. La compression à laquelle l'aliment est soumis, provoque une augmentation de sa température, dépendante de sa composition (Chéret, 2005), Cette augmentation est en moyenne de l'ordre de 3°C pour 100 MPa, mais la paroi de l'enceinte de l'appareil évacue une partie de cette chaleur.

Une autre technique de décontamination par haute pression, appelée HPDC, qui utilise le CO₂, présente de nombreux avantages (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007). En effet, les pressions

nécessaires à l'efficacité bactéricide sont moins élevées que dans le cas des HPH. Les pressions utilisées sont généralement situées en dessous de 20 MPa, le traitement est donc plus facile à contrôler (Spilimbergo *et al.*, 2002). De plus, le CO₂ est non toxique. La technique consiste à placer le produit au contact de CO₂ sub ou supercritique sous pression. Le point critique correspond à l'équilibre des phases gazeuse et liquide qui sont, pour le CO₂, une température de T = 31.1°C et une pression de P = 7.38 MPa. A température et pression inférieures à celles du point critique, le CO₂ est dans un état dit "subcritique"; et à l'inverse, à température et pression supérieures à celle du point critique, le CO₂ est dans un état dit "supercritique". Le CO₂ a un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. L'avantage du CO₂ supercritique est qu'il a une viscosité proche de celle des gaz, une densité proche des liquides, et une diffusivité élevée. Il peut ainsi diffuser à travers les solides comme un gaz et dissoudre les matériaux comme un liquide (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007). Le CO₂ a été comparé à d'autres gaz sous pression (N₂, Ar, Tetrafluoroethane...) mais aucun n'a montré de meilleure efficacité.

b. Mécanismes d'inactivation des microorganismes

Le mode d'action va dépendre du niveau de pression. Les hautes pressions hydrostatiques entre 30 et 50 MPa peuvent avoir une influence sur l'expression des gènes et la synthèse protéique. A des pressions d'environ 100 MPa, la membrane nucléaire des levures est affectée, et à 400-600 MPa, d'autres altérations sont visibles dans les mitochondries et le cytoplasme (Buzrul, 2008). L'inactivation due à la pression est accompagnée d'une augmentation de l'ATP extracellulaire, ce qui prouve une altération de la membrane (Smelt, 1998).

Chez *Saccharomyces cerevisiae* soumise aux hautes pressions, la diffusion de certains ions et solutés internes (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, glycérol endogène) montre que l'inactivation des levures peut être causée par la perméabilisation de la membrane induite par le traitement (Perrier-Cornet *et al.*, 1999). On observe donc une augmentation de la perméabilité des membranes et une possible inhibition des enzymes indispensables à la survie et la croissance des cellules bactériennes.

L'observation en microscopie électronique à balayage (figure 3) de spores d'*Aspergillus niger* traitées révèle qu'une pression de 200 MPa (conditions sublétales) provoque de fortes déformations ou ruptures des conidies (85% de la population), démontrant l'altération de la structure des microorganismes (Tribst *et al.*, 2009). L'application de pressions sublétales peut au contraire induire l'expression de gènes codant pour des protéines de choc thermique

(HSP). Ces protéines synthétisées vont pouvoir prévenir les dommages ou aider à la réparation des cellules, ce qui provoque une résistance accrue aux hautes pressions (Aertsen *et al.*, 2004). Les SASP joueraient également un rôle de protection des spores de *B. subtilis* aux très hautes pressions (Wuytack *et al.*, 1998).

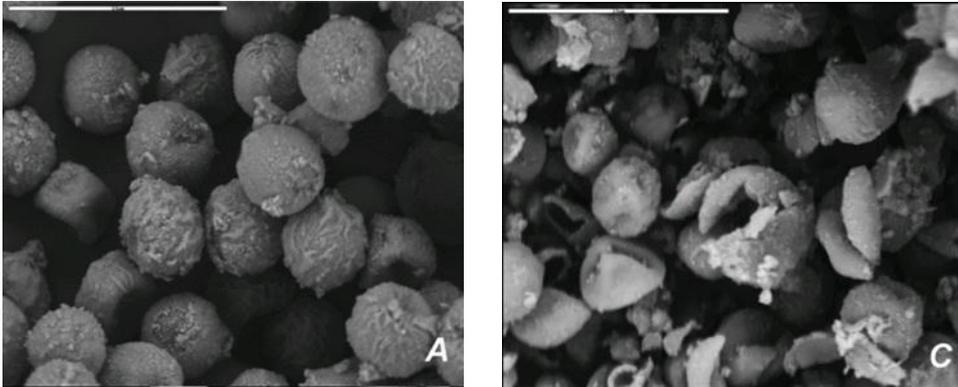


Figure 3: Observations microscopiques (MEB 20 kV), de spores d'*A. niger* non traitées (A) et traitées par Hautes Pressions à 200 MPa (C)- échelle 10 μ m. (Tribst *et al.*, 2009)

c. Efficacité microbiologique

Hautes pressions hydrostatiques:

Les bactéries à Gram⁺ semblent plus résistantes que les Gram⁻. Les cellules en phase de latence ou stationnaire présenteraient une plus grande résistance que les cellules en phase exponentielle. Les spores bactériennes sont également plus résistantes que les cellules végétatives. La décontamination des spores nécessite le plus souvent de combiner pression et augmentation de température (Wimalaratne & Farid, 2008). De plus, une alternance entre faibles pressions (initiant la germination) et pressions élevées (germicides) est une technique pouvant être utilisée pour le traitement de spores bactériennes fortement thermorésistantes comme *G. stearothermophilus* (Farkas, 2007). Goodridge *et al.* (2006) démontrent qu'un traitement d'environ 400 MPa à 25°C pendant **5 minutes** est suffisant pour éliminer totalement *Salmonella* Enteritidis d'une culture liquide (soit une réduction de 7.5 unités logarithmiques). Un traitement de **15 minutes** à 600 MPa, 20°C appliqué à des graines de luzerne a permis une décontamination de plus de 5 cycles logarithmiques d'*E. coli* O157:H7, sans affecter la germinabilité des graines (Neetoo *et al.*, 2009). Huang *et al.* (2006) testent les traitements haute pression visant à éliminer *Salmonella* Enteritidis dans l'œuf liquide. Un

traitement de 138 MPa à 20°C durant 8 minutes en continu permet une réduction logarithmique de 0.4 unités. Mais la méthode d'application a un effet important sur l'efficacité décontaminante: le même traitement en discontinu (2min + 2min + 4min) permet une réduction logarithmique de 2.2 unités sur le même produit. On peut supposer qu'une succession de pression/dépression facilite la rupture des membranes cellulaires et peut ainsi causer la mort du microorganisme. Ainsi, des pressions plus faibles appliquées de manière discontinue pourraient avoir la même efficacité qu'un traitement continu à pression plus élevée.

Devlieghere et al., en 2004, considèrent que les données sont encore insuffisantes pour introduire cette technique en industrie (2004). L'application d'une technique en milieu industriel nécessite systématiquement des données quantitatives sur l'inactivation de microorganismes d'altération ou pathogènes, ainsi que des informations sur l'influence de la composition de l'aliment et des propriétés de la matrice. Dans le cas des hautes pressions, les informations systématiques sur la résistance microbienne sont limitées du fait des différentes conditions et méthodologies utilisées. Ainsi, seule la sensibilité des différents microorganismes au sein d'une même étude peut être comparée.

Hautes pressions à dioxyde de carbone:

Ishikawa et al. (1997) ont comparé les HPDC au traitement thermique, pour les spores de 3 espèces bactériennes. Un traitement de 60 minutes à une pression de 30 MPa et une température de 50°C a permis une réduction des spores de *B. cereus* de 6 cycles logarithmiques, alors qu'un traitement thermique de 60 minutes à 100°C a seulement permis une réduction de 4.6 cycles logarithmiques. Le même traitement thermique appliqué à *B. polymyxa* a réduit la population de seulement 0.85 unités logarithmiques. Dans ce cas, un traitement en HPDC de 15 minutes à 31°C, 30 MPa s'est révélé plus efficace. L'étude de nombreux facteurs d'influence sur l'inactivation de *Pseudomonas fluorescens* par HPDC a révélé que des éléments environnementaux, comme une forte concentration en sel (2%), un pH acide (4-4,5) ou la présence de Tween 80 (0.5%) pouvaient augmenter l'efficacité bactéricide de façon significative. A l'inverse, la présence d'huile de tournesol (entre 10 et 30%), un pH basique (pH=9) ou une augmentation de la viscosité du milieu peuvent diminuer l'efficacité. Enfin, l'ajout d'amidon n'a pas montré d'influence, et ce, quelle que soit la concentration (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2009). La composition des aliments est dans tous les cas un élément important pouvant expliquer certains problèmes d'efficacité du traitement.

d. Equipements industriels

L'introduction des hautes pressions pour la conservation des aliments date du début des années 90 (Aertsen *et al.*, 2009). Dans le cas des HPH, les équipements industriels utilisés sont dits discontinus (en batch de 10 à 500 L) pour les solides et visqueux ou particulés, ou bien semi continu (de 1 à 4 tonnes/h) pour les liquides (Devlieghere *et al.*, 2004). Le système batch utilise une pompe qui envoie un fluide de pressurisation (généralement de l'eau) dans une enceinte close. Pour empêcher le contact avec le fluide de compression, le produit est obligatoirement traité dans son emballage hermétiquement clos. C'est pour cette raison que le procédé est discontinu, il faut charger ou décharger les aliments emballés dans l'enceinte dont le volume est réduit à environ 75% du volume interne. Dans le cas des produits liquides ou pâteux, le procédé semi continu peut être appliqué. Le procédé est appelé semi continu lorsque les dispositifs sont composés d'une suite de plusieurs enceintes qui fonctionnent de façon décalée. La pression est générée par un piston au contact du milieu, qui réduit le volume de l'enceinte. Le produit doit ensuite être conditionné aseptiquement. Devlieghere *et al.*, en 2004 estimaient le prix de 10 à 15 centimes d'euro par kg de produit (incluant l'investissement ainsi que les coûts de fonctionnement).

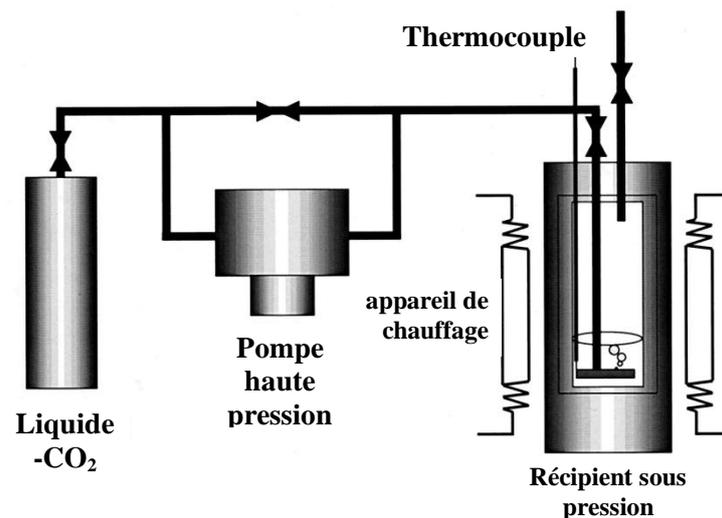


Figure 4: Représentation schématique d'un équipement HPDC (Watanabe *et al.*, 2003)



MODEL	WAVE 6000 / 55
Vessel Layout	Horizontal
Vessel Characteristics	Ø = 200 mm (7.9") Length = 2.000 mm (78.6") Volume = 55 l (14.5 gal)
Maximum Work Pressure	6.000 bar (87.000 p.s.i.)
Pressure Transmitting fluid	Water free of additives
Work temperature for processing water	5°C – 30°C (41°F-86°F)
Pressuring time	Less than 5 min
N° of Intensifiers	1 Built-in
Baskets loading / unloading	Automatic

Figure 5: Exemple d'équipement haute pression industriel (NC Hyperbaric, 2010)

Table 4: Exemple de prix des équipements HPH (Meyer *et al.*, 2000)

Equipements	Capacité 215-L 690 MPa (100,000 psi) 100°C Temps de mise sous pression: 90 sec minimum Temps de dépressurisation: 30 sec minimum coût: 3,5 millions de \$
Temps du cycle	6-8 min
Capacité	Hypothèse: Cinq unités 215-L, traitement de 196 162 kg/jour, 330 jours/an, 90% du temps, pour un total de 67.500.000 kg/an. Produit préemballé, 75% de taux de remplissage
Dépréciation	10 ans
Coûts	Equipements, 17.500.000 \$ Autres (structure, supports) 10.500.000 \$ Total: 28.000.000 \$
Coûts par kg	Main d'oeuvre: 0.018 \$/kg Maintenance: 0.036/\$kg Dépréciation: 0.037 \$/kg Total: 0.091 \$/kg

e. Législation

Dans les 2 cas, en Europe, les hautes pressions hydrostatiques sont soumises à la législation Novel Food (Novel Food, 1997). Aux Etats-Unis, il n'y a cependant pas de législation particulière concernant les produits traités par hautes pressions.

Le règlement européen n°258/97, communément appelé "Novel food" et datant du 27 janvier 1997, s'applique entre autre aux aliments ou ingrédients auxquels a été appliqué un procédé de production qui n'est pas couramment utilisé, lorsque ce procédé entraîne dans la

composition ou dans la structure des aliments ou des ingrédients alimentaires des modifications significatives de leur valeur nutritive, de leur métabolisme ou de leur teneur en substances indésirables. Dans le cadre de ce règlement, une nouvelle technologie est donc une technologie qui n'était pas couramment utilisée pour la production de denrées alimentaires avant le 15 Mai 1997.

f. Avantages de la technologie, limites, produits cibles

Les hautes pressions n'altèrent pas les liaisons covalentes. Les vitamines et composés aromatiques, essentiellement stabilisés par ce type de liaisons, ne sont donc pas endommagés. Cette propriété permet la conservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques de l'aliment. En revanche, les liaisons de faible énergie des macromolécules telles que les protéines, les polysaccharides et les acides nucléiques peuvent être modifiées parfois de façon irréversible après dépressurisation. De nombreux facteurs peuvent affecter la qualité finale du produit: l'étape de préchauffage, la température initiale, le temps de pressurisation du récipient, le temps nécessaire à la dépressurisation ainsi qu'au refroidissement après dépressurisation. Par exemple, privilégier l'augmentation de la pression au profit de la température initiale du produit peut prévenir des dommages causés par la chaleur lors du préchauffage ou du refroidissement. (Meyer *et al.*, 2000). Cependant, une température trop basse est défavorable au traitement par hautes pressions (Huang *et al.*, 2006), tout comme une diminution de l'activité de l'eau (Goodridge *et al.*, 2006). Afin d'obtenir une décontamination microbiologique plus élevée, un couplage des hautes pressions avec un autre traitement tel qu'un préchauffage doux permet une meilleure efficacité (Neetoo *et al.*, 2009). En effet, dans le cas de décontamination de spores bactériennes, certaines souches peuvent résister à des pressions supérieures à 1000 MPa à température ambiante. Le préchauffage peut ainsi provoquer la germination des spores qui deviendront donc plus sensibles aux hautes pressions (Wei *et al.*, 2009). Dans certains cas, des cellules bactériennes peuvent devenir résistantes, lors de traitements successifs appliqués (Devlieghere *et al.*, 2004). Une augmentation de température et de pression peut donc être nécessaire pour les éliminer (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2010).

Dans le cas des HPDC, le CO₂ pressurisé ne doit pas être utilisé à des couples pression/température trop éloignés du point critique, car de fortes températures peuvent altérer l'aliment et provoquer une moins bonne solubilisation du CO₂ (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont montré l'application possible des hautes pressions sur des produits alimentaires tels que les confitures, les jus de fruits, les amandes (Goodridge *et al.*, 2006), les graines, les sauces... (Devlieghere *et al.*, 2004). La pressurisation peut provoquer des effets bénéfiques sur les aliments, comme par exemple sur le brocoli (Bartlett, 2010). En effet, la pression peut permettre une augmentation de sa teneur en sulforaphane, un isothiocyanate retrouvé dans les légumes crucifères, et possédant des propriétés antitumorales. En revanche, le traitement du lait par hautes pressions s'est révélé être une alternative peu intéressante à la pasteurisation (Smiddy *et al.*, 2007). De plus, l'environnement physicochimique complexe du lait (sans autre précision) semble exercer un effet protecteur sur les microorganismes (Devlieghere *et al.*, 2004). Bien que le traitement des jus de fruits (Buzrul *et al.*, 2008; Campos & Cristianini, 2007) par HPH montre une réelle efficacité décontaminante, il reste un traitement semi-continu, pouvant donc présenter un frein en terme de rendement industriel (Devlieghere *et al.*, 2004). Les aliments peu acides restent en général de bons candidats à ce type de traitements. Pourtant, une étude menée sur les oignons (Butz *et al.*, 1994) a permis une réduction considérable des microorganismes par hautes pressions, mais s'est avéré totalement inapproprié, du fait des modifications trop importantes sur le goût et la stabilité du produit.

Les jus de fruits traités par HPH sont commercialisés au Japon depuis 1990 (Farkas, 2007). Le traitement peut s'effectuer sur des aliments déjà emballés. Dans ce cas, il n'y a pas de risques de contamination post-traitement.

2) Champs électriques pulsés (CEP)

a. Principe

Un générateur haute tension est utilisé pour charger des condensateurs (Gongora-Nieto *et al.*, 2002) ou une ligne de transmission (Kolb *et al.*, 2006). Un switch haute tension permet de décharger rapidement l'énergie stockée. Le signal ainsi généré a une forme carrée avec des fronts de montée de l'ordre de la nanoseconde, une durée de quelques dizaines de nanosecondes et une amplitude de plusieurs kilovolts. L'aliment est placé entre deux électrodes. La distance entre électrodes vaut quelques centaines de micromètres ce qui permet de générer des champs de plusieurs dizaines de kV/cm. L'intensité du champ électrique appliqué est généralement comprise entre 2 et 87 kV/cm, mais les taux d'inactivation efficaces

sont généralement obtenus avec des champs d'intensité comprise entre 20 et 50 kV/cm (Heinz *et al.*, 2001). Les temps de traitement sont généralement exprimés en micro ou millisecondes.

b. Mécanismes d'inactivation

Cette technologie utilise la propriété d'une membrane de devenir perméable sous l'effet d'un champ électrique. Cette propriété est traditionnellement utilisée pour transférer des gènes ou des molécules dans des cellules (Widera *et al.*, 2000). Dans ce cas, les impulsions de tensions ont une durée de l'ordre de la microseconde et une amplitude de l'ordre du kilovolt (effet réversible). Cependant, en réduisant la durée des impulsions à quelques dizaines de nanosecondes et en augmentant leur amplitude pour atteindre plusieurs kilovolts, l'effet devient irréversible. Cette propriété est donc utilisée pour la décontamination (Frey *et al.*, 2006). Il a été démontré qu'un traitement de 64 impulsions à 60 kV/cm et à 13°C augmentait l'espace entre la membrane externe et la membrane plasmique chez *E. coli*. Chez *S. aureus*, ce même traitement a entraîné une rupture de la paroi et une fuite du matériel cellulaire (Knorr *et al.*, 1994) clairement visible par microscopie électronique à transmission (grossissement X23000). Ces phénomènes ont aussi été observés sur la levure *S. cerevisiae*, avec une augmentation de l'espace entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire, une fuite du matériel cytoplasmique, ainsi qu'une perturbation des organites (noyau, mitochondries, ribosomes).

Les mécanismes conduisant à l'inactivation de la cellule ne sont à ce jour pas encore compris et différentes hypothèses existent. La formation des pores de dimension de l'ordre du nanomètre permettrait à des ions de sortir de la cellule ce qui modifierait sa conductivité (Hu *et al.*, 2005). La membrane de la cellule est influencée de manière asymétrique selon sa position relative par rapport à l'anode et à la cathode (Mehrle *et al.*, 1989). Ceci conduirait à une différence de potentiel à la surface de la cellule induisant des phénomènes de transport de particules chargées ou neutres (Frey *et al.*, 2006). La formation des pores permettrait au champ de pénétrer à l'intérieur de la cellule (Schoenbach *et al.*, 2004) et ainsi d'agir sur le matériel intracellulaire.

c. Efficacité microbiologique

Les endospores des bactéries, tout comme les ascospores des moisissures, semblent résistantes aux CEP. La germination des spores (souvent utilisé comme moyen permettant

leur destruction) n'étant pas initiée par ce procédé, il est plus efficace d'utiliser les CEP pour stériliser des milieux en les combinant à un traitement induisant la germination des spores.

L'efficacité des CEP dépend de nombreux facteurs dont le type de microorganisme, leur état physiologique et leur concentration initiale. Les bactéries à Gram⁻ semblent ici, comme pour les hautes pressions, plus sensibles au traitement que les Gram⁺, et les cellules en phase de croissance semblent également les formes les plus sensibles. Des facteurs environnementaux semblent aussi jouer un rôle important: la force ionique du milieu, le pH, l'activité de l'eau, la viscosité, la présence de particules solides ou de gouttes d'huile... En effet, une faible force ionique du milieu pourrait augmenter l'efficacité du traitement. En revanche, l'augmentation de la concentration en protéines et lipides permet une plus grande résistance microbienne. Les protéines contenues dans le lait absorberaient les radicaux libres ainsi que les ions nécessaires à la destruction des cellules. Les lipides contenus dans du lait pourraient quant à eux modifier la conductivité du milieu, et ainsi protéger les microorganismes des CEP (Barsotti & Cheftel, 1999).

Les paramètres physiques des CEP entrent également en jeu, comme l'amplitude du champ, la fréquence des impulsions et le temps de traitement. La température est aussi un facteur important mais ses effets sont plus complexes. Une plus grande sensibilité des bactéries est observée à des températures de l'ordre de **50-60°C** par rapport à **10-30°C**, certainement à cause de l'augmentation de la fluidité et donc de la fragilité des membranes à plus haute température. Il a été démontré qu'un traitement de 30 pulses de 56,7 kV/cm à 20°C n'a aucun effet sur *Salmonella* Enteritidis présente dans de l'œuf liquide (Huang *et al.*, 2006). Un traitement plus fort de 50 pulses à **55°C** et 56,7 kV/cm n'a pas non plus montré d'effet sur les œufs liquides (la viscosité des œufs serait la raison de la mauvaise efficacité du traitement). D'autres tests ont révélé une efficacité bien meilleure. Un traitement de 30 pulses à 50 kV/cm et 20°C a permis une réduction de 1,8 cycles logarithmiques de *B. cereus* NCTC11145, et de 3,4 cycles logarithmiques de *B. subtilis* ATCC6633 (Marquez *et al.*, 1997). Vingt impulsions supplémentaires ont permis une réduction logarithmique supérieure à 5 unités pour *B. cereus*. L'intervalle de temps entre chaque pulse peut également jouer un rôle: une décontamination de 2.1 cycles logarithmiques a été obtenue sur des spores de *B. cereus* avec un traitement de 30 pulses à 35 kV/cm avec un intervalle de 5 à 6 seconde entre chaque pulse. Le même traitement avec un intervalle de temps plus court (2 à 3 secondes entre chaque impulsion) a entraîné une réduction de seulement 1.2 unités logarithmiques. Cette différence peut s'expliquer par la polarité des pulses et le temps de pénétration des ions dans le cœur des

spores (Marquez *et al.*, 1997). Comme dans le cas des HPH, l'efficacité des CEP peut être améliorée en couplant les traitements (utilisation de nisine, augmentation de la température...).

Table 5: Décontaminations microbiologiques par CEP

Microorganisme	milieu	Champ électrique (kV/cm)	Nombre de pulses	Durée des pulses (μ s)	T°	Réduction logarithmique	Référence
Spores <i>B. subtilis</i> ATCC6633	Suspension (0.15%NaCl)	50	15	2	25°C	0.2	(Marquez <i>et al.</i> , 1997)
			30			3.4	
Spores <i>B. cereus</i> NCTC11145	Suspension (0.15%NaCl)	50	30	2	25°C	1.8	(Marquez <i>et al.</i> , 1997)
			50			>5	
<i>S. aureus</i> CECT240	lait	25	150	8	25°C	1.8	(Sobrin-Lopez <i>et al.</i> , 2006)
			35			150	
Levures	Jus de raisin	80	20	2	42°C	0.9	(Wu <i>et al.</i> , 2005)
					50°C	3.9	
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	lait	20	10	3.25	35°C	<1	(Fleischman <i>et al.</i> , 2004)
					55°C	4.5	

d. Equipements industriels

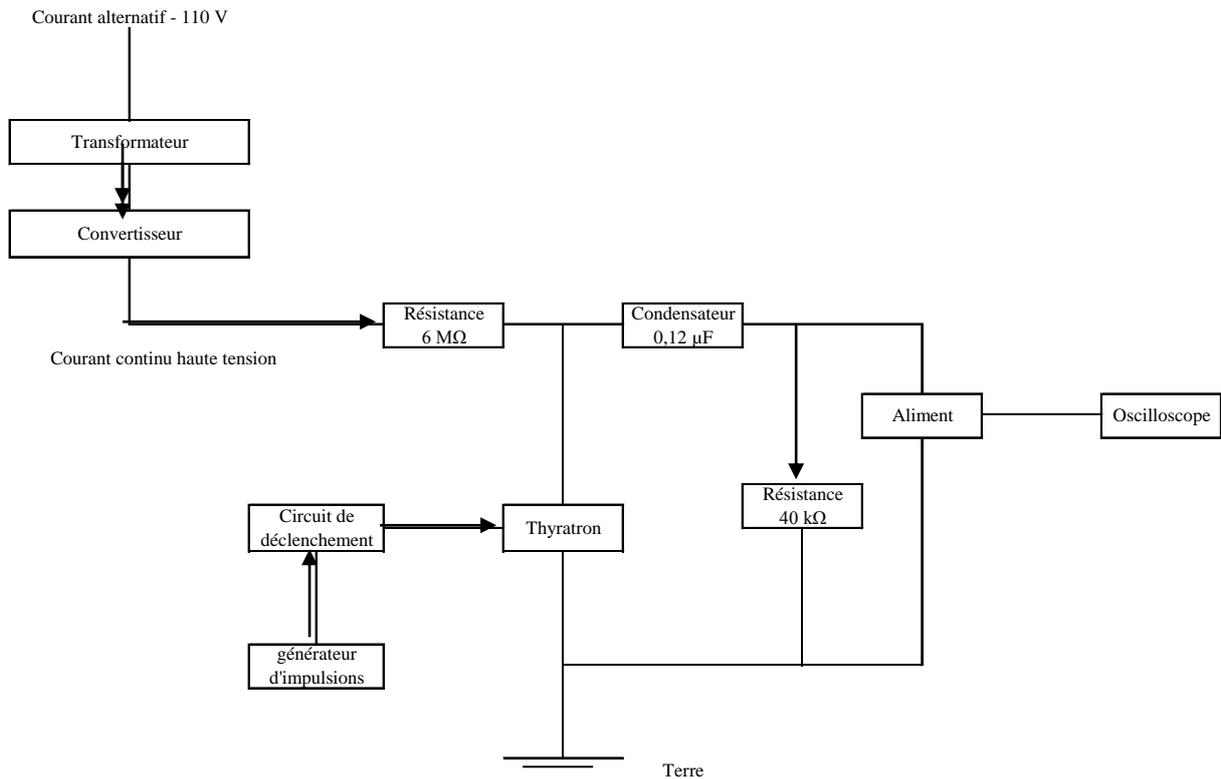


Figure 6: Schéma d'un équipement CEP (Wu *et al.*, 2005)

Les équipements sont chers, rares, et de capacité limitée. Leur prix (estimation début des années 2000) pouvait aller de 40 000 à 500 000 dollars US, avec un coût de fonctionnement estimé à 0.2 dollar/L (Gongora-Nieto *et al.*, 2002). Aux Etats-Unis, PurePulse Technologies propose des équipements pour traiter des aliments liquides à 35-45 kV/cm avec un débit allant de 3000 à 8000 L/h, depuis 1996.

e. Législation

En ce qui concerne le traitement d'aliments acides ($\text{pH} < 4.5$) comme les jus de fruits, la FDA a répondu à une évaluation de la pasteurisation par CEP par une lettre de non objection (Barsotti & Cheftel, 1999). Mais il reste nécessaire de démontrer pour chaque application l'absence de composés chimiques formés en grande quantité dans les produits alimentaires.

f. Avantages de la technologie, limites, produits cibles

Aucune différence sensorielle n'a été observée entre un traitement par CEP et une pasteurisation sur du lait, des œufs liquides et de la soupe de pois. En revanche, la même comparaison sur du jus de pomme a montré une meilleure conservation des qualités organoleptiques lors du traitement par CEP. Le taux de vitamine C contenu dans le jus de raisin ne semble pas être modifié par les CEP (Wu *et al.*, 2005). Les pulses étant de courte durée, ils n'entraînent pas d'augmentation significative de température. Mais la formation possible de radicaux libres dans l'aliment doit être étudiée. Dans le cas des champs électriques pulsés, un procédé continu est possible, mais limité à des produits liquides (Devlieghere *et al.*, 2004). La conductivité du milieu a une influence non négligeable sur l'efficacité des CEP. De plus, à l'heure actuelle, peu de résultats microbiologiques sont accessibles. Des pulses répétés appliqués aux aliments fluides contenant des protéines provoquent des dépôts au niveau de l'anode, certainement dus à l'insolubilisation et à l'agrégation de ces protéines. Un lavage fréquent du dispositif est donc nécessaire afin de maintenir des champs électriques pulsés uniformes (Barsotti & Cheftel, 1999). Les CEP appliqués au jus de raisin ont démontré une haute efficacité germicide, tout en préservant les qualités nutritionnelles. Le traitement de jus de canneberge (Sen Gupta *et al.*, 2005) ou encore d'orange ou de citron (Cserhalmi *et al.*, 2006) a également mené à la même conclusion. De bons résultats (avec une réduction allant jusqu'à 4.5 cycles logarithmiques) ont été obtenus sur *S. aureus* traité dans du lait mais aucun effet protecteur des matières grasses n'a été mis en évidence (Sobrino-Lopez *et al.*, 2006). En revanche, dans le cas de la bière, les migrations significatives des composants des électrodes (Fe, Cr, Zn, Mn) peuvent provoquer une perte de saveur au delà d'une certaine dose.

3) Irradiations

a. Principe

La décontamination par irradiation fait référence à trois types de phénomènes physiques : le rayonnement gamma, le rayonnement X et les faisceaux d'électron.

Le rayonnement γ correspond à l'émission spontanée de photons par le noyau d'un isotope radioactif. Sa longueur d'onde est en général inférieure à 10 pm. Ce phénomène a été découvert par Paul Villard en 1900. Les rayons X sont des ondes électromagnétiques émises par les couches électroniques profondes des atomes. Leur longueur d'onde est comprise entre

0,01 et 10 nm. Cette partie du spectre électromagnétique a été identifiée par Wilhelm Röntgen en 1895 (Stanton & Rontgen, 1896). Les faisceaux d'électrons font référence à un déplacement d'électrons créés à partir d'une source. Les tubes à vides permettant de créer les faisceaux d'électrons ont été inventés dans leur forme moderne par Karl Braun en 1897 (Braun, 1897). L'irradiation des aliments a commencé avec le programme "Atoms in peace" du Président Eisenhower au début des années 1950.

Les techniques d'irradiation ont l'avantage de pouvoir traiter le produit en surface et en volume. Les rayons X durs et gamma sont très pénétrants donc il est possible de traiter des produits ayant un volume important. Les temps d'exposition sont de l'ordre de l'heure (Satin, 2002). Les faisceaux d'électrons pénètrent moins profondément dans la matière mais suffisamment pour traverser des films ou des emballages. Ainsi l'avantage des faisceaux d'électrons est le fait que les aliments peuvent être traités à travers leur emballage, et même congelés ou réfrigérés (Farkas, 1998). Il est à noter qu'un traitement de forte énergie donne des résultats satisfaisants sur des épaisseurs allant jusqu'à 3,5 cm (Satin, 2002).

Pour ces types de rayonnements, la dose est généralement exprimée en Gray. Un Gray correspond à une énergie absorbée d'1 joule par kg de produit traité. Les doses habituellement utilisées sont comprises entre 0.01 et 10 kGy. Ces types de radiations ont été choisis car ils produisent les effets désirés sur l'aliment, sans induire de radioactivité au sein du produit ou de l'emballage et permettent une utilisation industrielle en matière de quantité et de coût de fonctionnement (Farkas, 2007). Le terme "radapertisation" est employé pour décrire l'ionisation appliquée aux aliments préemballés dont les enzymes ont été inactivées, à des doses déterminées pour qu'aucune altération ou toxicité ne surviennent quelles que soient les conditions et durées de stockage (en l'absence de contamination post-process). Le traitement par irradiation peut être un réel avantage en matière de sécurité alimentaire. Le New York Times et le Wall Street Journal ont même publié en 1994 des éditoriaux favorables aux irradiations (Crawford & Ruff, 1996).

b. Mécanismes d'inactivation

Diverses modifications peuvent être induites dans la structure de l'ADN par un rayonnement ionisant : oxydation du désoxyribose et libération d'une base par hydrolyse, pontage entre bases d'un même brin ou entre bases appartenant à deux brins différents, hydroxylation des bases et en particulier de la thymine, avec formation de peroxydes en présence d'oxygène. Mais les altérations les plus fréquemment observées sont

des ruptures monobrin entre la base et le sucre d'un nucléotide, essentiellement produites par action des radicaux hydroxyyles. Lorsqu'il y a cassures simultanées des brins à des distances très voisines dans l'ADN, ces ruptures double brins (10 fois moins probables que les ruptures simple brin) ont des conséquences beaucoup plus dramatiques pour la survie de la cellule.

Les spores sont plus résistantes à l'irradiation que les cellules végétatives. Les raisons de cette grande résistance ne sont pas clairement identifiées, mais la faible teneur en eau du cœur de la spore pourrait être un facteur important, réduisant par exemple la capacité des rayons γ à générer des radicaux hydroxyyles. Ceci n'est qu'une hypothèse, car il n'existe pas d'étude systématique sur la relation entre teneur en eau et résistance aux rayons γ . Contrairement au cas des traitements thermiques, les SASP (Small Acide Soluble Proteins) ne semblent pas être impliquées dans la résistance aux rayons γ (Nicholson *et al.*, 2000).

c. Efficacité microbiologique

Les bactéries Gram⁻ sont ici encore plus sensibles que les Gram⁺ et les spores toujours plus résistantes que les cellules végétatives, bien que quelques espèces se soient avérées très résistantes dans leur forme végétative (exemple de *Deinococcus radiodurans*). Les virus sont quant à eux très résistants aux irradiations (Farkas, 2007). De nombreux facteurs influencent fortement l'efficacité de ces traitements: la composition du milieu, l'activité de l'eau, la température lors du traitement, la présence d'oxygène (qui augmente la sensibilité), la congélation (la dose nécessaire pour l'inactivation de 90% de la population est 2 à 3 fois plus élevée dans les aliments congelés que dans les aliments frais)... Des doses de 5 à 7 kGy se sont avérées efficaces contre les levures, moisissures et spores (Mittendorfer *et al.*, 2002). Une réduction logarithmique de 2 unités sur des moisissures a été observée sur des grains de café avec une dose de 5 kGy. Thayer *et al.* (2003), grâce à une source de Césium 137 à une dose de 0.1 kGy/min, ont déterminé qu'un traitement de 2.8 kGy sur des graines de luzerne permettait une réduction supérieure à 3 cycles logarithmiques de *Salmonella Mbandaka*. Ils évaluent une destruction de 5 cycles logarithmiques pour une dose de 4,05 kGy.

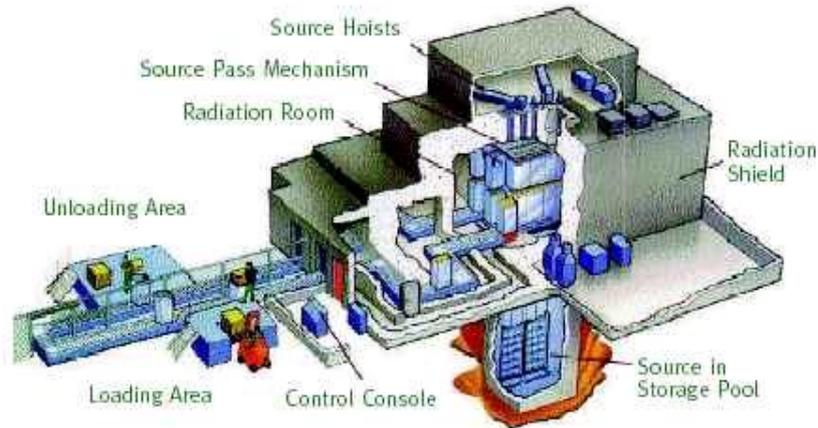
Table 6: Résistance de quelques microorganismes aux irradiations dans des aliments frais ou congelés (Farkas, 2007)

microorganismes	D_{10} (kGy)*	
	Aliments frais	Aliments congelés
<i>Vibrio spp</i>	0.03-0.12	0.11-0.75
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.04-0.21	0.4
<i>Pseudomonas putida</i>	0.06-0.11	
<i>Campullobacter jejuni</i>	0.08-0.20	0.21-0.32
<i>Shigella spp</i>		0.2-0.4
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.14-0.19	
<i>Bacillus cereus (cellules)</i>	0.17	
<i>Proteus vulgaris</i>	0.2	
<i>E. coli</i>	0.23-0.35	0.3-0.6
<i>E. coli O157:H7</i>	0.24-0.27	0.31-0.44
<i>S. aureus</i>	0.26-0.6	0.3-0.45
<i>Brucella abortus</i>	0.34	
<i>Salmonella spp</i>	0.3-0.8	0.4-1.3
<i>L. monocytogenes</i>	0.27-1	0.52-1.3
<i>Lactobacillus spp</i>	0.3-0.9	
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.65-1	
<i>C.perfringens (cellules)</i>	0.59-0.83	
<i>C.botulinum type E (spores)</i>	1.25-1.4	
<i>B.cereus (spores)</i>	1.6	
<i>C.sporogenes (spores)</i>	1.5-2.2	
<i>C.botulinum types A et B (spores)</i>	1-3.6	
<i>Deinococcus radiodurans</i>	5-3.1	
<i>Deinobacter spp</i>	5.05	

* D_{10} : dose de réduction décimale

d. Equipements industriels

Les équipements peuvent être relativement peu encombrants (faisceaux d'électrons accélérés), ou très imposants (rayons γ). Le coût des machines est très élevé, et varie selon la puissance et le type de rayonnement. Sadat, en 2004, donne des exemples d'équipements allant de 3,1 à 5,6 millions de dollars US, avec un prix de fonctionnement variant entre 1 et 1,4 cent (\$) par 500g de produit (Sadat, 2004).



Gamma Irradiator for food processing

Figure 7: Principe d'une unité de traitement des aliments aux rayons γ (Ferrandon, 2008)

e. Législation

Dans l'agroalimentaire, les irradiations sont limitées par la réglementation à des énergies de 5 MeV pour les rayons X et γ , et de 10 MeV pour des faisceaux d'électrons (Codex Alimentarius, 2003).

Les premières autorisations accordées par la FDA concernent le blé et la farine en 1963 (en vue d'éliminer les insectes) et les pommes de terre en 1964 (pour inhiber leur germination et prolonger leur durée de vie). En 1965, selon une étude de l'*US army*, il a été conclu que les aliments irradiés avec des doses allant jusqu'à 56 kGy étaient sans danger pour la santé. En 1980, le "*Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on Wholesomeness of irradiated food*" a conclu que les aliments irradiés étaient sans risque jusqu'à des doses de 10 kGy. La dose de 10kGy a donc ensuite été prise comme limite de traitement des aliments irradiés (Radomyski *et al.*, 1994). La plupart des études ayant mené à ces conclusions étaient basées sur des tests concernant des chiens, rats et souris nourris avec du poulet irradié. Cependant l'autorisation sur les doses utilisables varie selon les pays

En 1997, la FDA a approuvé l'irradiation de viande rouge et en Février 2000, le *food safety and inspection service* de l'USDA a permis l'utilisation des radiations ionisantes sur les produits réfrigérés ou congelés crus pour réduire le taux de pathogènes. Actuellement, dix

catégories de produits sont autorisées pour l'irradiation aux Etats-Unis, comme par exemple la volaille non cuite, le bœuf, l'agneau, le porc... (Satin, 2002). En Europe, la réglementation repose sur 2 textes principaux: La "directive cadre n°1999/2/CE du Parlement Européen et du Conseil relative au rapprochement des législations des états membres sur les denrées et ingrédients alimentaires traités par ionisation" du 22 Février 1999, à laquelle s'ajoute une "directive de mise en œuvre n°1999/3/CE du Parlement Européen et du Conseil établissant une liste communautaire de denrées et ingrédients alimentaires traités par ionisation" de même date. La législation permet uniquement l'irradiation d'herbes aromatiques, épices, légumes de saison, à des doses inférieures à 10 kGy. Trente huit pays dont la Belgique, le Bangladesh, la France ou encore la Chine, ont approuvé l'irradiation pour de nombreux produits (farine de blé, pommes de terre blanches, épices, légumes déshydratés, fraises, porc et volaille). Le Canada est un des principaux fabricants d'irradiateurs. L'irradiation y est utilisée depuis plus de 40 ans et environ 0.1 % des aliments sont irradiés. En 2001, on estimait à plus de 250 000 tonnes les aliments irradiés par année dans le monde (Fournier, 2003). Dans les dix pays européens possédant des irradiateurs en 2004, environ 15000 tonnes de produits ont été traitées. 3004 tonnes d'aliments ont été irradiés en France, ce qui place le pays en troisième position derrière la Belgique (6000 tonnes) et les Pays Bas (5000 tonnes) (Afssa, 2007).

f. Avantages de la technologie, limites, produits cibles

La décontamination par irradiation est très étudiée, et ce depuis plusieurs années. L'irradiation est une technique certainement aussi bien connue que le traitement thermique. Aucune augmentation de température n'est observée, ce qui classe ce traitement en procédé athermique (Farkas, 2007). Selon le produit, une forte dose d'irradiations (par exemple au dessus de 6.5 kG pour l'agneau) peut altérer le goût et la couleur des aliments, notamment de la viande (Farkas, 1998). Les polysaccharides comme la pectine peuvent être dégradés suite à de trop fortes doses d'irradiation, ce qui peut causer une perte de fermeté des fruits et donc une diminution de leur durée de vie (Min *et al.*, 1996). Nemptanu (2005) évoque le fait que le traitement par ionisation peut être un bon candidat pour la décontamination du café, car il n'engendre pas de modification des qualités organoleptiques. En revanche, les irradiations peuvent produire un certain nombre d'excitations, ionisations, ruptures des liaisons chimiques et radicaux libres dans le café, pouvant conduire à des modifications des propriétés rhéologiques causées par la dépolymérisation des constituants. Mais la présence des radicaux

libres induits par l'irradiation n'est sans doute pas une raison pour rejeter le traitement, car d'autres procédés (torréfaction des grains de café) peuvent également provoquer l'apparition de ces composés. De plus, dans le cas du café, l'analyse rhéologique et spectroscopique ne présente pas d'importante modification, même à 40 kGy, dose bien plus forte que la dose recommandée (10kGy) par le Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2003).

Même s'il a été démontré que les produits irradiés ne peuvent en aucun cas devenir radioactifs (car à aucun moment le produit ne rentre en contact avec la source radioactive), le traitement par irradiation est encore difficilement accepté par les consommateurs. Des ouvrages (Collectif contre l'irradiation des aliments, 2008), des sites internet ou encore des reportages audiovisuels appuient la mauvaise image de l'irradiation, et certains vont même jusqu'à remettre des pétitions contre l'irradiation des aliments au ministère de l'économie (22 décembre 2009) (Collectif contre l'irradiation des aliments, 2010). Les plus fervents réfractaires à l'irradiation parlent du manque d'information des consommateurs et de l'inefficacité de la réglementation Européenne. Ils affirment que les irradiations engendrent des mutations ou l'apparition de nouvelles molécules dans l'aliment, potentiellement génotoxiques, cytotoxiques ou cancérigènes. Certains se basent également sur une étude australienne, qui montre que les aliments irradiés seraient à l'origine de troubles neurologiques chez les chats. La population associe encore l'image de la catastrophe de Tchernobyl et affiche une certaine peur face à l'utilisation de ce type de technologie (Zyball, 1995).

De nombreuses études ont cependant noté que les arguments lancés contre l'irradiation étaient quasiment les mêmes que ceux utilisés 100 ans auparavant lors de l'introduction de la pasteurisation du lait pour prévenir les infections à streptocoques et la tuberculose bovine chez les enfants (Crawford & Ruff, 1996). La controverse sur les techniques de traitement touchant les aliments n'est certes pas un phénomène nouveau. On peut également se poser la question sur la sécurité des utilisateurs. Dans son article, Crawford (1996) regroupe de nombreuses données sur ce sujet et souligne que l'utilisation des irradiations en industrie alimentaire n'est pas plus risquée que dans le secteur médical. Il énonce que des procédures existent pour éviter les risques d'exposition aux irradiations, comme l'isolation des sources par d'épais murs, empêchant ainsi le moindre contact avec les individus. De plus, les sources de Cobalt 60 ne produisent pas de neutron, particules responsables de l'apparition de la radioactivité. Depuis les 25 dernières années, quelques accidents majeurs sont survenus, mais tous ont été causés par des personnes ayant délibérément négligé leur propre sécurité et

surtout les procédures de contrôles. Les radiations ionisantes vont avoir plusieurs utilisations en fonction de la dose utilisée (figure 8).

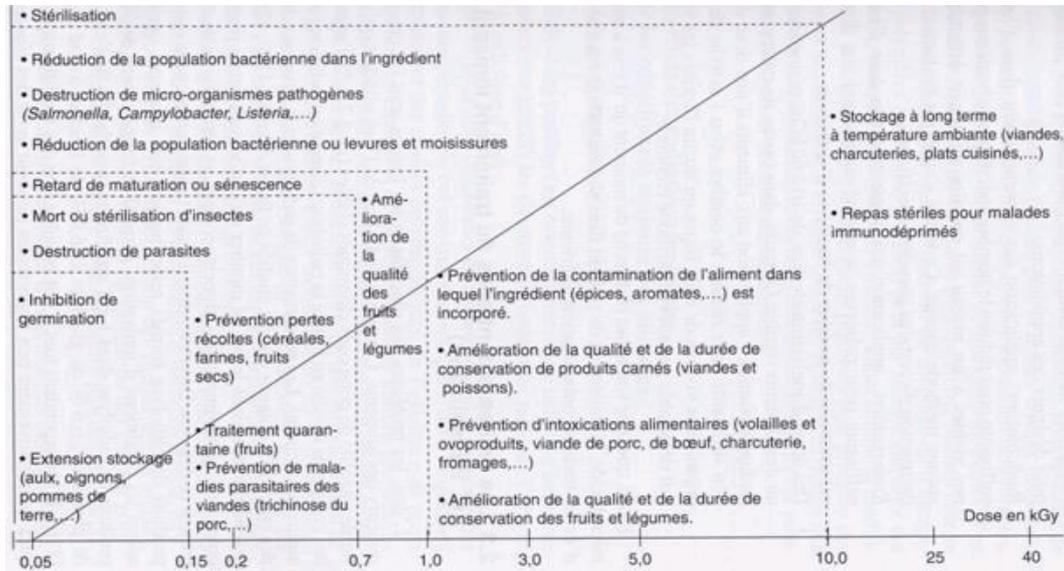


Figure 8: Effet des traitements ionisants en fonction de la dose appliquée (Federighi & Tholozan, 2001)

Des essais de décontamination utilisant les rayonnements ionisants ont été menés sur de nombreux produits tels que les viandes et volailles (Satin, 2002), les saucisses de bœuf (Badr, 2005), le soja (Kikuchi *et al.*, 2003), le blanc de poulet (Chun *et al.*, 2010), le thé (Thomas *et al.*, 2008), le café (Nemtanu *et al.*, 2005), les graines de luzerne (Thayer *et al.*, 2003)... Certains aliments tels que les volailles sont soumis à d'autres traitements efficaces comme la chloration ou l'application d'acide lactique, mais leur efficacité semble réduite comparée à l'irradiation. L'application de faisceaux d'électrons sur du riz cru n'est apparemment pas possible, en raison de l'oxydation des lipides et de la dégradation de l'amidon provoquées par le traitement (Sarrias *et al.*, 2003). Le choix d'utiliser l'irradiation se fait en fonction de l'efficacité et du prix de fonctionnement mais surtout de la législation du pays concerné, prenant en compte les doses maximales autorisées. (Farkas, 1998).

4) UV continu

a. Principe

Le traitement UV continu est une méthode athermique, non chimique et considérée comme non ionisante (Keklik *et al.*, 2009). L'émission UV est produite dans une lampe à vapeur de mercure. La lampe se compose d'une enceinte en quartz dans laquelle réside un mélange d'argon et de mercure. Deux types de lampes sont différenciés selon la pression dans l'enceinte. La pression est inférieure à 10 Torr pour les lampes dites basse pression et elle est supérieure à 100 Torr pour les lampes dites moyenne pression. Dans les deux cas, l'émission est produite lors de la désexcitation du mercure préalablement chauffé puis ionisé. Le spectre d'émission varie grandement avec la pression. Il est monochromatique à basse pression avec un pic principal d'émission à 254 nm (il existe un pic d'émission moins intense à 184 nm coupé par l'enveloppe). A moyenne pression, c'est un spectre de raies présentant plusieurs maxima (254, 365, 405, 436, 546, 578 nm). Le flux radiatif dépend grandement de la pression. Il est de l'ordre de 0,1 W/cm² pour les lampes basse pression et de trois ordres de grandeur supérieur pour les lampes moyenne pression. La puissance nécessaire à l'alimentation des lampes est de l'ordre de la centaine de Watts pour les lampes basse pression et de la dizaine de kilowatts pour les lampes moyenne pression.

Les deux types de lampes émettent des UV dans la région 200-280 nm du spectre. Cette région correspond communément aux UV-C. Il est à noter qu'il n'existe pas de consensus quant à la largeur exacte de cette région. Pour certains, elle recouvre les longueurs d'ondes comprises entre 200 et 280 nm (Yaun *et al.*, 2003), pour d'autres elle s'étend jusqu'à 290 nm (Coohill & Sagripanti, 2008). Les UV-C sont parfois nommé UV "germicides" (Farkas, 2007) car ils sont responsables de l'inactivation des virus et bactéries. Les longueurs d'onde les plus destructrices se situent entre 240 et 280 nm (Farkas, 2007). La grandeur caractérisant le flux lumineux reçu par les microorganismes est l'éclairement (en W/cm²). La dose tient compte de la durée d'exposition et est homogène à une fluence (J/cm²). Pour les liquides, le J/L est également utilisé (Keyser *et al.*, 2008). Les UV continu en tant que méthode de conservation ont une image positive vis-à-vis des consommateurs (Bintsis *et al.*, 2000). Les traitements sont déjà utilisés pour décontaminer l'eau, l'air et les surfaces (Koutchma, 2009). Ainsi, aux Etats-Unis, depuis les années 1930, les radiations UV à 254 nm sont utilisées pour réduire le nombre de bactéries dans l'air des blocs opératoires en milieu hospitalier.

b. Mécanismes d'inactivation

Les radiations UV ont un mécanisme d'action assez similaire aux irradiations: elles causent des ruptures au sein de la molécule d'ADN, ainsi que des dimères de pyrimidine (notamment de thymine, lésions les plus fréquemment retrouvées chez les cellules végétatives (Coohill & Sagripanti, 2009). Ces lésions bloquent la réplication et la transcription, compromettant les fonctions cellulaires et entraînant la mort de la cellule (Guerrero-Beltran & Barbosa-Canovas, 2004). Cet effet est corrélé à l'absorption des UV par les acides nucléiques, située entre 200 et 310 nm (Koutchma, 2009), avec un maximum à 260 nm.

Les systèmes de réparation de l'ADN (principalement le NER ou Nucleotide Excision Repair, figure 9) sont des éléments mis en place par les cellules pouvant contrer les effets du traitement UV. Dans le cas des cellules végétatives, des phénomènes de photoréactivation peuvent se produire et également conduire à la réparation des lésions causées sur l'ADN du microorganisme, lorsqu'il est exposé à la lumière du soleil après traitement. En effet, une enzyme de réparation de l'ADN, appelée ADN photolyase, peut réparer les dégâts causés par les radiations UV. Cette enzyme est activée par les photons issus de la lumière du jour (photons UV-A). Dans ce cas, l'effet du traitement UV peut être minimisé par l'incubation à la lumière.

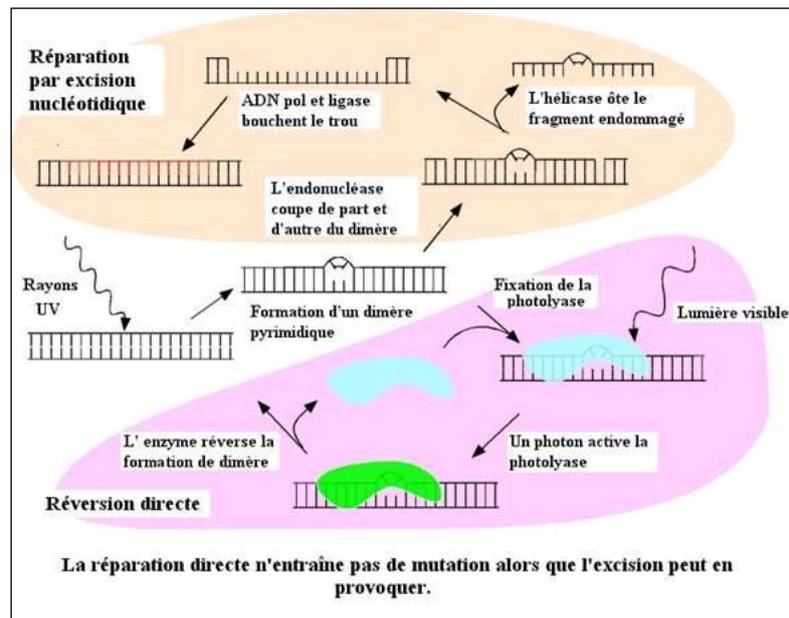


Figure 9: Action mutagène des UV (www.edu.upmc.fr)

Dans le cas des spores, les radiations UV génèrent principalement des dimères de 5-thyminyl-5,6-dihydrothymine, appelés "spore photoproduct" (Setlow, 2006), formés entre 2 thymines adjacentes sur le même brin d'ADN. Cette structure potentiellement létale a été découverte en 1970 (Setlow, 2001), et plus de 30% des groupements thymine des acides nucléiques sont capables de former ce spore photoproduct (SP). Les spores de plusieurs espèces du groupe *Bacillus* ont montré une résistance beaucoup plus élevée que celle des cellules végétatives des mêmes espèces, avec une DL₉₀ (dose nécessaire à l'élimination de 90% de la population) de 5 à 50 fois plus élevée. Plusieurs phénomènes permettent d'expliquer cette affirmation. La raison majeure de la formation de SP au lieu de dimères de thymine lors de l'irradiation UV des spores, est la forte teneur en SASP de type α/β (représentant entre 4 et 8% des protéines totales). De plus, la faible teneur en eau du cœur de la spore va provoquer une modification de la structure chimique de l'ADN. Ces 2 phénomènes vont favoriser la formation de SP au détriment des dimères de thymines (Setlow, 2001). Pourtant cela ne suffit pas à expliquer la plus forte résistance des spores, car le taux de formation de SP en fonction de la dose UV est similaire à la formation des dimères de thymine dans les cellules végétatives. Ce sont les systèmes de réparation de l'ADN mis en jeu qui permettent d'expliquer cette différence. En effet, un système de réparation efficace, spécifique de la spore (appelé système SP spécifique), est capable de monomériser le SP en 2 thymines, sans clivage du brin d'ADN, et ce, en l'absence de lumière, ce qui est donc distinct de la photoréactivation. Ces réparations sont possibles grâce à une enzyme spécifique, la SP-lyase, produite durant la sporulation et activée lors de la germination (Nicholson *et al.*, 2000). La formation des SP plutôt que des dimères de thymines serait à l'origine de la plus forte résistance des spores comparées aux cellules végétatives.

c. Efficacité microbiologique

Le traitement UV est décrit comme simple, respectueux de l'environnement, et permettant de détruire une large gamme de microorganismes dans l'eau (Bintsis *et al.*, 2000).

De manière générale, les bactéries à Gram⁻ sont plus facilement détruites que les Gram⁺, les spores (de bactéries et moisissures) sont plus résistantes que les cellules végétatives. Les virus sont également plus résistants aux UV que les cellules bactériennes. Farkas (2007) considère que la résistance aux UV dépend de la présence de pigments cellulaires et fait le lien entre les pigments noirs de certaines moisissures et leur forte résistance aux UV. En effet, la mélanine contenue dans les spores serait un composé photoprotecteur et augmenterait la

survie des spores fongiques en les protégeant des radiations UV (Begum *et al.*, 2009). Un traitement UV basse pression sur des spores d'*A. niger* en suspension dans l'eau a révélé une réduction d'environ 2 cycles logarithmiques avec 0,93 J/cm² (120 s de traitement), alors qu'une réduction de plus de 2 cycles logarithmiques est atteinte sur *Penicillium corylophilum* après seulement 60 s de traitement (0,46 J/cm²) (Begum *et al.*, 2009). La même étude a montré une réduction logarithmique de 3 unités sur *A. flavus* avec 0,93 J/cm² (120 s). Ces résultats ont caractérisé *A. niger* comme le microorganisme le plus résistant des trois.

Des spores de *B. subtilis* ont également été traitées en suspension liquide (Chang *et al.*, 1985) sur 0,5 cm d'épaisseur. Une réduction de 4 unités logarithmiques a été obtenue avec seulement 80 mW-sec/cm² (faisceau d'électrons collimaté). Les spores de *B. subtilis* ont montré une résistance nettement supérieure aux cellules végétatives, la dose UV nécessaire à l'élimination de 99,9% de la population étant 9 fois plus élevée dans le cas des spores comparé aux cellules végétatives. Dans le même ordre d'idée, il a été mis en évidence que les doses nécessaires à la première réduction logarithmique des spores de *B. anthracis* et *B. megaterium* sont également 5 à 10 fois plus élevées que pour les cellules végétatives correspondantes (Coohill & Sagripanti, 2008). Yaun *et al.* (2003) ont démontré une plus grande résistance de *Salmonella* traitée sur surface gélosée, par rapport à *E. coli* (Yaun *et al.*, 2003). En effet une réduction de 5 cycles logarithmiques est atteinte pour une dose supérieure à 8,4 mW/cm² dans le cas d'*E. coli*, alors qu'il faut plus de 14,5 mW/cm² pour réduire *Salmonella* de 5 unités logarithmiques. Des spores de *B. subtilis* purifiées d'extrait d'un sol de désert ont montré une résistance plus élevée que des spores de *B. subtilis* 168 produites en laboratoire sur milieu de sporulation et purifiées dans les mêmes conditions. Ainsi, la LD₉₀ est environ 2 fois plus élevée pour les spores issues du milieu sol (Nicholson & Law, 1999).

Nous voyons ainsi que nombreux facteurs d'influence ont été mis en évidence. Coohill et Sagripanti (2008) insistent sur le fait qu'un traitement doit être défini par:

- les microorganismes utilisés
- les conditions de culture
- les milieux
- la phase du cycle cellulaire
- la méthode de purification des spores
- la dose
- le type de source UV
- la méthode d'exposition

- le degré d'agrégation
- la présence possible des phénomènes de photoréactivation...

Nicholson et Galeano (2003), soulignent également que la méthode de préparation des spores, les conditions d'irradiation et la méthode de dosimétrie ont une forte influence sur l'efficacité du traitement UV. De nombreux paramètres influencent la destruction des microorganismes. Il est ainsi légitime de se demander si ces mêmes paramètres influencent la décontamination dans le cas de la technologie lumière pulsée. Une différence importante entre ces deux technologies réside en effet dans la manière d'apporter l'énergie UV : une faible quantité d'énergie accumulée pendant plusieurs secondes (UV continus) ou une importante quantité d'énergie délivrée en quelques centaines de microsecondes (UV pulsés).

Table 7: Décontaminations microbiologiques par UV continu

<i>Microorganisme cible</i>	Milieu de traitement	Intensité UV (254nm)		Réduction obtenue (log ₁₀)	Ref.
		μw/cm ²	mJ/cm ²		
<i>E. coli</i>	TSA (surface)	20		0.1	(Wong <i>et al.</i> , 1998)
		100		5	
		1000		6.2	
<i>S. senftenberg</i>	TSA (surface)	20		0.1	
		100		7.4	
		1000		7.8	
<i>B. megaterium (cellules)</i>	nc		5.6	1	(Coohill & Sagripanti, 2008)
<i>B. megaterium (spores)</i>	nc		29	1	
	nc		60	4	
<i>B. subtilis (cellules)</i>	nc		4-6	1	
<i>B. subtilis (spores)</i>	nc		26	1	
			60	4	
<i>E.coli</i>	nc		2-4	1	
			5-11	4	
<i>L .monocytogenes</i>	nc		5	1	
			9.6	4	
<i>B. anthracis (spores)</i>	nc		27.5	1	
			62	4	
<i>B. anthracis Sterne (spores)</i>	Suspension		23	1	(Rose & O'Connell, 2009)
			40	2	
<i>B. subtilis ATCC6633 (spores)</i>	suspension		1.3	1	(Nicholson & Galeano, 2003)
<i>B. anthracis Sterne (spores)</i>	Suspension		1.4	1	
<i>A.niger</i>	Surface agar		928.8	2.5	(Begum <i>et al.</i> , 2009)

d. Equipements industriels

Les sources d'UV généralement utilisées sont des lampes à vapeur de mercure basse pression (10^2 à 10^3 Pa), basse pression à haut rendement, ou moyenne pression (10^4 à 10^6 Pa). Le mercure (accompagné d'un gaz inerte comme l'argon) est enfermé dans un tube en silice scellé aux deux extrémités, et connecté à des électrodes. L'émission des lampes moyennes pression est polychromatique (250 à 600 nm), avec des énergies émises de 5 à 30 W/cm, contrairement aux lampes basse pression qui sont monochromatiques, et dont l'énergie émise se situe plus aux alentours des 0.5 W/cm (Koutchma, 2009). Selon Keyser et al. (2008), les équipements sont peu chers, il y a peu de maintenance et un faible coût de fonctionnement (Keyser *et al.*, 2008).

e. Législation

En ce qui concerne la réglementation Européenne, il ne semble pas que de tels documents existent à l'heure actuelle sur l'utilisation des UV en industrie agroalimentaire. En revanche,

bien qu'il n'y ait pas de restriction précise sur l'utilisation du mercure, l'Union Européenne cherche à en réduire l'utilisation (Commission des communautés Européennes, 2008; Journal officiel de l'Union Européenne, 2010)

Aux Etats-Unis, la FDA a approuvé les UV continus comme traitement alternatif à la pasteurisation de jus de fruits frais (U.S. FDA, 2000) : en 2000, elle a modifié les réglementations sur les additifs pour permettre l'utilisation des UV visant à réduire la quantité de pathogènes de l'homme et autres microorganismes dans les jus (en effet, les UV sont considérés comme additifs dans le cas des traitements alimentaires (Koutchma, 2009)). La FDA n'a pas spécifié de dose minimum ou maximum, mais a énoncé que l'utilisation des UV devait respecter les bonnes pratiques de fabrication, et que la dose maximale utilisée pour les jus devait être autolimitée économiquement, par les coûts de fonctionnement des UV (Koutchma, 2009). De plus, les doses maximales utilisées pour les jus doivent être limitées par les altérations possibles des caractéristiques organoleptiques du jus (modifications de couleur, de goût), ce qui pourrait mener à une diminution de la consommation.

f. Avantages de la technologie, limites, produits cibles

Keyser et al. (2008) affirment qu'aucun composé ni sous produit toxique connus ne sont formés à cause des UV, que le traitement de l'eau n'a entraîné aucune apparition de mauvais goût ou odeur, qu'il n'y a pas de changement de couleur du jus de pomme traité, et que le traitement nécessite peu d'énergie comparé à la pasteurisation (Keyser *et al.*, 2008). Le traitement UV est aussi utile pour traiter des matériaux qui ne résistent pas à l'autoclave (Guerrero-Beltran & Barbosa-Canovas, 2004). Mai Thu Thi et Farid (2004) mettent en évidence que la perte en vitamine c dans le jus d'orange augmente avec la dose UV-C, mais ne démontrent aucune différence avec les traitements thermiques (Mai Thu Thi & Farid, 2004). De plus, un traitement UV appliqué au jus d'orange n'a montré aucune modification de couleur ni de pH du produit.

Les UV présentent une très faible capacité de pénétration, il s'agit donc le plus souvent d'un traitement de surface sauf pour les produits transparents aux UV. En effet, 90% des UV sont absorbés sur 1mm de jus de fruit et la faible pénétration est d'autant plus accentuée que le liquide est opaque (Guerrero-Beltran & Barbosa-Canovas, 2004).

Le facteur limitant le plus évident de ce traitement est sans aucun doute l'effet d'écran. La faible pénétration des UV permet uniquement une application en surface, et le traitement sera inefficace sur des microorganismes disposés en amas ou biofilms, ou protégés par de la

matière organique (Coohill & Sagripanti, 2008). Le traitement par émissions continues d'UV est certes un traitement respectueux de l'environnement, car aucun composé chimique n'est utilisé et aucune source radioactive n'est nécessaire. En revanche, le mercure contenu dans les lampes pose des problèmes environnementaux lors de leur élimination. C'est pour cela que l'Europe s'est engagé à limiter l'utilisation de mercure dans les appareils électriques et électroniques à partir du 31 décembre 2011 (Journal officiel de l'Union Européenne, 2010).

Les applications les plus courantes sont la désinfection de l'air, des surfaces, des emballages (boîtes, bouchons, bouteilles, cartons, tubes, films, opercules...) et de l'eau. Les liquides transparents seront des cibles plus faciles que les liquides opaques, grâce à une pénétration des UV sur une épaisseur plus importante. Cependant, les liquides clairs peuvent eux-mêmes poser certains problèmes, du fait de la présence de particules de petite taille, mais plus grosses que les microorganismes et provoquant encore une fois des effets d'écran. L'application des UV montre une efficacité significative uniquement sur des œufs dits "propres", c'est à dire non recouverts de résidus de terre, plumes, ou fientes qui font écran et empêchent le rayonnement d'atteindre la surface de la coquille (De Reu *et al.*, 2005). Il a également été confirmé que les radiations UV sont incapables de traverser la coquille, et donc qu'aucune réduction de la contamination interne de l'œuf n'est possible.

Le traitement UV continu est applicable à l'industrie agroalimentaire dans le cas :

- des décontaminations de surfaces d'aliments et d'emballages, ou de liquides traités sur de très faibles épaisseurs.
- où il est possible d'appliquer des durées d'exposition de plusieurs secondes.

Le traitement aux UV reste une alternative peu séduisante pour résoudre des problèmes de forte contamination, entraînant une répartition des microorganismes en amas, et diminuant ainsi la probabilité de chaque germe d'être directement soumis aux UV.

4. La lumière pulsée:

1) Principe

Les premiers travaux de désinfection (Japon) datent de la fin des années 70 (Wekhof, 2000), et le premier brevet de 1984 (Hiramoto, 1984). La lumière pulsée se définit par des impulsions ou flashes de lumière produits par une lampe à arc au xénon. Le spectre

d'émission de la lampe couvre le domaine en longueurs d'ondes s'étendant entre 200 et 1300 nm. La durée des flashes varie entre la microseconde et la milliseconde. L'énergie nécessaire à l'allumage de l'arc est accumulée dans un condensateur puis déchargée dans la lampe. La décharge est possible à la condition que le gaz soit préionisé. La préionisation est obtenue grâce à un signal dit trigger (haute tension et faible courant). Elle permet d'initier l'avalanche électronique nécessaire pour rendre le gaz conducteur (phénomène de claquage). L'énergie électrique accumulée dans le condensateur est libérée dans le canal conducteur. Les atomes de xénon sont excités et ionisés lors du passage du courant (plusieurs centaines d'ampères). Le phénomène de passage à l'arc permet de libérer toute l'énergie électrique stockée. La décharge se coupe ensuite. Le retour à l'état fondamental des atomes de xénon se fait par l'émission de photons dont la longueur d'onde varie entre l'UV et l'infrarouge. Le spectre produit dépend des paramètres électriques du circuit de décharge. Comme pour les lampes utilisées dans le cas des UV continus, l'enceinte dans laquelle se trouve le gaz est en quartz. La dose reçue par le produit est généralement décrite par la fluence (J/cm^2), représentant l'énergie reçue par unité de surface de la cible (unité également utilisée dans le cas des traitements par UV continus). Mais le traitement est caractérisé par d'autres paramètres physiques :

- la tension appliquée aux bornes des lampes (V) qui en plus d'avoir une influence sur la fluence (plus la tension est élevée, plus la fluence du flash est élevée) détermine la qualité du spectre émis (% d'UV)
- l'éclairement crête (W/cm^2) représente la puissance maximum sur $1cm^2$ de la surface pendant la durée d'un flash
- la fluence (J/cm^2), qui représente l'énergie accumulée sur $1cm^2$ de la surface pendant la durée du traitement (un ou plusieurs flashes)
- le nombre de flashes émis.

2) Mécanismes d'inactivation

Deux types de mécanismes sont décrits dans la littérature pour expliquer l'inactivation due à la LP :

- l'action photochimique des longueurs d'onde UV
- l'action photothermique du spectre entier.

L'action photochimique, mécanisme d'action également retrouvé dans le cas du traitement UV continu (*cf.* 4.b), aurait un effet direct sur la molécule d'ADN. En effet, les UV-C (200-280 nm) provoqueraient la formation de dimères de pyrimidine (en particulier de thymine), inhibant la formation de nouveaux brins d'ADN dans le processus de réplication et entraînant la mort du microorganisme (Gomez-Lopez *et al.*, 2007). Cet effet germicide des UV serait aussi responsable de la destruction de spores bactériennes par formation de "spore photoproduct" ou 5-thyminyl-5.6-dihydrothymine, ainsi que de ruptures simple et double brin, et de dimères de cyclobutane-pyrimidine (Slieman & Nicholson, 2000). De nombreuses études définissent l'absorption des UV comme la cause majeure d'inactivation des microorganismes par lumière pulsée, signifiant dans ce cas que l'unique différence de cette technologie par rapport à une émission continue d'UV serait la réduction du temps de traitement.

Un deuxième mécanisme est parfois décrit comme intervenant dans l'efficacité germicide de la lumière pulsée: le mécanisme photothermique. Wekhof (2000), énonce qu'avec une fluence supérieure à 0.5 J/cm², la désinfection est provoquée par rupture des membranes, du fait de la brève mais intense élévation de température au niveau du microorganisme. Des résultats obtenus par MEB montrent que des spores d'*A. niger* traitées par lumière pulsée (figure 10) présentent des sévères déformations (Wekhof *et al.*, 2001). Il est à noter que, dans cette référence, la fluence appliquée aux spores est supérieure à 6 J/cm². Dans le cas de spores de *B. subtilis* et pour les mêmes conditions expérimentales de telles déformations ne sont cependant pas observées (Wekhof *et al.*, 2001).

L'origine photochimique et/ou photothermique de l'efficacité de la lumière pulsée est un sujet encore à l'étude. Certains s'accordent à soutenir que les deux effets peuvent intervenir, et que l'influence relative de l'un ou l'autre varie en fonction du microorganisme et de la fluence. Wuytack et al. (2003) évoquent des dommages causés sur l'ADN comme la raison majeure de l'inactivation de *Salmonella*. Les dommages causés aux membranes n'auraient qu'un rôle mineur dans le processus.

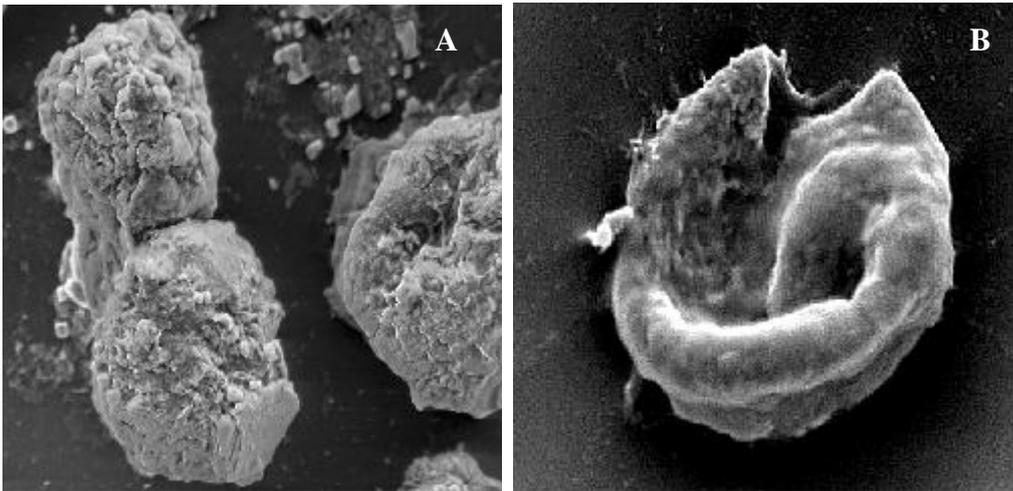


Figure 10: Microscopie électronique à balayage (x10 000) de spores d'*A. niger* A) non traitées B) Traitée avec 2 flashes à 33 kW/cm² (Wekhof *et al.*, 2001).

3) Efficacité microbiologique

Les spores de moisissures semblent être plus résistantes que les bactéries à Gram⁺, elles-mêmes plus résistantes que les Gram⁻ (Rowan *et al.*, 1999). Pourtant, après l'étude de 27 souches différentes (bactéries, moisissures et levures), Gomez-Lopez n'a mis en évidence aucun principe général concernant la sensibilité entre les différents groupes de microorganismes (Gomez-Lopez *et al.*, 2005b). La table 8 regroupe quelques résultats démontrant l'efficacité microbiologique de la lumière pulsée sur différents microorganismes.

Table 8: Décontaminations microbiologiques par lumière pulsée

<i>Microorganisme cible</i>	Milieu de traitement	Nombre de flashes	Fluence (J/cm ²)	Distance lampe/cible (cm)	Epaisseur du produit	Réduction (log10) maximale	Référence.
<i>L. innocua</i>	Surfaces métalliques	1 à 12	1.27	5.08	/	3.5	(Woodling & Moraru, 2005)
<i>E. coli</i> O157:H7 <i>L. monocytogenes</i>	Filets de saumon	45 à 180	5.6	3-5-8		1.1 1,0	(Ozer & Demirci, 2006)
<i>E. coli</i>	Suspension aqueuse	45-90-135				0.4 log par mJ/cm ²	(Wang <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. coli</i> O157:H7	Graines de luzerne	15 à 270	5.6	3 à 13	1.02 à 6.25	4.8 (totale)	(Sharma & Demirci, 2003)
<i>L. monocytogenes</i> <i>P. phosphoreum</i> <i>C. lambica</i>	légumes	50 à 2700		8,4-12.8		1.7	(Gomez-Lopez <i>et al.</i> , 2005a)
<i>S. aureus</i>	Suspension surface gélosé	3 à 90	5.6	8	/	7.5 8.5	(Krishnamurthy <i>et al.</i> , 2004)
<i>A. niger</i>	maïs	60 à 300	5.6	3-13		4.9	(Jun <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. sporogenes</i>	miel	15 à 540	5.6	8 à 20	2 à 8	5.7	(Hillegas. & Demirci, 2003)
<i>L. monocytogenes</i>	Surface gélose	50		6 et 13		3.6	(Gomez-Lopez <i>et al.</i> , 2005b)
<i>L. innocua</i>	Coupons métal	1 à 12	0 à 12	5,08		5.3	(Woodling & Moraru, 2005)
<i>S. cerevisiae</i>	Suspension	1 à 5	0.23 et 0.7			5.0	(Takeshita <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i>	Suspension	0 à 512		4.5		7.0 6.0	(MacGregor <i>et al.</i> , 1998)
<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. cerevisiae</i>	Surface gélosée	100 à 300				6.0	(Rowan <i>et al.</i> , 1999)

Cependant cela regroupe des résultats obtenus pour des conditions expérimentales différentes. La question de l'influence de chaque facteur se pose donc comme un préalable à la lecture d'une telle table. Parmi ces facteurs nous pouvons différencier les facteurs liés au système d'éclairage (lampe et réflecteur) de ceux liés à la cible (microorganisme et support) :

Facteurs liés au système d'éclairage :

- la fluence reçue au niveau du microorganisme
- la tension appliquée aux bornes des lampes
- le type et la forme des réflecteurs qui déterminent les angles d'incidence du rayonnement sur la surface.

Facteurs liés à la cible :

- le microorganisme cible

- la nature et la rugosité de la surface traitée
- la densité de population dans le cas des traitements de volumes de liquide
- la composition des aliments
- l'épaisseur de la cible.

➤ Influence des facteurs liés au système d'éclairage étudiés dans la littérature

Comme dans chacun des traitements, il est nécessaire de définir une grandeur permettant de caractériser la dose décontaminante. La littérature a retenu **la fluence** comme dose caractéristique pour la technologie lumière pulsée. La fluence est l'éclairement énergétique d'une surface, c'est-à-dire le flux incident par unité de surface intégré temporellement. Cette grandeur caractérise le flux sur une surface quelles que soient les conditions d'éclairage : la source peut-être collimatée, diaphragmée, hémisphérique... Donc cette grandeur ne caractérise pas une source. Il ne faut pas confondre la fluence avec les grandeurs liées à la source que sont la luminance ou l'excitance (W/cm^2). Pour manier correctement cette grandeur quelques précautions sont nécessaires.

Les travaux décrivant l'effet des radiations lumineuses montrent que certaines longueurs d'ondes (UV par exemple) ont une efficacité décontaminante plus élevée que d'autres. Le spectre émis par une lampe flash au xénon est :

- continu : le spectre est continu en longueurs d'ondes, contrairement aux lampes à vapeur de mercure moyenne pression, qui émettent un spectre de raies présentant des maxima d'intensité pour certaines longueurs d'ondes.
- large : l'émission s'étend sur un large domaine en longueur d'onde (200-1300nm).

Ainsi la fluence peut exprimer une valeur intégrée sur tout le spectre ou au contraire une valeur intégrée sur un domaine réduit en longueur d'onde (par exemple le domaine 200-400 nm pour les UV seuls). Il est donc important de connaître le domaine en longueur d'onde pour lequel est exprimée la fluence. La fluence est une valeur intégrée dans le temps. Ainsi, elle peut être grande car :

- la fluence produite par un flash est grande (influence de l'éclairement crête)
- la fluence de plusieurs flashes est additionnée (influence du nombre de flashes).

La LP est un traitement lumineux, tout comme le traitement par émission continue d'UV. Mais ces deux dernières caractéristiques sont spécifiques à la LP, et il est nécessaire d'étudier leur rôle.

La tension appliquée aux bornes de la lampe est la tension de charge des condensateurs. Elle influence ainsi :

- l'intensité émise par la lampe sur tout le spectre
- l'intensité relative émise pour chaque longueur d'onde du spectre (composition du spectre lumineux).

Si les UV ont un rôle fondamental pour la décontamination, la proportion relative des UV du spectre est un facteur déterminant pour l'évaluation de la décontamination. Dans un article concernant la désinfection des fruits par lumière pulsée, Lagunas-Solar et al. (2006) soulignent le fait que les UV continus, de par leur faible intensité, causent des dommages réparables par rapport à l'énergie apportée par UV pulsés. Wekhof (2000) évoque également le fait que certains microorganismes, habituellement résistants aux UV (*Cryptosporidium*, *A.niger*, spores de *B.subtilis*) sont inactivés par lumière pulsée (Wekhof, 2000).

Etudier la dose UV émise par les lampes délivrant la lumière pulsée nécessite ainsi de connaître plusieurs paramètres. Réduire l'efficacité de la LP par seule action de la dose d'UV, souvent décrite comme la fraction la plus efficace (Woodling & Moraru, 2007) ne semble pas suffisant. L'éclairement crête du flash semble être un élément non négligeable (Luksiene *et al.*, 2007). On peut également se poser la question de l'influence de la répartition de la dose sur les microorganismes. En effet, qu'en est-il d'une même fluence totale appliquée en un ou plusieurs flashes? Dans la littérature il existe des différences importantes : le nombre de flashes peut aller de 1 (Woodling & Moraru, 2005) à plus de 2000 dans certains cas (Gomez-Lopez *et al.*, 2005a). L'impact de chaque paramètre physique qualifiant la dose n'est pas forcément disponible. Certains travaux qualifient la dose par l'intensité (fixe) du flash émis par la lampe, ainsi que la distance lampe-échantillon (variable). Le nombre de flashes est parfois exprimé par la fréquence et le temps de traitement (Krishnamurthy *et al.*, 2004), parfois directement. Les divers équipements expliquent sans doute cette variabilité. De plus, la tension appliquée aux bornes des lampes n'est pas nécessairement indiquée (Uesugi *et al.*, 2007).

➤ Influence des facteurs liés à la cible étudiés dans la littérature

Des données de décontamination sont disponibles pour de nombreuses espèces microbiennes :

- des bactéries (*B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *E.coli*, *S. aureus*...)
- des levures (*S. cerevisiae*, *C. albicans*...)
- des moisissures (*A. niger*, *B. cinerea*...)

- des virus (*poliovirus, rotavirus...*).

Ces données concernent des cellules végétatives et des spores de bactéries. Pourtant, comme dans le cas des hautes pressions, les informations systématiques sur la résistance microbienne sont limitées par la diversité des équipements utilisés. Ainsi, seule la sensibilité des différents microorganismes au sein d'une même étude peut être comparée.

Bien que la mise en parallèle des résultats ne soit pas encore réalisable, du fait du manque de recul sur l'expression de la dose de LP, certains résultats concernant l'importance de paramètres environnementaux ou physiologiques sont disponibles. Les facteurs environnementaux importants sont sans aucun doute l'épaisseur de la cible et les irrégularités des surfaces. Krishnamurthy et al. (2004), démontrent une meilleure efficacité de la LP pour les traitements de surface comparés aux suspensions, du fait de la faible capacité de pénétration des UV pulsés (Krishnamurthy *et al.*, 2004). Woodling et Moraru (2005) ont testé l'influence de différentes surfaces sèches sur l'efficacité décontaminante de la lumière pulsée (Woodling & Moraru, 2005) : la rugosité va influencer la décontamination, notamment par effet d'écran dû aux irrégularités. Mais la topographie ne suffit pas à expliquer les différences obtenues. En effet, les surfaces lisses peuvent parfois être plus difficilement décontaminées que certaines plus irrégulières. Plusieurs hypothèses évoquent la répartition de l'inoculum, avec des spots plus difficiles à étaler sur surface lisse, difficulté accrue en cas d'hydrophobicité de la surface, mais aussi les propriétés réfléchissantes, qui semblent évacuer la lumière plus vite que les surfaces rugueuses, et empêcher l'absorption par les microorganismes.

Wekhof et al. (2000), relie également l'effet photothermique au milieu environnant. Selon eux, l'échauffement des bactéries lors du flash dépendrait fortement du milieu environnant, du fait des transferts de chaleur plus rapides dans l'eau que dans l'air, et donc du refroidissement instantané plus efficace dans les milieux humides. Dans certains cas, lorsque le refroidissement n'est pas suffisant, la température des bactéries peut monter jusqu'à plus de 100°C. Ils démontrent ceci en traitant des spores d'*A. niger* étalées sur une surface PET. La présence de cratères autour des spores de moisissures montre un échauffement microscopique supérieur à 120°C (correspondant à la température de fusion du PET) (Wekhof *et al.*, 2001). De plus, Fine et Gervais (2004) ont testé la lumière pulsée sur de la farine et du poivre noir en poudre et ont constaté une modification de la couleur des poudres (par colorimétrie), avant même d'atteindre une décontamination totale. Ce changement de couleur se produit plus rapidement dans le cas du poivre noir que de la farine, et pourrait s'expliquer par une

augmentation de température combinée à des phénomènes d'oxydation (Fine & Gervais, 2004).

De nombreuses surfaces alimentaires ont aussi fait l'objet de tests. La composition de la matrice, outre sa teneur en eau, est un facteur d'influence retrouvé dans tous les traitements de décontamination. Il est donc important d'avoir pour chaque microorganisme testé, l'influence de l'aliment ou du support ciblé.

Même si l'effet des UV-C sur l'ADN ne semble pas être le seul mécanisme d'action de la lumière (Gomez-Lopez et al., 2007), il reste quand même très important, et les mécanismes de photoréactivation mis en place par les microorganismes (Cleaver, 2003) pourront, comme dans le cas des UV continus, permettre une réparation des dommages au sein des cellules. Gomez-Lopez et al.(2005) parlent justement de l'effet photochimique des UV qui peut être réversible par une illumination après flash, avec de la lumière visible (Gomez-Lopez *et al.*, 2005b). Ainsi, ils mettent en évidence des différences significatives de l'efficacité du traitement LP lorsque les échantillons traités sont incubés dans le noir immédiatement après flash, par rapport à ceux laissés 4h à la lumière du jour.

4) Equipements industriels

Les équipements de lumière pulsée varient d'un équipementier à l'autre, mais le système reste le même. L'énergie électrique est stockée dans un condensateur. Un signal va déclencher la décharge de l'énergie électrique sur une ou plusieurs lampes à xénon. Les lampes sont le plus souvent équipées de systèmes de refroidissement par eau et sont protégées par des tubes en quartz. Les lampes sont équipées de réflecteurs (en aluminium poli) de formes différentes selon la géométrie du produit à traiter. Le design des réflecteurs est un élément clé, responsable de la focalisation des rayons lumineux sur la cible. Ainsi, les équipements vont être différents (nombre de lampes, forme des réflecteurs), selon le produit traité. Le traitement par lumière pulsée peut être discontinu ou bien continu avec des cavités adaptées aux lignes de production.

Cavité optique (inox)
Dimensions: H: 600mm, L: 300mm, P: 600mm
Indice de protection: IP 65
Poids: 12 kg

Baie électronique (acier peint)
Dimensions: H: 1200mm, L: 600mm, P: 600mm
Indice de protection: IP 20
Poids: 150 kg

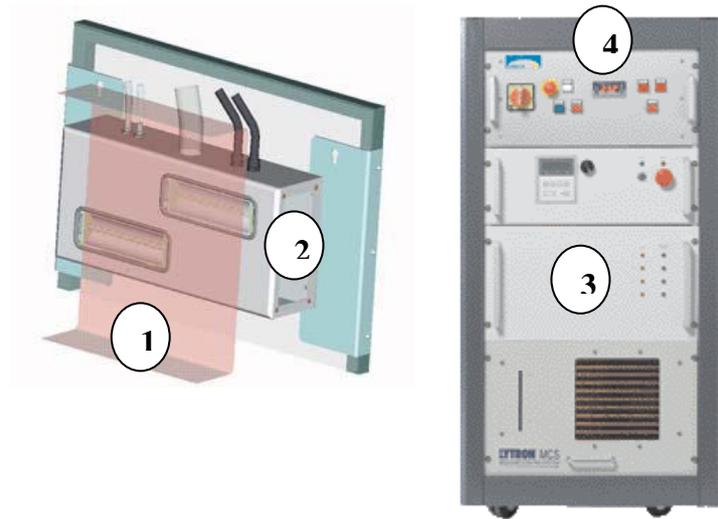


Figure 11: Schéma d'un équipement de lumière pulsée CLARANOR (traitement industriel de films et laizes de thermoformage). 1- produit traité (film) 2- cavité optique (lampes et réflecteur) 3- Baie électronique générant les impulsions de haute puissance 4- Tiroir de commande destiné à synchroniser le traitement à la vitesse de la ligne

Le prix des équipements varie en fonction de la complexité de la machine et surtout du nombre de lampes nécessaires. L'avantage de la technologie est également en termes de coût de fonctionnement. En effet, la consommation d'électricité est faible et les opérations de maintenance se limitent le plus souvent au changement des lampes usagées. L'encombrement des machines est limité, avec une adaptation très simple sur les lignes de production, nécessitant le plus souvent une cavité de quelques dizaines de centimètres de large.

5) Législation

Aux Etats-Unis, la FDA a approuvé l'utilisation de la lumière pulsée comme traitement de décontamination des aliments (U.S. FDA., 2005) avec les conditions suivantes:

- La lumière est émise par des lampes à xénon, avec des longueurs d'onde allant de 200 à 1300 nm, et une durée du flash n'excédant pas 2 millisecondes
- Le traitement est utilisé pour l'élimination des microorganismes de surface
- Les aliments doivent recevoir la dose minimale nécessaire à la décontamination

- La dose totale reçue ne doit pas excéder 12 J/cm².

En Europe, cette technologie est soumise à la législation "Novel Food" (Novel Food, 1997). L'AFSSA a publié en 2009 (Afssa, 2009) un avis concernant l'utilisation de la lumière pulsée comme procédé de décontamination microbiologique de surface des produits de panification. Elle en conclut, aux vues des évaluations précédentes (démontrant l'efficacité microbiologique du procédé et à l'équivalence substantielle en lipides et vitamines dans les produits finis), que les produits de panification issus d'un traitement de 3 J/cm² ne présentent pas de risques sanitaires pour le consommateur.

Il est à noter que l'évaluation des nouvelles technologies physiques est soumise en France à l'évaluation de l'AFSSA qui repose sur 6 points:

- l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne (résistance, persistance de toxines, sporulation...)
- l'étude de la composition chimique et nutritionnelle de l'aliment traité
- l'étude de l'apparition de métabolites ou substances indésirables
- l'absence d'altération de l'emballage, de migration ou de produits néoformés si nécessaire
- les risques liés à l'exposition du consommateur au "nouveau produit"
- le bilan des expériences antérieures d'utilisation.

(Conseil National de l'Alimentation, 2009)

6) Avantages de la technologie, limites, produits cibles

Le traitement LP, du fait de la durée des flashes (200 µs), est un traitement rapide (souvent quelques secondes) (Wang *et al.*, 2005). Travailler avec de la lumière (comme le traitement UV continu), ne nécessite l'utilisation d'aucun produit chimique. Il n'y a donc aucun composé résiduel à éliminer. De plus, les lampes, contrairement aux lampes utilisées pour l'émission continue d'UV, ne contiennent pas de mercure. Lors des traitements impliquant un grand nombre de flashes, un échauffement de la cible peut se produire. Il est également possible qu'un dégagement d'ozone ait lieu (Gomez-Lopez *et al.*, 2007). Les sources lumineuses (UV comme lumière pulsée) restent sensibles aux effets d'écran. Tout élément pouvant ainsi s'interposer entre le rayon lumineux et le microorganisme, le protégera de la destruction. Il sera donc impossible d'utiliser la lumière pulsée sur de grandes épaisseurs. Les traitements de surfaces seront à l'inverse tout à fait accessibles à la technologie. Les surfaces plus irrégulières au niveau microscopique seront en règle générale plus difficiles à

traiter. Les traitements plus invasifs, sur des suspensions liquides par exemple, ne pourront se réaliser que sur des liquides clairs et sur de faibles épaisseurs. Ces phénomènes expliquent que la totalité de la zone à traiter doit être exposée à l'illumination et que les phénomènes optiques jouent un rôle important dans la caractérisation du traitement et la conception des machines. Le traitement de plusieurs épaisseurs de miel révèlent une corrélation négative entre l'épaisseur traitée et l'efficacité germicide (Hillegas. & Demirci, 2003). Même si le traitement par LP est adapté à la décontamination de surfaces, il reste dépendant des caractéristiques physiques et de la topographie de la cible, (Woodling & Moraru, 2005). Outre le fait de sa topographie, la composition de la cible peut se révéler problématique. Les aliments riches en protéines et acides gras ne sont pas de bons candidats pour le traitement, car les protéines et l'huile, ajoutées au milieu de culture des microorganismes, diminuent l'efficacité de la lumière pulsée. En revanche, les fruits ou les légumes seront des cibles adéquates, du fait de leur composition (Gomez-Lopez *et al.*, 2005a). Cependant l'altération de certaines propriétés physiologiques des aliments (et notamment des légumes) peut être provoquée par la LP tout autant que par les UV continus (Gomez-Lopez *et al.*, 2007).

7) L'étude approfondie de la lumière pulsée présente-t-elle un réel intérêt par rapport aux autres techniques physiques de décontamination?

La lumière pulsée est un traitement qui nécessite la transmission de la lumière UV. L'illumination de la totalité de la zone à traiter est nécessaire à son efficacité. Un système de réflexion, parfois complexe, peut être mis au point pour optimiser l'illumination de chaque cible. S'il reste des zones d'ombre, la décontamination pourra être fortement réduite. La lumière pulsée est adaptée au traitement en surface. Contrairement au traitement thermique, aux hautes pressions ou encore à l'irradiation, la lumière pulsée ne peut convenir au traitement de produits opaques aux UV. Cependant, il est possible de décontaminer aux travers de solides transmettant une grande proportion des UV (PET) ou de solides transmettant partiellement les UV si l'épaisseur est de quelques centaines de micromètres. On peut traiter les liquides pour lesquels le coefficient d'absorption dans l'UV et le débit du liquide sont adaptés. La lumière pulsée entre dans les nouvelles perspectives concernant le traitement des aliments. En effet, les technologies athermiques et propres sont un sujet de développement très prometteur et donc très étudié. Le fait d'éliminer totalement l'utilisation de produits chimiques est un avantage à la fois économique et environnemental. L'absence

d'échauffement des aliments préserve les qualités organoleptiques et nutritionnelles, sujet fondamental à l'heure actuelle. La technologie, probablement moins coûteuse à mettre en place industriellement que l'irradiation, transmet aussi une image beaucoup moins négative auprès des consommateurs, la lumière n'étant pas un procédé émettant ou utilisant de la radioactivité. Les temps de traitement sont généralement très courts (Rajkovic *et al.*, 2010b; Turtoi & Nicolau, 2007), ce qui est un avantage certain pour l'installation sur les chaînes de production. La possibilité d'appliquer des traitements par LP en mode continu est également un atout par rapport à d'autres traitements appliqués préférentiellement de manière discontinue (en batch ou semi batch par exemple), ou nécessitant de faibles volumes. En comparaison aux autres traitements cités, la lumière pulsée permet une décontamination efficace sans qu'il soit nécessaire de coupler le procédé avec un traitement thermique, même faible.

Le recensement d'articles scientifiques publiés dans IJFM, AEM, JAM, FM et JFP considérant les traitements thermique ("heat"), la lumière pulsée ("pulsed light"), les champs électriques pulsés ("pulsed electric field"), les hautes pressions ("high pressure) les UV continus ("UV or uv or ultraviolet") et les irradiations ("irradiations or γ rays or X rays or electron beam") a été effectué. Il fait état de la quantité d'articles disponibles sur chacune des technologies présentées ici, et leur évolution depuis 1980 (figure 12). Comparée au traitement thermique, la lumière pulsée est beaucoup moins représentée en termes de quantité de données. Le nombre d'articles consacrés à la lumière pulsée représente moins de 2% du nombre total d'articles recensés sur les dix dernières années dans les 5 journaux ciblés.

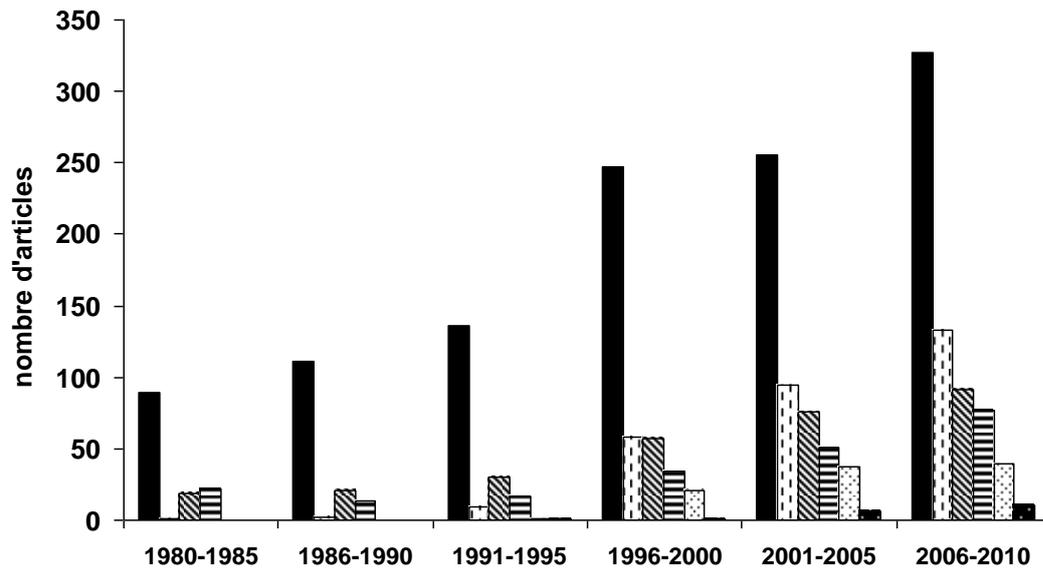


Figure 12: recensement bibliographique concernant le nombre d'articles disponibles sur les 6 différents traitements, selon 5 journaux scientifiques (JAM, IJFM, AEM, JFP, FM), depuis 1980. (Source WOK). ■ Traitements thermiques, □ Hautes Pressions, ▨ irradiations, ▤ UV continuus, ▧ Champs électriques pulsés, ▩ Lumière pulsée

Présentation du travail de thèse

1. Objectifs scientifiques et technologiques

Les domaines d'application des techniques de décontamination des aliments sont déterminés par de multiples études expérimentales qui permettent de dégager les grands principes conditionnant leur efficacité et les aliments qui peuvent être traités avec profit pour l'industrie et pour les consommateurs. A ce titre certains procédés bénéficient d'un historique riche et d'applications validées par l'expérience de plusieurs dizaines d'années sur des volumes d'aliments plus que significatifs. Par contraste, la lumière pulsée est une technique encore jeune, connue depuis de nombreuses années mais encore peu utilisée en industrie. Les premiers travaux scientifiques sur l'application de la LP pour inactiver les microorganismes datent des années 1980 (Hiramoto, 1984). Les équipements n'étaient alors pas suffisants pour permettre une utilisation efficace de la technologie d'un point de vue microbiologique. Leur développement technologique nécessitera par la suite un savoir partagé entre physique et microbiologie. Après une longue période d'absence, elle fait désormais l'objet de nouvelles recherches, et s'étend dans le secteur industriel. De nombreuses données sont encore incomplètes par rapport à des traitements comme la pasteurisation ou l'irradiation. Il existe une hétérogénéité des équipements utilisés, d'où une grande diversité de doses, et des données souvent insuffisantes pour déterminer des traitements standards. La plupart des résultats sont donnés en fonction d'un type précis de machine. Mieux comprendre les caractéristiques du traitement, les facteurs d'influence, et établir des relations dose/réponse sont déterminants pour appliquer la technologie à l'industrie agroalimentaire.

Il est à souligner que les applications de la lumière pulsée ne sont pas forcément les mêmes que pour les autres techniques. En effet, les applications de LP concernent principalement les surfaces d'emballages, les liquides clairs traités sur de faibles épaisseurs, et les surfaces de produits alimentaires. Les choix de la méthode se portent à la fois sur le type de produit à traiter, sur la décontamination attendue, ainsi que sur les contraintes imposées et le prix de revient.

L'objectif de ce travail est de mesurer l'effet de la lumière pulsée sur les microorganismes, afin de trouver un modèle, voire des lois générales de leur destruction, sur un mode semblable à ce qui peut exister pour les traitements thermiques. Le but est de déterminer des courbes

doses réponses en fonction de la fluence et non en fonction d'un nombre de flashes ou de la distance à la source, qui sont en réalité des paramètres dérivés et ne reflètent pas la dose et la composition de la lumière reçue. Pour cela, la première étape sera de caractériser un pilote de lumière pulsée fabriqué par la société CLARANOR S.A., au niveau des propriétés physiques et des doses réelles de lumières mises en jeu sur le microorganisme. L'évaluation de l'efficacité décontaminante de la lumière pulsée sur divers microorganismes, et l'influence de paramètres physiques (longueurs d'ondes, fluence, tension...), environnementaux (surfaces sèches, milieux gélosés), ou encore physiologiques (spores, cellules végétatives, phases de croissance...) sera réalisée. L'utilisation des données obtenues par l'étude du pilote permettra une application au niveau industriel.

2. Démarche expérimentale

1) Réalisation d'un pilote afin de déterminer l'efficacité de la lumière au niveau microbiologique

L'étude de la lumière pulsée s'inscrit dans les objectifs de développement de la société CLARANOR, visant à caractériser et perfectionner les équipements spécifiques à l'entreprise. Un équipement de laboratoire pilote, utilisant la technologie de lumière pulsée CLARANOR, a été réalisé, afin de déterminer l'efficacité de la lumière au niveau microbiologique. L'avantage de cette méthode est de pouvoir contrôler les différents paramètres évoqués dans la section 4.3. De plus, l'éclairement homogène de la surface d'une boîte de Petri standard (9 cm de diamètre) fut la première condition à vérifier, pour pouvoir étudier l'efficacité décontaminante de la LP. La réalisation de la machine a nécessité la modélisation d'un ensemble lampes/réfecteur, par le département recherche et développement de la société. Le premier article, "*A pilot pulsed-light equipment delivering homogeneous fluence for decontamination of large experimental surfaces*" est issu de ces premières étapes. Un équipement pilote CLARANOR équipé de 3 lampes disposées en parallèle et surmontées d'un réflecteur en aluminium a permis d'éclairer une large surface. La répartition de la fluence a été mesurée grâce à un joulemètre, en chaque point de la surface utile et en fonction des distances entre les lampes et la cible.

Grâce à la caractérisation de la dose de lumière, de sa répartition ainsi que de la composition du spectre lumineux, les premières expériences de décontamination microbienne

ont été possibles. *B. subtilis*, Bactérie Gram⁺ sporulante ubiquitaire, bien maîtrisée en laboratoire, a été choisie comme premier microorganisme d'étude. Une gamme de fluences délivrées en peu de flashes (moins de 10) s'est avérée efficace. De fortes réductions (allant jusqu'à plus de 6 cycles logarithmiques) ont été obtenues sur un milieu riche gélosé.

Ce premier article marque la possibilité d'étudier en détails l'efficacité décontaminante de la lumière pulsée, mais surtout de cibler les facteurs, aussi bien physiques que biologiques ou environnementaux, pouvant influencer cette efficacité germicide.

2) Influence de la méthode d'inoculation et de la surface

C'est donc naturellement que de nombreux paramètres ont été sélectionnés, afin de déterminer le comportement des microorganismes dans le plus de conditions possibles. Une forte demande d'application de la lumière pulsée sur des surfaces d'emballages alimentaires ou encore des surfaces industrielles existe. Une des principales activités de la société est basée sur la décontamination de bouchons plastiques, de préformes de bouteilles, ou encore d'intérieur de pots de yaourts. L'idée de traiter des surfaces sèches et des surfaces de milieux gélosés était présente avant même de commencer les travaux de décontamination. L'utilisation de la lumière comme agent décontaminant a, de manière évidente, une contrainte particulière : le traitement, que ce soit en UV continu ou en LP, est peu pénétrant. La détermination de l'efficacité d'un tel procédé sur une surface nécessite l'élimination du biais apporté par les dépôts de microorganismes en multicouche. Il est utile de tester ce type de traitement sur des amas de cellules ou de spores, mais il est nécessaire d'avoir tout d'abord une idée de la décontamination de microorganismes sur surfaces sèches lorsque ceux-ci sont effectivement exposés au traitement.

Le second article, "*Deposition of B. subtilis spores using an airbrush-spray and spots to study surface decontamination by pulsed light.*" est le résultat des recherches visant à obtenir un dépôt de microorganismes en monocouche sur des surfaces telles que le plastique, le verre ou l'aluminium, matériaux fréquemment rencontrés dans l'industrie. Ces recherches ont nécessité des tests de différents sprays, dans le but d'obtenir une répartition microscopique en monocouche. L'article décrit l'utilisation d'un aérographe (pistolet à peinture équipé d'une buse de sortie de l'ordre de 0.3 mm) comme répondant à la problématique initiale. La répartition à la fois homogène et en monocouche a été démontrée par des études de dénombrement, de reproductibilité et de visualisation microscopiques des ensemencements.

Les données concernant l'efficacité de la lumière pulsée sur des surfaces plastiques, aluminium ou verre ont ensuite été exposées, en utilisant une fois de plus les formes sporulées de *B. subtilis*.

Les 2 principaux résultats de l'étude ont été :

- la mise au point d'une méthode fiable et reproductible d'ensemencement par spray de microorganismes sur des surfaces souvent hydrophobes
- la forte décontamination obtenue sur polystyrène par lumière pulsée sur des spores de *B. subtilis*, toujours en un nombre limité de flashes (jusqu'à 2).

3) Principaux facteurs influençant l'efficacité germicide de la lumière pulsée

L'objectif général de la thèse, à savoir, évaluer de nombreux facteurs possibles influençant l'efficacité germicide de la lumière, a donc pu, grâce à ces premiers éléments, être poursuivi. La connaissance des caractéristiques de l'équipement pilote et le savoir faire mis au point pour ensemercer des surfaces variées, ont permis d'obtenir un grand nombre de données.

Pour cela, le comportement d'*Aspergillus niger*, second microorganisme étudié, à pu être comparé à celui de *B. subtilis*, pour chacun des facteurs testés. Le troisième article présente l'étude de l'influence de plusieurs caractéristiques liées au système d'éclairage (dose, quantité d'UV, répartition de la dose, influence de différentes longueurs d'onde...) et d'éléments environnementaux liés à la cible (surfaces). Cette étude montre également des comparaisons à d'autres traitements comme les UV continus.

B. subtilis et *A. niger*, deux microorganismes très différents sur le plan biologique, et deux cibles importantes en termes d'hygiène industrielle, ont montré des comportements très différents. La nécessité d'avoir une vue d'ensemble sur ces facteurs d'influence a entraîné l'étude de diverses espèces microbiennes, tant au niveau de spores que de cellules végétatives. Une quinzaine de souches bactériennes ont été les premiers éléments de diversité. Grâce au nombre important d'expériences découlant de ce travail, des pistes concernant les mécanismes d'action de la LP, ou les éléments de résistance des microorganismes ont pu être mises en évidence.

4) Une application industrielle

Une étude de la LP en termes de technologie décontaminante appliquée à l'industrie agroalimentaire valorise les informations présentées dans les articles précédents. Un prototype dynamique servant au traitement de sirop de sucre à échelle industrielle a été conçu par CLARANOR. La validation d'un niveau de décontamination supérieur ou égal à 3 cycles logarithmiques du sirop de sucre flashé de manière continue était nécessaire dans la démarche commerciale de l'entreprise. La mise au point des protocoles de tests ainsi que les résultats de décontamination de sirop de saccharose à 65° Brix ont fait l'objet d'un quatrième article: "*Decontamination of sugar syrup by pulsed light*". La caractérisation d'une machine industrielle a été rendue possible grâce à la collaboration du département physique et microbiologie de l'entreprise, tout autant que pour le démarrage général de l'étude. Les connaissances approfondies en optique et en physique des plasmas, détenues par les physiciens, ont permis un travail rigoureux, permettant de sortir du contexte empirique, jusque-là dominant dans la littérature.

Résultats

1. Un équipement de lumière pulsée délivrant une fluence homogène pour la décontamination de larges surfaces expérimentales

La lumière pulsée se définit par des flashes de lumière blanche, produits par une lampe à xénon, pour décontaminer les aliments, liquides et emballages. Le domaine en longueurs d'onde émises par les lampes, dépend de la qualité du quartz utilisée comme enveloppe. Il s'étend depuis l'UV jusqu'au proche infrarouge. Divers articles rapportent une forte efficacité décontaminante. Les effets de la LP ont été testés sur des aliments, des liquides et des surfaces, comme par exemple les œufs, le lait ou encore des surfaces inox (Hierro *et al.*, 2009; Krishnamurthy *et al.*, 2007; Rajkovic *et al.*, 2010b), ainsi que sur de nombreuses espèces microbiennes (Farrell *et al.*, 2009). Malheureusement, l'expression des caractéristiques du traitement varie en fonction de l'équipement utilisé et les paramètres choisis pour définir la dose ne sont pas systématiquement les mêmes. Les taux de destruction sont souvent exprimés en fonction d'un nombre de flashes ou de la distance entre les lampes et l'échantillon. Ces paramètres trop réducteurs permettent uniquement de comparer la sensibilité des différents microorganismes au sein d'une même étude.

Le but de cet article est de qualifier un traitement de lumière pulsée en s'affranchissant le plus possible des données empiriques spécifiques à l'équipement utilisé, c'est à dire d'exprimer une courbe dose réponse en fonction d'une quantité de lumière déterminée quel que soit le système utilisé. Un pilote de lumière pulsée, fabriqué par la société CLARANOR, a été utilisé pour définir la dose reçue par une surface cible et pour mesurer son efficacité microbiologique.

Dans un premier temps, la géométrie de la machine (surface de traitement disponible, distances minimum et maximum entre lampes et échantillon), ainsi que les caractéristiques intrinsèques des lampes (taille, tension applicable, spectre émis, quantité d'UV émise) ont été décrites. La qualification des caractéristiques physiques de la machine a été réalisée grâce à une collaboration étroite avec les physiciens du département R&D de l'entreprise. La maîtrise des techniques de mesures a permis la réalisation d'une cartographie 3D du système, qualifiant la répartition de la fluence (totale ou UV) sur la surface cible, pour chaque tension appliquée. La quantité d'UV contenue dans les flashes a pu être appréciée grâce à des filtres optiques (coupant certaines longueurs d'onde) disposés sur le capteur du joulemètre.

Grâce à ce travail, l'équipement pilote a été entièrement qualifié, en termes de composition de la lumière, de répartition de fluence, et ainsi de dose reçue par la totalité de la surface de traitement. Ces mesures ont pour but d'être transposables à tout type de machine, et tout type de configuration. La destruction des spores de *B. subtilis* en fonction de la dose déterminée par la méthode a été vérifiée pour différentes tailles de surface traitée, afin de relier la fluence au taux de décontamination et de s'affranchir du facteur machine. La même courbe dose-réponse a été obtenue, quelle que soit l'aire traitée de 7 à 63 cm². Une surface plus grande a présenté une légère différence de réduction logarithmique, mais finalement peu marquée en termes de fluence nécessaire à la réduction de 3 cycles logarithmiques des spores de *B. subtilis*. L'expression de la destruction des spores de *B. subtilis* a démontré une réduction logarithmique importante (> 6) quelle que soit la taille de la surface traitée (de 7 à 63 cm²). Cette étape a permis de valider l'efficacité d'un traitement de LP et son expression en fonction d'une grandeur physique universelle pouvant être déterminée sur chaque équipement.

Article 1

A pilot pulsed-light equipment delivering homogenous fluence for decontamination of large experimental surfaces

Article à soumettre

Abstract

Pulsed light (PL) technology uses intense flashes of broad spectrum white light to kill microorganisms. Microbial decontamination is often expressed as a function of numbers of flashes, or distance from the flashlamp. To define treatments and compare efficiency of different PL equipments, the characteristics of the light flux received by microorganisms have to be considered rather than distance from the lamp or lamp input energy. A PL pilot equipment designed to homogeneously treat a standard surface (3.5 cm to 9 cm diameter agar plates, and a 10 cm x 9 cm agar surface) was qualified. This equipment allows to express a bacterial reduction as a function of the light dose actually received by the sample, accounting for charging voltage, % of UV, and fluence received by the PL treated micro-organism. The decontamination treatment by the PL equipment was performed on *B. subtilis* DSM 402 spores spread onto agar surface. A 5-6 log₁₀ reduction in spore counts was obtained with 1-2 flashes.

1. Introduction

The first historical uses of light for decontamination purpose were based on the use of deep UV (namely UV-C) usually produced by mercury lamps. Food, liquids and packaging decontaminations have been extensively studied since many years (Bintsis *et al.*, 2000; Hijnen *et al.*, 2006). The mechanism involved in destruction of microorganisms is related to UV absorption of DNA and cells. Pulsed Light (PL) decontamination has been more recently discovered and found to be a very efficient process (Gomez-Lopez *et al.*, 2007). PL uses pulses of white light, produced by a xenon flash lamp to decontaminate food, liquids and packaging. Wavelength are ranging from 200 to 1100 nm but several works on that topic report that the deep UV part of the spectrum is the most effective for decontamination (Gomez-Lopez *et al.*, 2007). Pulses duration is usually less than 1 ms and repetition rate up to 10 Hz. The PL treatment can last therefore less than 1 s, which presents a considerable interest in many industrial processes. The effects of the PL have been tested on a wide range of foods (Gomez-Lopez *et al.*, 2005a; Ozer & Demirci, 2006), solid surfaces such as paper-polyethylene or stainless steel (Turtoi & Nicolau, 2007; Wekhof *et al.*, 2001; Woodling & Moraru, 2005), and on many microbial species such as *L. monocytogenes*, *S. aureus*, or *B. cereus*. (Gomez-Lopez *et al.*, 2005b; Krishnamurthy *et al.*, 2004; Rowan *et al.*, 1999; Uesugi *et al.*, 2007). Destruction of viruses (Huffman *et al.*, 2000; Roberts & Hope, 2003), polioviruses and adenoviruses (Lamont *et al.*, 2007) usually inoculated onto the food has also been studied. PL efficiency for decontamination is rather well documented, but tests showing PF effects are made on different equipments, and destruction rates are often expressed only as a function of the number of pulses (proportional to the total energy received by the sample) (Fine & Gervais, 2004) and/or as a function of the distance from the lamp (negatively correlated to the energy) (Sharma & Demirci, 2003). Unfortunately number of pulses and distance to the lamp are not the appropriate parameters: to determine the actual light dose (fluence) received by the samples the measurements of the physical characteristics energy, (peak power and emitted light spectra) have to be done. In addition enlightenment homogeneity is seldom verified. Hence it is never certain that the energy is homogeneously delivered on the treated surface because of an uneven distribution of light. The study of the influence of the spectral range for the decontamination (Wang *et al.*, 2005; Wekhof, 2000; Woodling & Moraru, 2007) shows that the UV range is the most efficient and particularly the UV-C range. Reliable conclusions on the effects of PL need (i) expression of microbial

destruction rates as a function of the received total and UV-C energy and (ii) homogeneous delivery of PL on surfaces with some practical significance (i.e. larger than a few cm²). In this work we present a PL pilot equipment designed to homogeneously deliver light onto large experimental surfaces (from 5 cm² to 90 cm²), qualified (total energy and spectrum composition) and tested for microbial killing. Physical parameters will allow to link a fluence to decontamination rate, which can be adapted for every PL equipment.

2. Materials and methods

1) Flash lamp operation

PL set up is based on the use of xenon filled flash lamps (CLARANOR, Avignon, France). Each lamp consists of a 7 mm outside diameter fused quartz tube ended with two electrodes and filled with 1500 mbar of xenon. The gap between electrodes is 175 mm. Each lamp is powered by its own capacitor discharging circuit with a serial trigger. Capacitor value is adjustable, usually 66 µF, and charging voltage is adjustable also from 1000 V to 3000 V. Consequently the maximum energy stored in the capacitor is 300 J and the optical efficiency is of the order of 50 %. Taking into account the 250 µs pulse duration the total optical peak power reaches 600 kW. A typical spectrum produced by these flash lamps is given in figure 1. It shows that the spectrum is continuous between 160 and 1300 nm and is particularly rich in UV (up to 20 % for this condition).

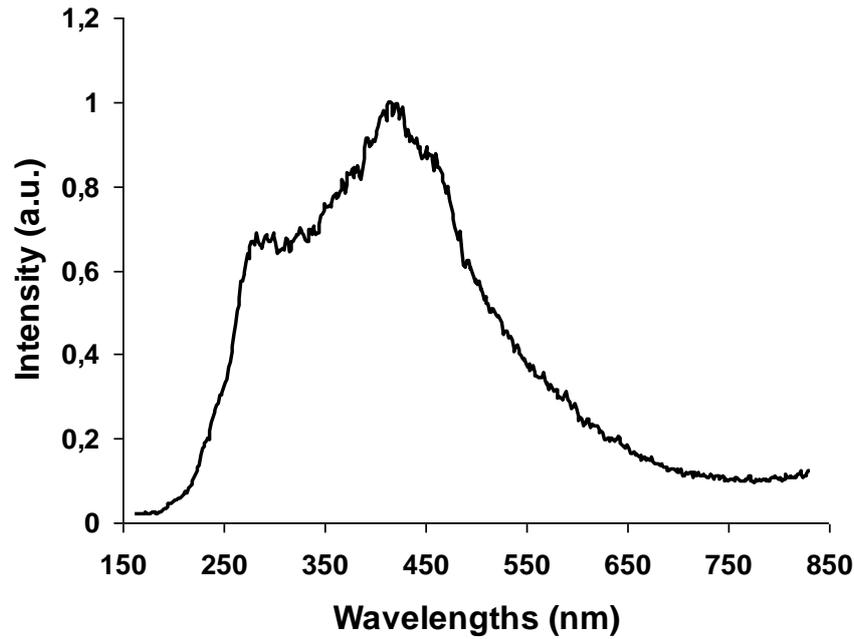


Figure 1. Emission spectrum of the flash lamp implemented in the PL equipment - *a.u.*: arbitrary units

2) Experimental PL pilot

The PL pilot consists of a stainless steel box containing a three lamps assembly with their optical concentrating system and an adjustable lab-elevator for placing the samples below the lamps at the desired distance. The optical system is an assembly of three polished aluminum reflectors with calculated profile in order to insure an almost uniform fluence on a 10 cm x 10 cm square surface. The choice of aluminum as a material for these reflectors was dictated by the necessity to have the best reflectivity in the UV part of the spectra since the germicidal effect is supposed to be mainly related to the UV.

3) Fluence measurement

The fluence is defined as the lighting energy received by the surface unit. Total fluence was measured with a joulemeter. A Gentec QE 12 LP, 1.1 cm edge square probe connected to a SOLO 2 Power and Energy meter (Gentec Electro-Optics Inc, Quebec, Canada) was used. Fluence was directly displayed in J/cm². UV fluence was calculated from the difference between energy measurements behind colored filters. Long pass colored glass cutoff filters

(ORIEL, Stratford, CT, USA) were used. The tested cutoff wavelengths were 225 nm (ORIEL 51215) and 385 nm (ORIEL). The measurement uncertainty with this method is about 20 %.

4) Preparation of *B. subtilis* spore suspensions

A loopful of a stock culture stored at -20°C in a 30 % (v/v) glycerol solution of *B. subtilis* strain DSM 402 (= *B. subtilis* 168) was inoculated into 10 ml solution of Luria Bertani broth, and incubated for 16 h at 30°C under gentle shaking. Volumes of 200 µl of this *B. subtilis* dense culture were spread on Fortified Nutrient Agar (FNA) plates (Fernández *et al.*, 1999) and incubated for 7 days at 30°C. After 7 days, spores were detached from FNA plates using 2 x 3 ml of demineralized sterile water. The suspension was centrifuged for 15 min at 7000 g and the pellet was resuspended in 25 ml of sterile demineralized water. This operation was performed 3 times. After the last centrifugation, the pellet was suspended for further purification on urographin at 7000 g during 1 h, then three times centrifuged at 7000, 5000 and 4000 g for 15 min, and suspended in 25 ml sterile demineralized water. After the last wash, the purified suspension was collected in 2 ml demineralized sterile water and stored at 4°C until use. The spore suspension was heated at 70°C during 10 minutes before being used, to be sure that all the vegetative cells were eliminated. Spore counts were determined by spreading 100 µl volumes of decimal serial dilutions on duplicate LB Agar plates. The spore suspension contained 10⁸-10⁹ cfu/ml.

5) PL treatment of surface-spread spore suspension on agar

Volumes of 100 µL of 6-7 decimal serial dilutions of the spore suspension were spread on 9 cm diameter LB agar plates. Spread volumes were 30 µL on 5 cm plates, 15 µL on 3.5 cm diameter Petri dishes, and 150 µL on 10 cm x 9 cm rectangle agar surface in 14 cm diameter plates. To prevent germination, spore suspensions were kept on melting ice during experiments, and each plate was exposed to PL in the 1-2 min following spreading. Surviving colonies on agar plates were enumerated after 48 h incubation at 30°C. Each experiment was done in triplicate, each time with an independently prepared spore suspension. The applied mean fluences were between 0.3 and 1.8 J/cm², under a charging voltage of 2500 V. Multiple flashes were emitted at one second interval.

6) Enumeration of survivors after incubation and determination of reduction

After incubation time, the separate colonies were enumerated, (up to 200 colonies on 9 cm diameter plates, 450 on 10 cm x 9 cm agar surfaces, 150 on 5 cm diameter plates and 100 on 3.5 cm plates). The threshold of detection of survivors corresponds to one cfu on the lowest dilution plate.

The equation (1) used to calculate the reduction in spore numbers is:

$$\log_{10}(\text{reduction}) = \log_{10}\left(\frac{N_0}{N}\right) \quad (1)$$

where N is cfu count on PL flashed plates and N_0 is cfu count on unflashed plates. The \log_{10} reduction was expressed as a function of the applied mean fluence under a charging voltage of 2500V.

7) Fitting of \log_{10} reduction curves

A modified Weibull model was chosen to deal with microbial reduction curves (figure 2). The model of Mafart & Albert (2004) describes sigmoidal survival curves with a shoulder and tailing. The equation (2) of the model is:

$$\log_{10} \frac{N_F}{N_0} = \log_{10} \left[\left(1 - \frac{N_{res}}{N_0} \right) x 10^{-\left(\frac{F}{F_1}\right)^p} + \left(\frac{N_{res}}{N_0} \right) \right] \quad (2)$$

Where F is the fluence applied (J/cm²), N_F is the number of cfu after treatment at a fluence F, N_0 is the initial number of cfu, N_{res} is the residual bacterial number, F_1 is the fluence allowing the first \log_{10} reduction and p is a parameter which determines the curve convexity or concavity (upward concavity: $p < 1$, upward convexity: $p > 1$). The model determines the last 3 parameters. Fluences allowing a n \log_{10} reduction were calculated using equation (3):

$$F_n = F_1 \left[\log_{10} \left(\frac{1 - \frac{N_{res}}{N_0}}{10^{-n} - \frac{N_{res}}{N_0}} \right) \right]^{\frac{1}{p}} \quad (3)$$

F_1 , p and N_0 were calculated using the Microsoft® Excel 2002 solver function. Comparison of the mean of reduction parameters was performed by a one-way ANOVA, followed by a Tuckey's Honest Significant Difference test at $P = 0.05$ (SYSTAT® version 9, SPSS, Chicago, USA).

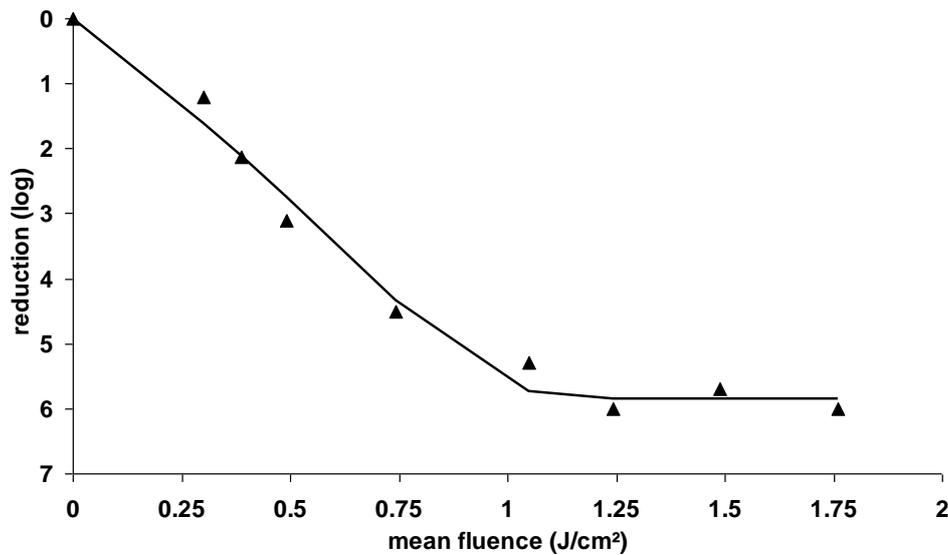


Figure 2. Inactivation of spores of *B.subtilis* DSM 402 (▲) spread on 9 cm-diameter LB agar plates as a function of fluence (in J/cm²) emitted by the PL pilot equipment at a charging voltage of 2500 V. The line represents the fitting of the experimental data (triangles) to the model of Albert and Mafart (2005).

3. Results and discussion

1) Mapping of the total fluence

The optical cavity was designed to deliver an almost homogeneous fluence on a 10 cm x 10 cm surface. Fluence maps were made for charging voltage ranging from 1000 V to 3000 V and distance between the cavity and the joulemeter probe ranging from 2 cm to 25 cm. A system of Cartesian coordinates was defined with the x -axis parallel to the lamp axis and the y -axis perpendicular to it. The point O ($x = 0, y = 0, h = 0$) corresponds to the center of the optical cavity. h is the distance from the optical cavity to the point ($x = 0, y = 0$) (Figure 3). Fluence measurements were done at points of different coordinates, each separated by 1 cm.

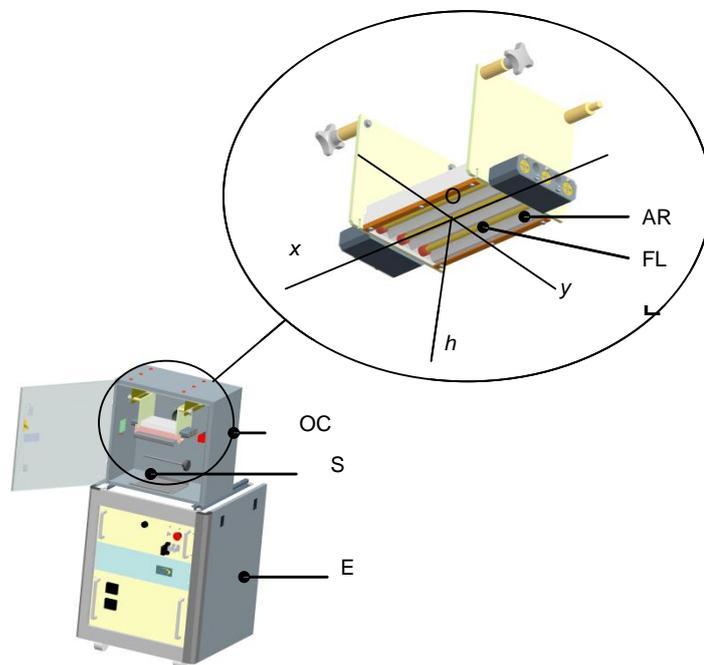


Figure 3. Schematic representation of the PL equipment OC: optical cavity; E: electronical control system (60 x 78 x 60 cm); S: sample location; FL: Xenon flash lamp; AR: aluminium reflector - x , y and h designate the axis of the system of Cartesian coordinates defining the position of the sample. The origin O of these coordinates is at the center of the window of the optical cavity.

Figure 4 shows the fluence profiles perpendicularly to the flashlamp axis measured along this axis every 1 cm. The distance between the front of the optical cavity and the joulemeter was $h = 4$ cm and the charging voltage 3000 V. For a 9 cm diameter plate placed at $h = 4$ cm, fluctuation of fluence on the y -axis perpendicular to the lamps is ± 21 % and fluctuation on the x -axis parallel to the lamp is only ± 7 %. The same profiles have been measured at $h = 12$ cm from the optical cavity (figure 5). The fluence is observed to be more homogenous than in the preceding measurements. For a 9 cm diameter Petri dish, the fluctuation of fluence on the y -axis is ± 14 % and only ± 2.5 % on the x -axis

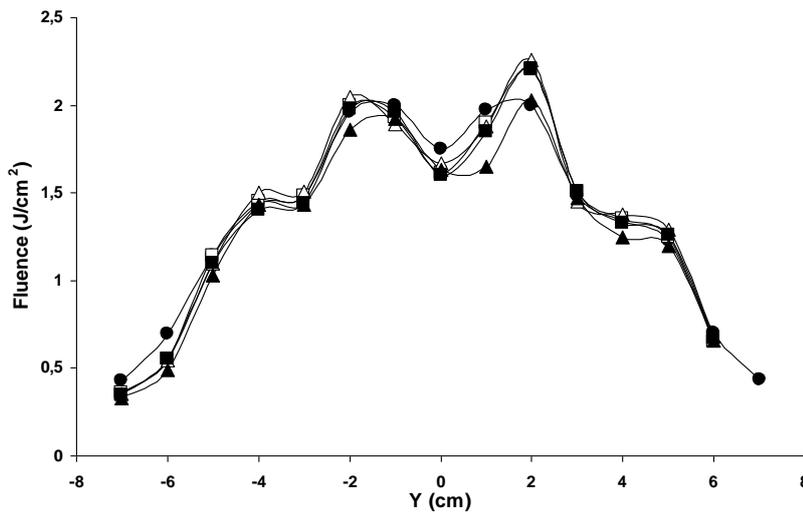


Figure 4. Fluence profiles perpendicularly to the lamps (along the y -axis). The distance h from the optical cavity was 4 cm. The capacitor charging voltage was 3000 V. Fluence profiles have been done at different positions along the x -axis (parallel to the lamps); the curves correspond to $x = 0$ (cm) (●), $x = 2$ (□), $x = -2$ (■), $x = 4$ (Δ), $x = -4$ (▲).

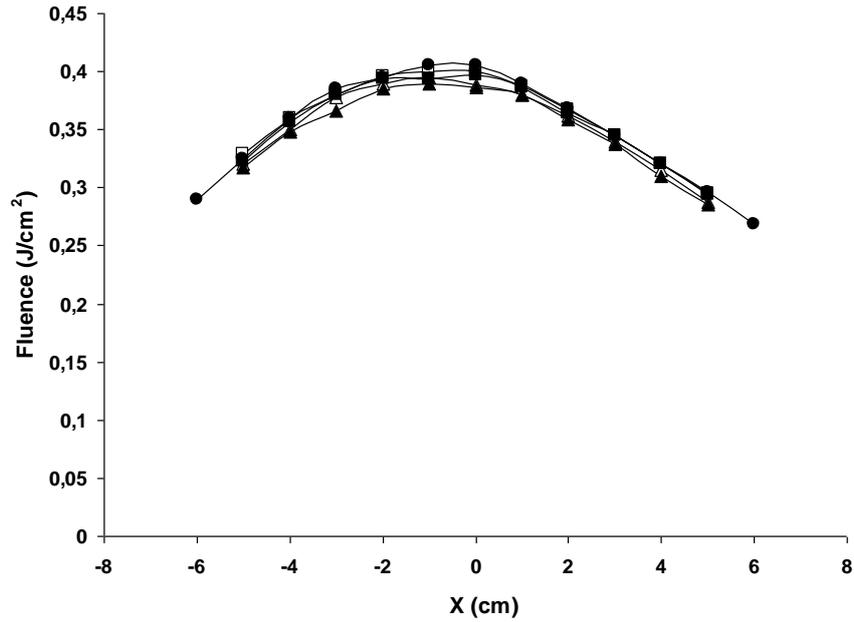


Figure 5. Fluence profiles parallelly to the lamps (along the x -axis). The distance h from the optical cavity was 25 cm. The capacitor charging voltage was 3000 V. Fluence profiles have been done at different positions along the y -axis (parallel to the lamps); the curves correspond to $y = 0$ (cm) (●), $y = 2$ (□), $y = -2$ (■), $y = 4$ (Δ), $y = -4$ (▲).

2) Determination of mean fluence and its standard deviation

To account for the heterogeneity of the fluence, a mean fluence and a standard deviation of the fluence on a treated area were determined. The area is divided in 1 cm-wide strips (corresponding approximately to the size of the joulemeter probe).

The equation (4) used to calculate the mean fluence is:

$$\bar{F} = \frac{\sum_{i=1}^n (F_i \cdot A_i)}{A_t} \quad (4)$$

where \bar{F} is the mean fluence, F_i the fluence of the band i , A_i the area of the band i , and A_t the total area of flashed area.

The standard deviation is then calculated using equation (5):

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{A_i} \sum_{i=1}^n A_i (F_i - \bar{F})^2} \quad (5)$$

Then, for each charging voltage that determines the spectrum of emitted light, each treatment will be characterized by a mean fluence, a fluence standard deviation, and minimal and maximal fluence received by the flashed surface. Those parameters were determined for surfaces equivalent to that of 3.5 cm, 5 cm and 9 cm Petri dishes and for 10 cm x 9 cm area (Table 1).

Table 1: Tested fluences and variability for treated areas of different sizes

PL treated agar plate area*	Statistic of fluence parameters on the treated area	Measured fluence parameter for a target test fluence (J/cm ²):							
		<i>(number of flashes)</i>							
		0.3	0.38	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.77
		<i>(1)</i>	<i>(1)</i>	<i>(1)</i>	<i>(1)</i>	<i>(1)</i>	<i>(1)</i>	<i>(2)</i>	<i>(2)</i>
Diameter 3.5cm	Mean (J/cm ²)	0,30	0,38	0,51	0,74	0,98	1,29	1,48	1,80
	Standard deviation	0,00	0,01	0,01	0,03	0,10	0,13	0,06	0,14
	Minimum (J/cm ²)	0,29	0,36	0,49	0,70	0,86	1,13	1,40	1,62
	Maximum (J/cm ²)	0,30	0,39	0,53	0,79	1,19	1,55	1,58	2,12
Diameter 50 cm	Mean (J/cm ²)	0,30	0,38	0,51	0,75	1,01	1,23	1,50	1,79
	Standard deviation	0,01	0,01	0,01	0,03	0,11	0,17	0,06	0,13
	Minimum (J/cm ²)	0,29	0,36	0,49	0,70	0,86	1,08	1,40	1,58
	Maximum (J/cm ²)	0,30	0,40	0,53	0,79	1,19	1,51	1,58	1,92
Diameter 90mm	Mean (J/cm ²)	0,30	0,38	0,49	0,74	1,05	1,25	1,49	1,76
	Standard deviation	0,02	0,03	0,04	0,09	0,17	0,19	0,18	0,24
	Minimum (J/cm ²)	0,26	0,38	0,40	0,55	0,78	0,96	1,10	1,30
	Maximum (J/cm ²)	0,32	0,41	0,53	0,83	1,34	1,55	1,66	2,12
Rectangle 10 cm x 9 cm	Mean (J/cm ²)	0,31	0,38	0,52	0,72	1,02	1,22	1,44	1,71
	Standard deviation	0,02	0,03	0,05	0,10	0,18	0,19	0,20	0,26
	Minimum (J/cm ²)	0,27	0,32	0,41	0,55	0,78	0,96	1,10	1,30
	Maximum (J/cm ²)	0,34	0,41	0,58	0,83	1,34	1,55	1,66	2,12

The center of each area is located perpendicularly to the center of the PL pilot.

3) Influence of the charging voltage and of distance from cavity upon fluence

Average fluence is shown in figure 6 and 7, either as a function of distance h from the front of the optical cavity or as a function of input energy. The proportionality between the electrical stored energy and the average fluence received by the treated surface is maintained whatever the distances to the cavity were (Figure 7). In other words, and as expected, the lamp optical efficiency does not significantly changes with the input energy. Consequently the value of the fluence can be known at any point below the optical cavity and for each charging voltage and, possibly, capacitor value.

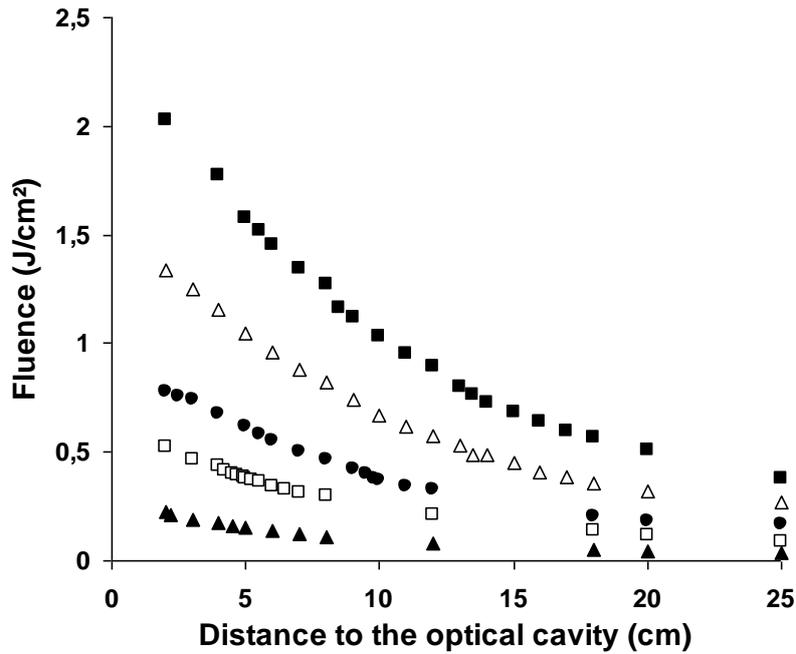


Figure 6. Influence of the distance h from the optical cavity on the full spectrum fluence. The curves correspond to charging voltages of 3000 V (■), 2500 V (△), 2000 V (●), 1500 V (□), and 1000 V (▲)

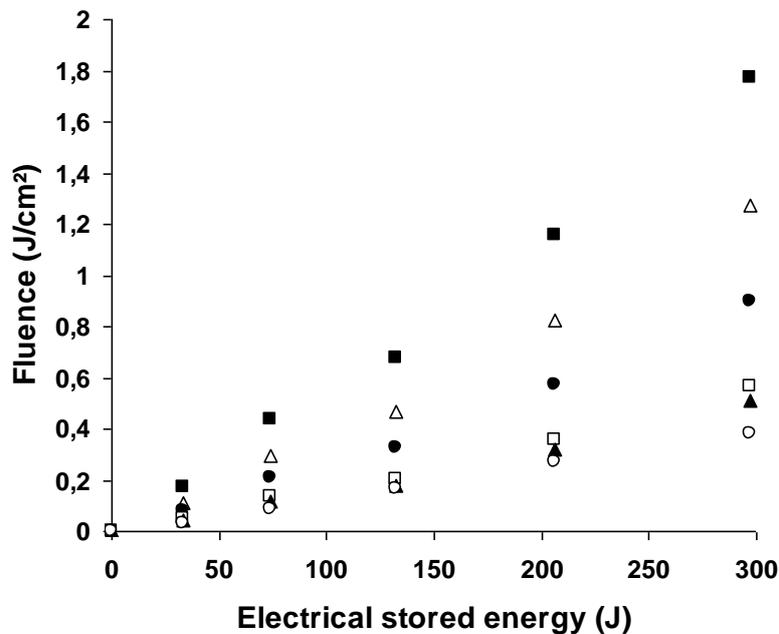


Figure 7. Influence of the electrical stored energy on the full spectrum fluence. The curves correspond to distance from the optical cavity of 4 cm (■), 8 cm (△), 12 cm (●), 18 cm (□), 20 cm (▲), and 25 cm (○)

4) Determination of the UV fluence

The role of UV in the decontamination process is assumed to be decisive (Wekhof, 2000). The total UV (from 200 to 400 nm) and the UV-C (from 200 to 280 nm) content of the fluence were therefore specifically measured as a function charging voltage and distance from optical cavity. The light arriving onto a sample comes partly directly from the lamp and partly from reflection on the aluminum reflectors. Since reflection on aluminum is wavelength dependant, the UV content of the light received by any sample could depend on the ratio of direct light over reflected light, which depends itself on the location of the sample with respect to the lamp. Table 3 shows the total UV content of light for different distances and locations of the detector. Accounting for the accuracy of these measurements, it appears that this UV content does not depend of the location of the sample from 4 cm from the optical cavity up to 25 cm from it. The role of charging voltage on the total UV content has been studied using a cutoff filter method (table 4). Total UV content is found to be proportional to the charging voltage, which in turn means that this UV fluence is proportional to the cube of the charging voltage keeping the capacitor value constant.

Table 3. Total UV content (%) as a function of sample position^a

x,y co-ordinates (cm) ^b	Total UV content as a function of the distance h to the optical cavity		
	h = 4 cm	h = 12 cm	h = 25 cm
(0,0)	18.5	20.5	20
(4,0)	19.5	19	19.5
(-4,0)	19.5	18.5	20
(0,-4)	20.5	20.1	20
(0,4)	20	20	20
(2,-2)	16.5	21	20.5
(-2,2)	18	19.5	19

^a The Charging voltage is 3000 V, with a capacitor value of $C = 66 \mu F$

^b The system of Cartesian co-ordinates defines the position of the sample. The x-axis is parallel to the lamps, the y-axis is perpendicular to the lamps. The point $(x = 0, y = 0)$ is the projection of the center of the optical cavity on the sample plan. h is the distance from the optical cavity to the point $(x = 0, y = 0)$.

Table 4: Percentage of UV (wavelength 225 nm to 385 nm) in the pulsed light delivered by the PL equipment. The distance to the optical cavity was $h = 15$ cm

Charging voltage (V)	Input energy (J)	Fluence _{<[180-1300nm]>} (mJ/cm ²)	Fluence _{<[225-385nm]>} (mJ/cm ²)	%UV ^a
3000	297	630	140	22
2000	132	260	40	15
1500	74,25	130	15	11,5
1000	33	60	5	8

^a %UV = $100 \times \text{Fluence}_{<[225-385nm]>} / \text{Fluence}_{<[180-1300nm]>}$

5) Killing of *Bacillus subtilis* spores by PL treatment

The survival curve of *B. subtilis* spores spread on a 9 cm diameter Petri dish had a sigmoid aspect, with a reduction greater than 5 log₁₀ reduction as the mean fluence increased from 0 J/cm² to 1 J/cm². There was a tailing effect between 1 and 1.77 J/cm². Similar reduction curves were obtained with the three replicate spore preparations. Observation of 14 microscope fields at a X1000 magnification of, each covering 100 to 350 *B. subtilis* spores, did not reveal any spore clump on the agar plates. Therefore the majority of spores were directly exposed to light. The tail observed on the reduction curves may be due to cell clumping (not detectable under the microscope) of only a small part of the bacterial population, or to a resistant subpopulation of cells. Survival curves were performed with spores spread on 3.5 cm and 5 cm diameter plates, and on a 10 cm x 9 cm surface (Figure 7).

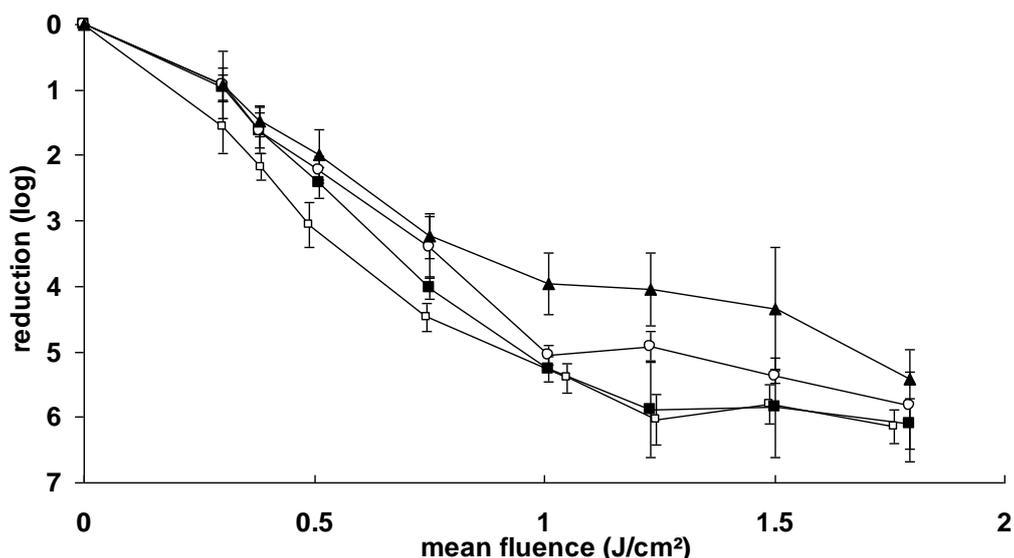


Figure 7. Inactivation of *B. subtilis* DSM 402 spores as a function of the mean fluence delivered on 9 cm diameter (□), 5 cm diameter (■), 3.5 cm diameter (○) and rectangular 10 cm x 9 cm (▲) agar plates. The charging voltage was 2500V. The lines show the mean of the reduction obtained at each fluence on $n = 3$ replicate experiments made with independently prepared spore suspensions. Bars show standard deviation. See the Results and Discussion section for calculation of the mean fluence on the treated surfaces.

The microbial inactivation curves as a function of the mean fluence for each size of agar plates were similar to that obtained on the 9 cm diameter agar plates, following a sigmoid, with a marked reduction as mean fluence increased from 0 J/cm² to 1 J/cm² and a tail effect for mean fluences greater than 1 J/cm². The tail level was slightly higher on the 10 cm x 9 cm surface. There was no significant difference (Tukey's HST at $P < 0.05$) in F_1 between all the treated areas. For F_3 and F_5 of spores inoculated on the 10 cm x 9 cm surface were slightly lower. However, although significant, the differences in F_3 (0.53 J/cm² vs. 0.64 J/cm²) were low (Table 5). In conclusion, the mean fluence received by the treated surface, as determined in this work, is a relevant and satisfactory parameter to qualify the energy dose emitted by PL pilot treatment. The efficiency and the obtained reduction do not depend on the geography of the treated surface in a range 7 cm² to 90 cm².

Table 5: Fluences allowing 1 log₁₀, 3 log₁₀ and 5 log₁₀ reduction of spores of *B. subtilis* DSM 402

PL treated agar plate area	Fluence (J/cm ²) allowing a log ₁₀ reduction of:		
	1	3	5
Diameter 3.5 cm	0.28 a	0.64 a	0.98 a
Diameter 5 cm	0.25 a	0.6 ab	0.91 a
Diameter 9 cm	0.23 a	0.53 b	0.8 a
Rectangle 10 cm x 9 cm	0.24 a	0.73 c	1.34 b

In each column, fluences followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$ (Tukey's HSD test). Experiments were performed in triplicate with independently prepared spore preparations

4. Conclusion

It is worth noting that the several log₁₀ reduction obtained with PL lamps was obtained with one or two flashes only. For example, Gomez-Lopez et al., (2005a) obtained a 5.9 log₁₀ decontamination of *B. cereus* spores at a distance of 8.4 cm to the lamp, a distance close to those applied in this work, with PL 50 flashes. This high number of flashes is quite common in previous works (Farrell *et al.*, 2009; Gomez-Lopez *et al.*, 2005b) . Further comparisons with previous works on PL efficiency are difficult: different strains tested, different light sources, electronics, and light concentration systems are used. However the high reductions have been obtained in one or two flashes, on surfaces convenient to perform experiments with classical microbiology tools (i.e. standard diameter Petri dishes), independently of the area of the treated surface, and expressed as a function of the light energy (and not of the irrelevant distance to the lamp or number of flashes). This demonstrates that the PL pilot equipment described in this work is particularly suitable for further investigation on PL efficiency of for industry applications and on PL mechanisms involved in microbial decontamination.

Acknowledgements:

This work is a partial fulfillment of author's C. Levy PhD Thesis. She has received a grant from the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie*, Paris, France.

References

- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Robinson, R. K. (2000).** Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 637-645.
- Farrell, H. P., Garvey, M., Cormican, M., Laffey, J. G. & Rowan, N. J. (2009).** Investigation of critical inter-related factors affecting the efficacy of pulsed light for inactivating clinically relevant bacterial pathogens. *Journal of Applied Microbiology*.
- Fernández, A., Salmerón, C., Fernández, P. S. & Martínez, A. (1999).** Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science and Technology* **10**, 158-162.
- Fine, F. & Gervais, P. (2004).** Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection* **67**, 787-792.
- Gomez-Lopez, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V. & Debevere, J. (2005a).** Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* **103**, 79-89.
- Gomez-Lopez, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V. & Debevere, J. (2005b).** Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 460-470.
- Gomez-Lopez, V. M., Ragaert, P., Debevere, J. & Devlieghere, F. (2007).** Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in food science & technology* **18**, 464-473.
- Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. & Medema, G. J. (2006).** Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research* **40**, 3-22.
- Huffman, D. E., Slifko, T. R., Salisbury, K. & Rose, J. B. (2000).** Inactivation of bacteria, virus and *Cryptosporidium* by a point-of-use device using pulsed broad spectrum white light. *Water Research* **34**, 2491-2498.
- Krishnamurthy, K., Demirci, A. & Irudayaraj, J. (2004).** Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light sterilization. *Journal of Food Protection* **67**, 1027-1030.
- Lamont, Y., Zutka, A. R., Anderson, J. G., MacGregor, S. J., Given, M. J., Deppe, C. & Cook, N. (2007).** Pulsed UV-light inactivation of poliovirus and adenovirus. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 564-567.
- Ozer, N. P. & Demirci, A. (2006).** Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *International Journal of Food Science and Technology* **41**, 354-360.
- Roberts, P. & Hope, A. (2003).** Virus inactivation by high intensity broad spectrum pulsed light. *Journal of Virological Methods* **110**, 61-65.

Rowan, N. J., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., Fouracre, R. A., McIlvaney, L. & Farish, O. (1999). Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1312-1315.

Sharma, R. R. & Demirci, A. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modeling. *Journal of Food Science* **68**, 1448-1453.

Turtoi, M. & Nicolau, A. (2007). Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material. *Journal of Food Engineering* **83**, 47-53.

Uesugi, A. R., Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2007). Inactivation kinetics and factors of variability in the pulsed light treatment of *Listeria innocua* cells. *Journal of Food Protection* **70**, 2518-2525.

Wang, T., MacGregor, S. J., Anderson, J. G. & Woolsey, G. A. (2005). Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Research* **39**, 2921-2925.

Wekhof, A. (2000). Disinfection with flash lamps. *Pda Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **54**, 264-276.

Wekhof, A., Trompeter, F. J. & Franken, O. (2001). Pulsed UV Disintegration (PUVD): a new sterilisation mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. In *The First International Conference on Ultraviolet Technologies*, pp. 15. Washington D.C.

Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2005). Influence of surface topography on the effectiveness of pulsed light treatment for the inactivation of *Listeria innocua* on stainless-steel surfaces. *Journal of Food Science* **70**, M345-M351.

Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2007). Effect of spectral range in surface inactivation of *Listeria innocua* using broad-spectrum pulsed light. *Journal of Food Protection* **70**, 909-916.

Perspectives issues du travail présenté dans l'article 1

Le réflecteur de la machine pilote CLARANOR utilisée dans ce travail, a été conçu et dessiné par des méthodes graphiques traditionnelles sur la base des principes géométriques de réflexion de la lumière. Les mesures de la fluence obtenues avec ce réflecteur ont montré que la surface de travail était éclairée de manière relativement homogène. La décontamination obtenue avec cette machine était indépendante de la taille de la surface traitée, dans un périmètre défini. Ces deux résultats illustraient le bon accord entre le principe théorique de la configuration des réflecteurs et leur efficacité réelle, malgré quelques défauts, notamment des variations de fluence accentuées lorsque l'échantillon est près des lampes (moins de 5 cm). En revanche, les faibles fluences, obtenues pour une grande distance lampes/échantillon, montrent une meilleure homogénéité sur la surface traitée. De nouveaux outils de simulation optique sont désormais utilisés. Deux logiciels de simulation optique, APILUX et OPTILUX, permettent de modéliser les nouveaux réflecteurs, de calculer l'éclairement au niveau des surfaces à décontaminer. Cet outil de prévision de la répartition de fluence a remplacé la méthode consistant à réaliser des séries de mesures fastidieuses, limitées à la validation des prévisions. De plus, sur la base des relations dose-réponse établies dans ce travail, le programme informatique permet également une prévision du niveau de décontamination par le système.

APILUX (O⁺⁺, Lille, France) est un logiciel de simulation optique qui permet de calculer l'éclairement sur une surface cible, à partir de la modélisation d'un système lampes/réflecteur. OPTILUX utilise les courbes dose/réponse propres à un microorganisme et un type de surface pour donner la réduction logarithmique. APILUX calcule des éclairagements sur des surfaces pour lesquelles il est possible de définir une grande résolution (dimension des pixels de l'ordre du micromètre). OPTILUX utilise ces éclairagements pondérés de manière logarithmique afin de donner une réduction locale (une région de la surface) et globale (toute la surface). Le processus est itératif et permet donc d'optimiser une forme de réflecteur à partir des calculs précédents. La modélisation s'effectue selon une procédure dont les principales étapes sont les suivantes :

- Une source lumineuse est simulée. Toutes les caractéristiques des lampes sont définies (épaisseur du quartz, longueur de la lampe, spectre émis, énergie électrique injectée dans la lampe).

- Une première forme de réflecteur est ensuite dessinée. Les propriétés optiques du matériau constituant le réflecteur sont mesurées (coefficients de réflexion dans le visible et dans l'UV).
- Le support de l'échantillon est modélisé. Ses propriétés optiques ont été mesurées et sont entrées dans le programme. Il est placé à la distance spécifiée pour le traitement.
- En fonction de ces éléments, le logiciel APILUX calcule l'éclairement sur la surface. Cela permet d'apprécier la répartition de l'éclairement reçu sur une surface cible, avant l'optimisation du réflecteur. Le logiciel OPTILUX calcule la réduction logarithmique pour un jeu de paramètres du réflecteur. De très nombreuses formes de réflecteurs sont possibles. Le logiciel établira pour chaque configuration une valeur d'efficacité. Le choix se portera donc sur la forme permettant la meilleure réduction logarithmique théorique.

Grâce à ces avancées, il est possible de créer des équipements de lumière pulsée, spécifiques à la forme géométrique du produit à traiter, et d'en apprécier l'efficacité. Le réflecteur 3 lampes utilisé en laboratoire a ainsi pu être optimisé (figure 13) et la cartographie de fluence précisément représentée (figure 14). L'optimisation de la forme géométrique des réflecteurs a permis une répartition de fluence très homogène, et ceci quelle que soit la distance entre les lampes et la surface cible.

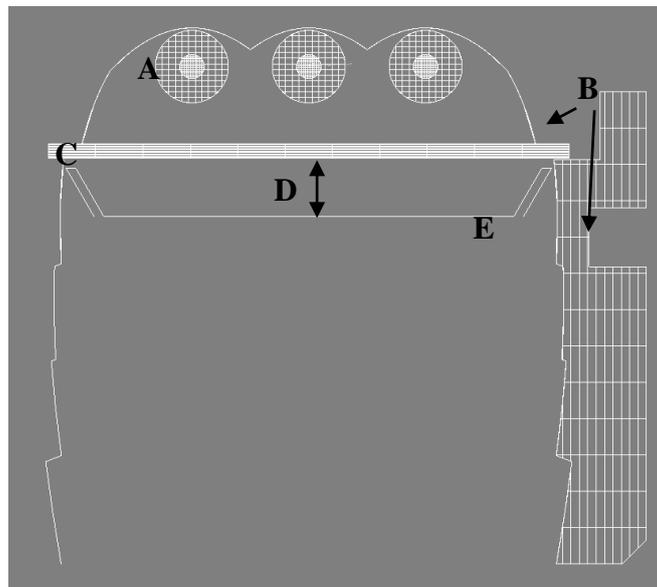


Figure 13: Schéma du système lampes-réflecteur optimisé: Lampes (A) Réflecteur (B) Plaque de quartz (C), distance entre le système lampes-réflecteur et la surface cible. (variable) (D), surface cible (E)

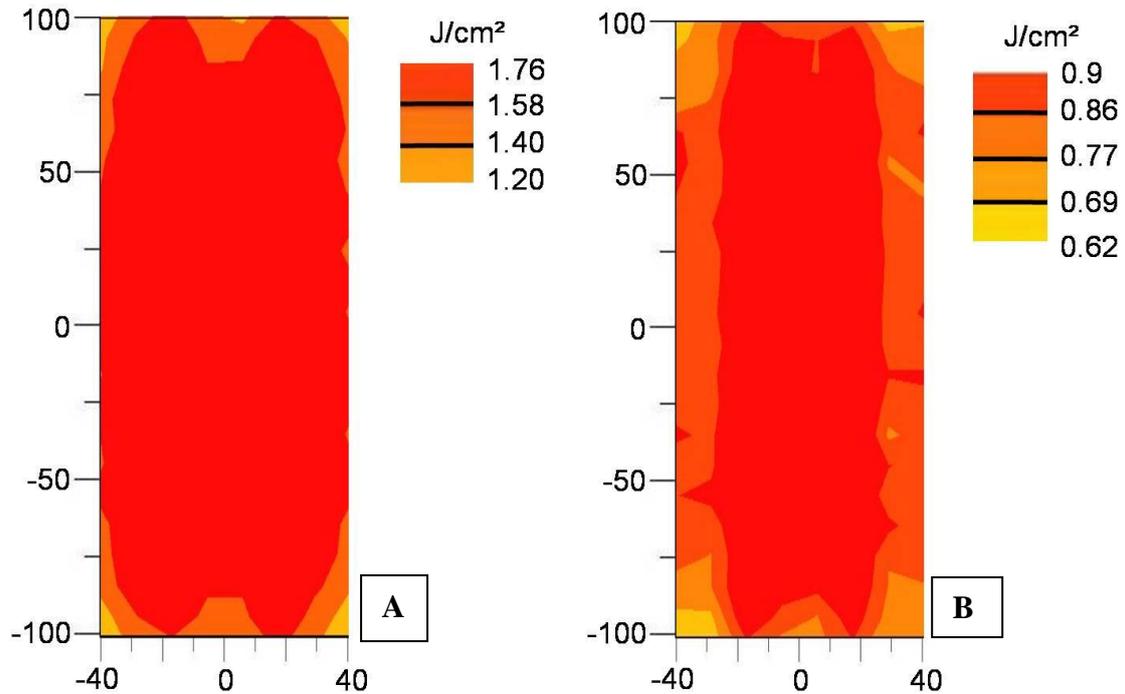


Figure 14: cartographie de fluence reçue par la surface cible pour $D=4\text{ cm}$ (A) et $D=14\text{ cm}$ (B) Les coordonnées x et y correspondent aux distances (en mm) par rapport au centre du système 3 lampes.

La prévision d'une efficacité pour n'importe quelle surface n'est possible que si la courbe expérimentale de réduction logarithmique a été établie en fonction d'une fluence donnée, pour un microorganisme et une surface cible. Le travail de détermination de l'efficacité germicide de la lumière pulsée dans les conditions maîtrisées a donc été primordial pour mettre au point ces nouvelles techniques d'optimisation. Les données microbiologiques nécessaires au fonctionnement de ces outils ont été réalisées sur le pilote CLARANOR, présentant des fluctuations à fluence élevée. Cependant, le paramétrage du logiciel nécessitait de connaître la relation dose/réponse pour des faibles énergies, c'est-à-dire des fluences inférieures à 0.5 J/cm^2 . Pour cette gamme de fluence, la répartition de l'énergie est relativement homogène, avec moins de 20% de variations. Néanmoins, les données microbiologiques disponibles sont encore peu nombreuses.

Bien que ces travaux aient permis une réelle avancée en termes de développement des équipements, ils ne sont encore que des simulations, applicables sur des surfaces à géométrie simple. En effet, certaines formes géométriques ne permettront pas une illumination totale de la surface, et ce quelle que soit la forme du réflecteur. De plus, ces prévisions de décontamination considèrent une répartition homogène des microorganismes sur la surface

ciblée, ce qui n'est pas toujours le cas. La décontamination déterminée grâce aux logiciels devra dans chaque cas être validée expérimentalement par des tests microbiologiques.

Résultats

2. Une méthode d'inoculation par spray pour étudier la décontamination de surfaces par la lumière pulsée

Les exigences d'hygiène des industries alimentaires ou pharmaceutiques comprennent la décontamination des surfaces des équipements, des lieux de transformation ou des matériaux de conditionnement. La capacité de contaminer artificiellement des surfaces de manière fiable et reproductible est une étape importante dans la détermination de l'efficacité d'un traitement de surface. La détection ainsi que la récupération des microorganismes inoculés sur une surface peuvent entraîner une mauvaise estimation de l'efficacité d'un traitement. La capacité d'adhésion des microorganismes est un facteur réduisant l'efficacité de récupération. L'étude de certaines technologies de décontamination de surface, telles que le laser, les UV continus, ou la lumière pulsée, nécessite une optimisation de l'inoculation ainsi que de la récupération des cellules après traitement. De nombreuses surfaces industrielles sont susceptibles d'être contaminées et soumises à de fréquents contrôles. Elles peuvent avoir des propriétés ainsi que des topographies très différentes. Ces surfaces peuvent être contaminées de différentes manières, soit par gouttelettes, soit par aérosols.

Le but de cet article est de comparer l'efficacité d'un traitement de lumière pulsée pour décontaminer des spores de *B. subtilis* sur une surface polystyrène (PS), inoculées soit par un dépôt de gouttelettes d'une suspension bactérienne, soit par pulvérisation à l'aide d'un pistolet à peinture miniature ou aérographe, utilisé dans le modélisme. La décontamination par lumière pulsée sera évaluée afin de mettre en évidence l'influence du type d'inoculation sur l'estimation de l'efficacité du traitement.

Dans un premier temps, la répartition des microorganismes (obtenue par pulvérisation ou par dépôt de gouttelettes) a été observée par microscopie électronique à balayage. L'impact du protocole d'inoculation par spray sur la survie des microorganismes a été déterminé, afin de vérifier l'absence de biais dû à la méthode. L'efficacité décontaminante de la LP a enfin été établie pour chaque méthode d'inoculation utilisée.

Une monocouche de microorganismes a été obtenue lors de l'inoculation par spray, indépendamment de la concentration de l'inoculum, grâce à une répartition du spray sur une large surface. L'obtention d'une monocouche lors d'une inoculation par gouttes est limitée à

une plus faible concentration, en particulier pour des suspensions aqueuses déposées sur une surface hydrophobe, du fait du faible étalement de la gouttelette. La méthode d'inoculation par spray s'est avérée simple à mettre en œuvre, capable de produire des niveaux de contamination reproductibles, peu coûteuse et fiable.

Article 2

Deposition of *B. subtilis* spores using an airbrush-spray and spots to study surface decontamination by pulsed light.

Article soumis

Abstract

Microbial contamination on surfaces of food process equipments is a major concern in industries. A new method to inoculate a single-cell layer of microorganisms onto polystyrene was developed, using a deposition with an airbrush. A homogeneous dispersion of *B. subtilis* DSM 402 spores sprayed on the surface was observed using both plate count and scanning electron microscopy. No cluster was found, even with a very high spore concentration (10^7 spores/inoculated surface). A similar monolayer of microorganisms was obtained after deposition of 10 μ L droplets containing 3×10^4 spores/spot on polystyrene coupons, but not at higher concentrations. Pulsed light treatment on monolayers of *B. subtilis* spores can lead to a decontamination higher than 6 log reductions. As a consequence of clusters formation for spots containing more than 3×10^5 , log reductions obtained by PL were significantly lower. The comparative advantages of spot and spray depositions are discussed.

1. Introduction

Microbial contamination on surfaces of food process equipments is a major concern, for food industry, catering companies and domestic hygiene. Surface contamination can lead to cross-contaminations of foods with pathogenic or spoilage microorganisms (Kusumaningrum *et al.*, 2003). Major foodborne pathogens, such as *B.cereus*, *E.coli*, *L. monocytogenes*, have pronounced abilities to adhere to equipment surfaces and their survival can be influenced by the physical and chemical properties of the surface (Barnes *et al.*, 1999; Faille *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2001). Microbial decontamination of surfaces using varied technologies, such as application of chemicals, laser, UV, or Pulsed light (PL) treatment has been extensively studied (Bloomfield & Scott, 1997; Christofi *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 2005; Woodling & Moraru, 2005). Some of these technologies such as UV and pulsed light are non penetrating and the experimental assessment of their decontamination efficiency requires the production of a single-cell layer (monolayer). The deposition of single-cell layers has been performed with aerosol chambers (Brown *et al.*, 2007), or a dry aerosol deposition device (Heimbuch *et al.*, 2009). Most of the experiments use spot depositions and recovery methods to remove microorganisms from the surface after the tested treatment (Brown *et al.*, 2007; Horneck *et al.*, 2001; Turtoi & Nicolau, 2007; Watson *et al.*, 2005; Woodling & Moraru, 2005). The aim of this work was to compare the PL decontamination obtained on a polystyrene (PS) surface using a droplet deposition (spot) method (quite commonly used) and an airbrush spray deposition method (expected to create an homogeneous monolayer of microorganisms on the target surface). Then a Pulsed Light treatment was performed to compare the surface decontamination rate of *Bacillus subtilis* spores deposited using the spray and the droplet methods.

2. Materials and methods:

1) Preparation of *B. subtilis* spore suspensions

A loopful of a stock culture stored at -20°C in a 30 % (v/v) glycerol solution of *B. subtilis* strain DSM 402 (*B.subtilis* 168) was inoculated into 10 mL solution of Luria Bertani (LB) broth, and incubated for 16 h at 30°C under gentle shaking. Volumes of 200 µL of this *B.*

subtilis culture were spread on Fortified Nutrient Agar plates (Fernández *et al.*, 1999), then incubated for 7 days at 30°C. After 7 days, spores were detached from FNA plates using 2 x 3 mL of demineralised sterile water. The suspension was centrifuged for 15 min at 7000 x g and the pellet was resuspended in 25 mL of demineralised sterile water. This operation was twice performed. Then, the pellet was resuspended and twice centrifuged at 5000 x g and twice at 4000 x g for 15 min. After the last wash, the purified suspension was collected in 2 mL of demineralised sterile water, stored at 4°C and pasteurised (70°C-10 min) then spore counts were determined by spreading 100 µL volumes of decimal serial dilutions on duplicate LB Agar plates. The spore suspension contained 10⁸-10⁹ cfu/mL.

2) Spray inoculation on dry surfaces with the airbrush

The spray inoculation was performed with a Mecafer AG-1 airbrush (MECAFER SA, Valence, FRANCE), connected to a compressor delivering compressed air at 2.5 x 10⁵ Pa (the working pressure recommended by the manufacturer is between 2 x 10⁵ Pa and 3 x 10⁵ Pa). The airbrush is equipped with a 2 mL tank. The liquid flow is adjusted in varying nozzle opening. The tank was filled with 100 µL of the spore suspension. Volumes of 100 µL of 2-fold or 10-fold serial dilutions of a spore suspension initially containing 10⁸-10⁹ cfu/mL were sprayed on empty Petri dishes placed vertically and perpendicularly to the spray direction. The serial dilutions were sprayed from the most diluted to the less diluted. As a polystyrene surface the bottom of a 9 cm diameter Petri dish was used. The airbrush was placed at about 20 cm from the Petri dish, and the liquid was sprayed as a fog (manual spraying). Flow rate was adjusted to obtain the thinnest possible fog (at the limit of detection by eye). The 100 µL spore suspension contained in the tank was sprayed onto the bottom of one Petri dish. After use, the airbrush was autoclaved, and changed after 20 autoclaving cycles before corrosion onset.

3) Spots inoculation of dry surfaces

Volumes of 10 µL of 10-fold dilutions of a *B. subtilis* spore suspension in sterile distilled water or in a sterile hydro-alcoholic solution (ethanol 50 %, v/v) were placed as single spots at the center of a 1 cm diameter PS coupon. The diameter of the spots made with the water suspensions was measured under the microscope (Olympus BX50 Rungis, France). Each covered approx.0.09 cm². The tested concentrations of the spots varied from approximately 3

$\times 10^6$ to approximately 3×10^4 spores per spot, i.e. from 3×10^7 to 3×10^5 spores/cm²). The deposited suspension was dried during 24 h under a laminar flow hood.

4) Scanning electron microscopy

B. subtilis spores were spread (by spray or spots) on 1.2 cm diameter PS coupons, and dried during 24 h at room temperature under a laminar flow hood. The coupons were then pasted on a metallic support, and gold plated before being observed by scanning electron microscopy at 10 kV.

5) Recovery procedure and enumeration of microorganisms

After spray inoculation, plates were dried for 24 h at room temperature then filled with 20 mL of molten LB agar at approx. 50°C. Plates were incubated during 48 h at 30°C before colony counting.

In order to detect an eventual effect of drying time on *Bacillus subtilis* recovery, spores were sprayed on the PS plate surface, then dried during 1 h and 24 h before addition of molten LB agar. Counts of spores sprayed on LB agar plates, sprayed and dried on PS plates during 1 h or 24 h before addition of molten LB agar, were not different in three independent experiments, each performed with at least three replicated plates for each test condition (data not shown). The addition of molten agar at approx. 50°C had also no effect on the cultivability of the *B. subtilis* spores (data not shown). The coupons inoculated by spots were individually placed in sterile tubes containing 2 mL of sterile water, then vigorously shaken by vortexing during one minute at room temperature to detach spores from the coupons. Volumes of 100 µL of serial decimal dilutions of this recovery solution were spread on LB agar plates. The plates were then incubated at 30°C during 48 h before colony counting. The percentage of recovery was equal to $(N_0/N) \times 100$ where N_0 is the count of deposited spore and N the count of spores recovered after detachment

6) Pulsed Light treatment

PL was delivered by a lab-scale PL pilot equipment (CLARANOR SA, Avignon, France). Short pulses (duration 250 µs) of broad spectrum (200-1100 nm) white light rich in UV (200-400 nm) are produced by xenon flashlamps. The PL fluences (PL doses) were from 0.3 J/cm²

to 1.25 J/cm² (delivered in 1 flash) and 1.8 J/cm² (delivered in two flashes at 1 s interval). Unflashed samples were used as controls. For the tested plates or coupons, the PL treatment was performed immediately before the media addition (spray method) or the recovery step (spot method) used to determine the number of surviving *B. subtilis* spores. The reduction was expressed as $\log_{10} N_0/N$, where N_0 is the initial concentration of the sprayed or spotted spore suspension and N the number of surviving spores, as a function of the applied fluence. The threshold of detection of survivors corresponds to one CFU on the lowest dilution plate.

7) Statistical analysis

The mean values and standard deviation were calculated from data obtained from at least three independent experiments (different dates, different *B. subtilis* spore preparations). Means were compared by Student's t-test or by Tukey's Honest Significant Difference test (SPSS Systat version 9, Chicago, USA).

3. Results

1) Surface dispersion of sprayed and spotted *B. subtilis* spores

Visual observation of colonies formed after spraying of LB agar plates and scanning electron microscopy of spores sprayed on polystyrene both showed a homogeneous dispersion of spores on the sprayed surface (Figure 1). Spores are often side by side on all observed sprayed areas, representing several hundreds of sprayed spores, and are deposited in a single-cell layer (monolayer). This monolayer distribution was found on all observed areas (13 observed fields, from 100 to 330 spores per field). Spores being in the shade of other spores have never been detected among the 2857 observed spores. Consequently most sprayed spores should be directly illuminated by PL. Figure 2 shows the dispersion of spotted *B. subtilis* spores in a water suspension, at different concentrations, on PS surface. A 10 μ L spot containing about 10⁶ bacterial spores clearly shows a non homogeneous dispersion, with large spore clusters especially in the outline of the spot. A 10 μ L spot containing about 10⁵ spores also shows large clusters in the outline of the dried drop (not shown). A spore monolayer of spotted spores was observed only with 10 μ L spots containing about 10⁴ spores and in this case no cluster was observed.

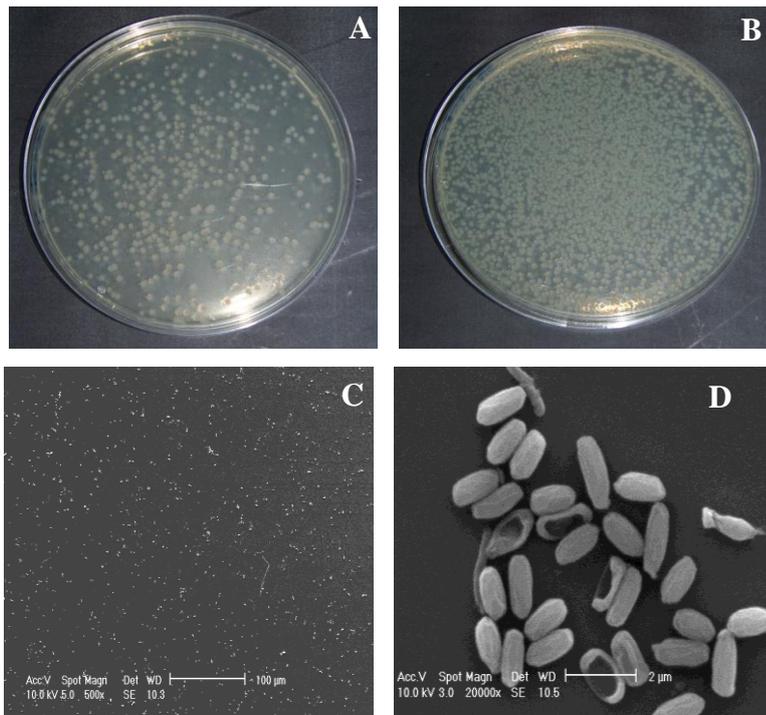


Figure 1. Dispersion of spores of *B. subtilis* sprayed on polystyrene Petri dishes.

Colonies were formed after 24 h incubation at 30°C from a spore suspension sprayed on the dish, dried for 24 h, and covered with molten LB agar. Volumes of 100 µL of the 10^{-3} (A) 10^{-4} (B) dilutions of a spore suspension containing 10^8 *B. subtilis* spores/mL were sprayed. The pictures C and D show the Scanning Electron Microscopy of 100 µL of *B. subtilis* spores at a concentration of 10^8 spores/mL sprayed on polystyrene surface at X 500 (C), and X 20000 (D) magnifications

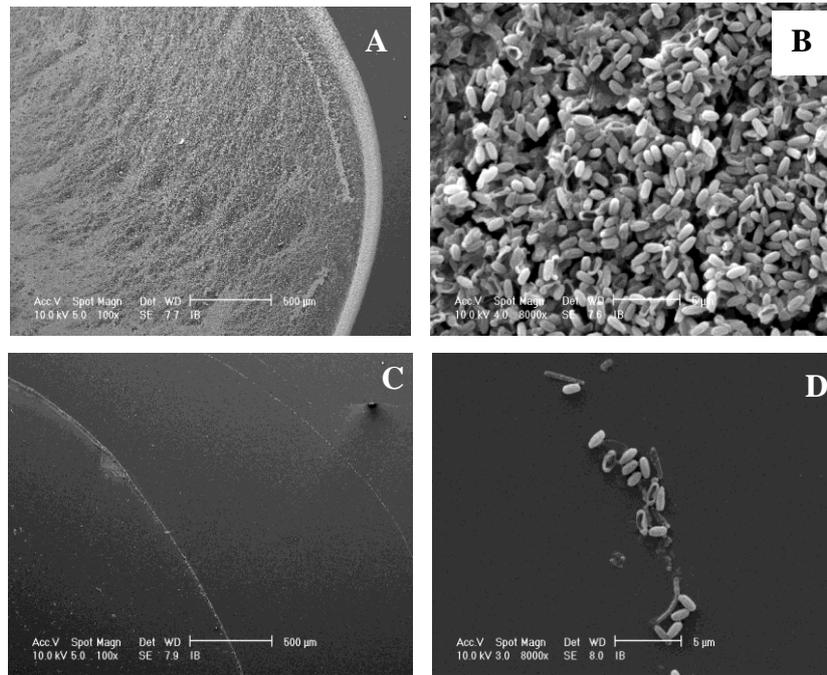


Figure 2. Scanning Electron Microscopy pictures of 10 μ L spots of a *B. subtilis* suspension in sterile distilled water containing 10^6 spores/spot at X 100 (A), and X 8000 (B) magnifications , and 10 μ L spots containing 10^4 spores/spot at X 100 (C) and X 8000 (D) magnifications

2) Reliability of the enumeration of sprayed and spotted *B. subtilis* spores

Volumes of 100 μ L were sprayed on agar plates and on PS Petri dish. The comparison between counts made with deposited and rake spread 100 μ L volumes, and sprayed 100 μ L volumes showed that only approx. 20 % of the sprayed volume actually comes into contact with the target surface (the agar plate or the Petri dish) (data not shown). However, despite this loss due to spray dispersion, replicate sprays with a given spore suspension gave a consistent number of colonies: the percentage standard deviation on several (5 to 10) replicate \log_{10} -transformed colony counts comprised between 10 and 450 colonies per agar plate was always lower than 8 %. In addition the spore loss by spray dispersion is independent on the spore suspension concentration: There was a linear relation between the \log_2 dilution of the *B.subtilis* suspension sprayed on plates and the \log_2 of the concentration evaluated by plates count. The slope of the linear regression curve was -1.05, which is not different from -1 at $P > 0.9$ according to its confidence interval.

For the spot method, drops of 10 μ L of the *B. subtilis* spore suspensions in water at mean concentrations of 3×10^6 , 3×10^5 and 3×10^4 spores per spot were deposited onto the surface

of polystyrene 1 cm diameter coupons. The percentage of recovery of the spot-deposited and detached spores were 94.2 %, 89.1 % and 70.4 % for 3×10^6 , 3×10^5 and 3×10^4 spores per spot respectively. These % of recovery of *B. subtilis* spores are in the higher range of the % of recovery obtained after detachment of *B. atrophaeus* spores from different surfaces and using different methods (Edmonds et al., 2009). The variability in the % of spore recovery was markedly higher when deposited at the lowest concentration tested (Table 1).

Table 1: % of recovery of *B. subtilis* spores deposited on polystyrene coupons

Initial concentration <i>B. subtilis</i> spores / 10 µl spot	% Recovery Mean (SD) ^a	Reproducibility CV (%)
3×10^6	94.2 (2.3)	2.4
3×10^5	89.1 (1.4)	1.6
3×10^4	70.4 (10.6)	15.1

^a n = 10

^b coefficient of variability

3) Pulsed Light efficiency

Figure 3 shows the survival curves of *B. subtilis* spores sprayed on polystyrene surface using the spray method with spore suspension at two concentrations (approximately 5×10^7 spores/ml and 5×10^8 spores/ml, which gave spore densities on plates of 1.5×10^4 spores/cm² and 1.5×10^5 spores/cm²). A log reduction higher than 5, was obtained with a single flash at 0.75 J/cm². There was no significant difference at all tested fluences in the log reductions obtained from the two inoculum concentrations (Student's t-test, p<.0.05). Consequently the PL inactivation was independent of the inoculum concentration, when sprayed.

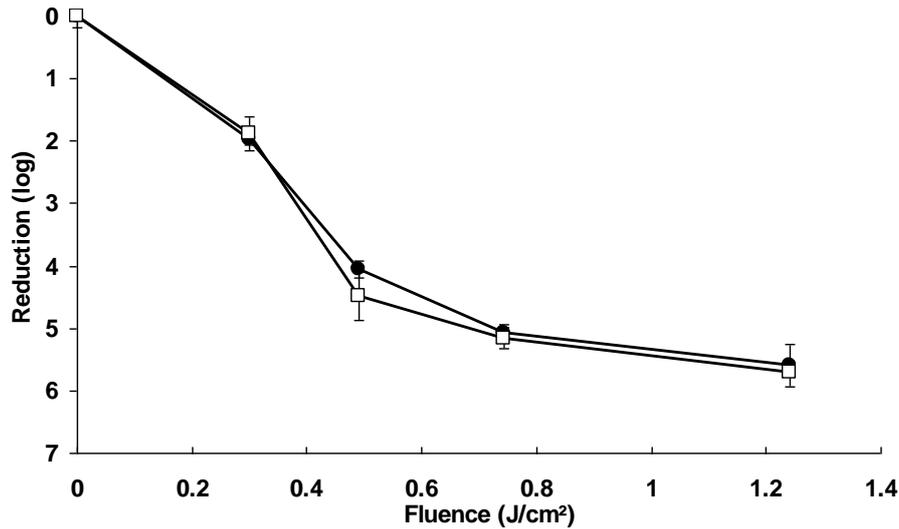


Figure 3. Inactivation of spores of *B.subtilis* DSM 402 sprayed on 9 cm diameter polystyrene Petri dishes as a function of fluence (in J/cm²) emitted by the PL pilot equipment. The curves correspond to the quantity of spores sprayed on the dish: about 10⁷ spores per plate (●) and about 10⁶ spores per plate (□).

Figure 4A shows a comparison between the inactivation rate of *B. subtilis* spores inoculated on LB agar by the spray method and the inactivation rate obtained by the manual rake spreading. Both log reduction curves of *B.subtilis* spores were almost identical, showing that there were fully independent on the inoculation method of the treated surface (no significant difference at all tested fluences; Student's t-test, $p > 0.05$).

Using the deposition on PS coupons by spots (figure 4B), log₁₀ reduction of *B.subtilis* spores in water suspension was lower than 2 at the maximal tested fluence (1.8 J/cm²) and with a spore concentration of 3 x 10⁶ spores per spot, close to 4 with a spore concentration of 3 x 10⁴ spores per spot (significant differences for all tested fluences, Tukey's HSD $P < 0.05$). The log reduction obtained with the intermediate spore concentration (3 x 10⁵ spores per spot) did not exceed 3. The inactivation by PL of spores deposited in spots was much lower (maximum 4 log reduction instead of nearly 6 log reductions) and much more variable (markedly higher sd on the reduction at each tested fluence) than the inactivation obtained with sprayed spores (Figure 4A). SEM indicated a high number of spore clusters at concentrations of 3 x 10⁶ (Figure 2) and 3 x 10⁵ spores per spot (NOT SHOWN). At a concentration of 3 x 10⁴ spores per spot, SEM images did not reveal any cluster formation. The log reduction is totally dependent on the spot concentration and was found between the 3 curves.

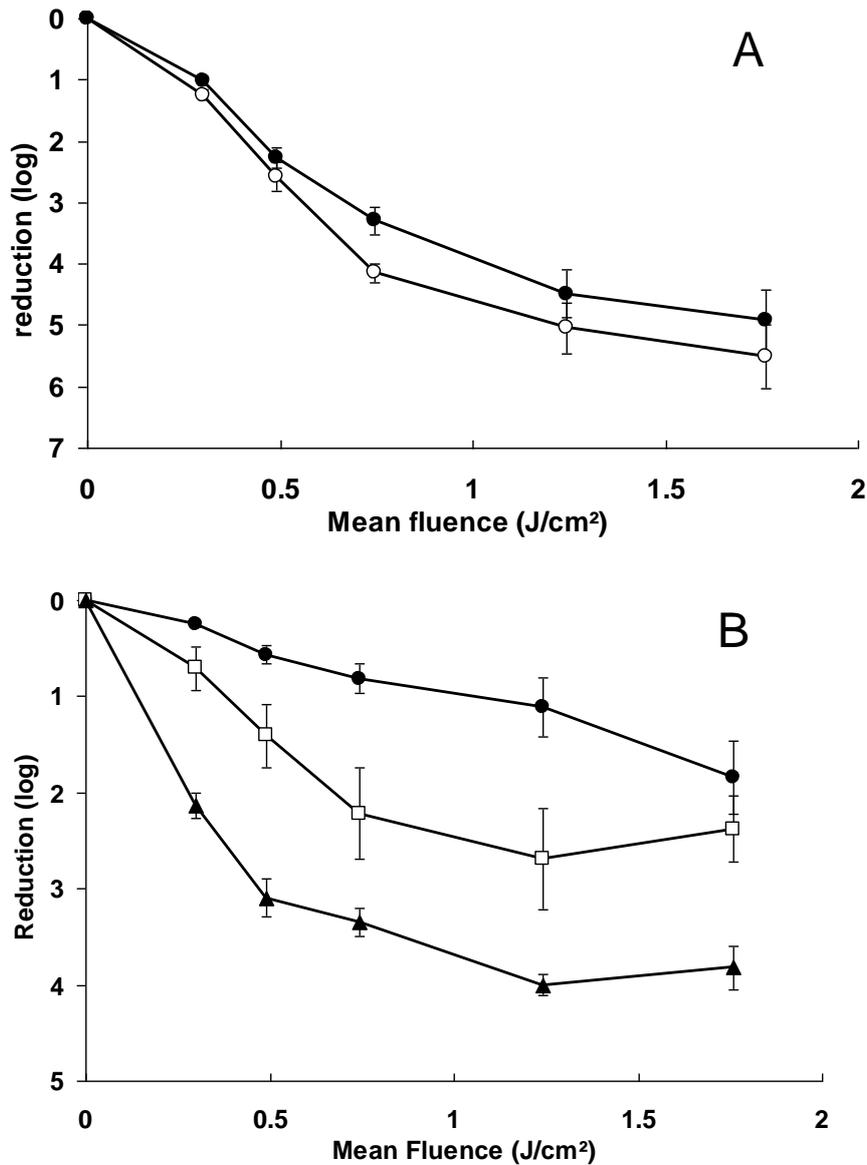


Figure 4. Inactivation of spores of *B. subtilis* DSM 402 suspended in water inoculated on LB Agar media, by the spray method (●) and the manual spreading method with rakes (○) (A), and inoculated by spot at concentrations of 3×10^6 (●), 3×10^5 (□) and 3×10^4 (▲) spores per $10 \mu\text{l}$ spot on a polystyrene surface (B), as a function of fluence (in $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Spotting spores in a hydro-alcoholic suspension allowed the formation of a cell monolayer at spot concentrations of 5×10^4 and 5×10^5 spores per $10 \mu\text{L}$ spot. Consequently, the inactivation by PL of spores deposited in spots in a hydro-alcoholic solution was very similar for both concentrations (and not different to the decontamination of spots in a water solution at a concentration of 3×10^4 spores per $10 \mu\text{L}$ spot, Student t-test, $P > 0.05$). The inactivation

by PL of spores deposited in a hydro-alcoholic solution was significantly lower (Student t-test, $P < 0.05$) for spot concentration of 5×10^6 and SEM images showed a pronounced cluster formation (data not shown).

4. Discussion

Both spot and spray inoculation techniques allowed a rather satisfactory spreading, i.e. a *B. subtilis* spore deposition as a monolayer. However, using the spot inoculation, a spore monolayer was successfully obtained only with a spore suspension containing 3×10^4 spores per 10 μ L spot; there were clusters of several layers of spores with 10 fold and 100 fold higher spot concentrations. In contrast, with the spray technique, a concentration of up to 10^7 spores per sprayed area gave a spore monolayer on a hydrophobic material. The spray inoculation technique allows a better estimation of the PL treatment efficiency, because survival was followed on at least a 6 log reduction. Despite the fact that microbial contaminations encountered in the food industry are not necessarily as cell monolayers, such a spray spreading method is necessary to evaluate the decontamination efficiency of some poorly penetrating treatments, such as UV or PL. In particular, the spray method allows to focus on the interactions between adhering cells and surfaces, which may have different optical properties (reflectivity, absorbance) determining the decontaminating effect of the treatment (Woodling & Moraru, 2005). Spot deposition has shown some limitations. Because of cluster formation the evaluation of the efficiency of a PL treatment will not be independent of the spot concentration. The polarity of the spore suspension liquid and the hydrophobicity properties of the surfaces may influence the spreading of high concentrated spots. This was shown for instance in this work using spore suspensions in a hydro-alcoholic solution instead of a water solution. However, in poorly favourable situations (water on polystyrene), spreading with a spray deposition as a homogeneous monolayer was successful on a large surface.

Airbrush is cheap and easy to purchase. The one used in this work was bought in a do-it-yourself centre. Despite an inoculation performed by hand, the concentrations of the sprayed inoculums have been consistently found to be reproducible. In addition spore counts have been performed by direct spreading of molten agar onto the sprayed and PL treated surface. This avoided a time consuming and tedious detachment procedure, which lowers the sensitivity of the enumeration method because of a partial recovery of deposited spores. The

ability of some spores to attach to the surface (Faille *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2001) could explain the difficulties to detach them from polystyrene. Survivors counts without detachment can circumvent growth alterations of the treated surface by PL which could lower spore detachment. Such alterations have been shown for instance on PET coupons inoculated with *A.niger* spores, displaying craters around spores due to PET melting after PL application (Wekhof *et al.*, 2001). A spraying method should be highly recommended when cells have to be inoculated as a monolayer on large surfaces of food industry equipment or packaging. This has been shown in this work to be particularly determinant in the assessment with a high sensitivity (up to 6 log reductions) of the efficiency of decontamination by PL on surfaces.

In conclusion the challenge tests of microorganisms deposited onto surfaces and treated by PL can be satisfactorily performed using both inoculations by spots and by spray. Nevertheless, the assessment of the actual decontamination rate strictly due to PL is strongly dependant on the quality of the dispersion of the inoculum on the surface. The spray inoculation, in addition to the relative convenience of use, has been consistently shown to be more sensitive and reliable.

Acknowledgements:

This work is a partial fulfillment of author's C.Levy PhD Thesis. She has received a grant from the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie*, Paris, France. The authors wish to thank Claire Bérard for skilful technical assistance.

References

Barnes, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R. & Chamberlain, A. H. L. (1999). Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4543-4548.

Bloomfield, S. F. & Scott, E. (1997). Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 1-9.

Brown, G. S., Betty, R. G., Brockmann, J. E. & other authors (2007). Evaluation of a wipe surface sample method for collection of *Bacillus* spores from nonporous surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 706-710.

Christofi, N., Misakyan, M. A., Matafonova, G. G., Barkhudarov, E. M., Batoev, V. B., Kossyi, I. A. & Sharp, J. (2008). UV treatment of microorganisms on artificially-contaminated surfaces using excimer and microwave UV lamps. *Chemosphere* **73**, 717-722.

Edmonds, J. M., Collett, P. J., Valdes, E. R., Skowronski, E. W., Pellar, G. J. & Emanuel, P. A. (2009). Surface sampling of spores in dry-deposition aerosols. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 39-44.

Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M. N., Slomianny, C. & Benezech, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 728-738.

Fernández, A., Salmerón, C., Fernández, P. S. & Martínez, A. (1999). Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science and Technology* **10**, 158-162.

Heimbuch, B. K., Kinney, K., Nichols, B. & Wander, J. D. (2009). The Dry Aerosol Deposition Device (DADD): An instrument for depositing microbial aerosols onto surfaces. *Journal of Microbiological Methods* **78**, 255-259.

Horneck, G., Stoffler, D., Eschweiler, U. & Hornemann, U. (2001). Bacterial spores survive simulated meteorite impact. *Icarus* **149**, 285-290.

Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C. & Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 227-236.

Peng, J. S., Tsai, W. C. & Chou, C. C. (2001). Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* **65**, 105-111.

Turtoi, M. & Nicolau, A. (2007). Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material. *Journal of Food Engineering* **83**, 47-53.

Watson, I. A., Wang, R. K., Peden, I., Ward, G. D., Stewart-Tull, D. E. S. & Wardlaw, A. C. (2005). Effect of laser and environmental parameters on reducing microbial

contamination of stainless steel surfaces with Nd : YAG laser irradiation. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 934-944.

Wekhof, A., Trompeter, F. J. & Franken, O. (2001). Pulsed UV Disintegration (PUVD): a new sterilisation mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. In *The First International Conference on Ultraviolet Technologies*, pp. 15. Washington D.C.

Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2005). Influence of surface topography on the effectiveness of pulsed light treatment for the inactivation of *Listeria innocua* on stainless-steel surfaces. *Journal of Food Science* **70**, M345-M351.

Données complémentaires

Décontamination de spores de B.subtilis inoculées sur polystyrène par la méthode de spots alcooliques

Les résultats concernant la décontamination par lumière pulsée de spores de *B. subtilis* inoculées par spots hydro-alcooliques sur polystyrène sont présentés ici. L'utilisation de solutions hydro-alcooliques pourrait optimiser l'étalement du spot, en raison de l'hydrophobicité de la surface. Le pourcentage de récupération des spores déposées par spots de 10µL en solution hydro-alcoolique a donné sensiblement les mêmes résultats que dans le cas des spores en suspension dans l'eau pour les fortes concentrations. En revanche, pour un ensemencement à 5×10^4 spores par spot, le pourcentage de récupération est plus élevé dans le cas des spots hydro-alcooliques que des spots aqueux (table 9). Les courbes de réduction logarithmique des spores en solution hydro-alcoolique déposées par spots en fonction de la fluence moyenne appliquée sont similaires aux spots en solution aqueuse pour les concentrations de 5×10^6 par spot et 5×10^4 par spot. En revanche, la réduction logarithmique obtenue sur des spots hydro-alcooliques de concentration 5×10^5 est supérieure à celle obtenue dans le cas des spots aqueux, et se rapproche de la forte efficacité obtenue dans le cas des spots peu concentrés, présentant un étalement des spores en monocouche (figure 15). Aucune différence significative ($P > 0.05$) n'a été mise en évidence pour les valeurs de F_3 entre les spots chargés à 5×10^5 ou 5×10^4 spores par spot, ni entre les valeurs de F_3 des spots de concentration 3×10^4 (solution aqueuse) ou 5×10^4 (solution hydro-alcoolique) (table 10).

Table 9: pourcentage de récupération des spores déposées par spots (solution aqueuse ou alcoolique) sur polystyrène en fonction de la concentration.

	Concentration du spot (spores/spot de 10µL)					
	Solution aqueuse			Solution hydro-alcoolique 50% (v/v)		
	3×10^6	3×10^5	3×10^4	5×10^6	5×10^5	5×10^4
Pourcentage de récupération (σ)	94.2 (2.28)	89.1 (1.38)	70.4 (10.63)	92.1 (0.9)	92.4 (0.8)	92.1 (1.39)
Coefficient de variabilité (%)	2.42	1.55	15.11	0.98	0.88	1.5

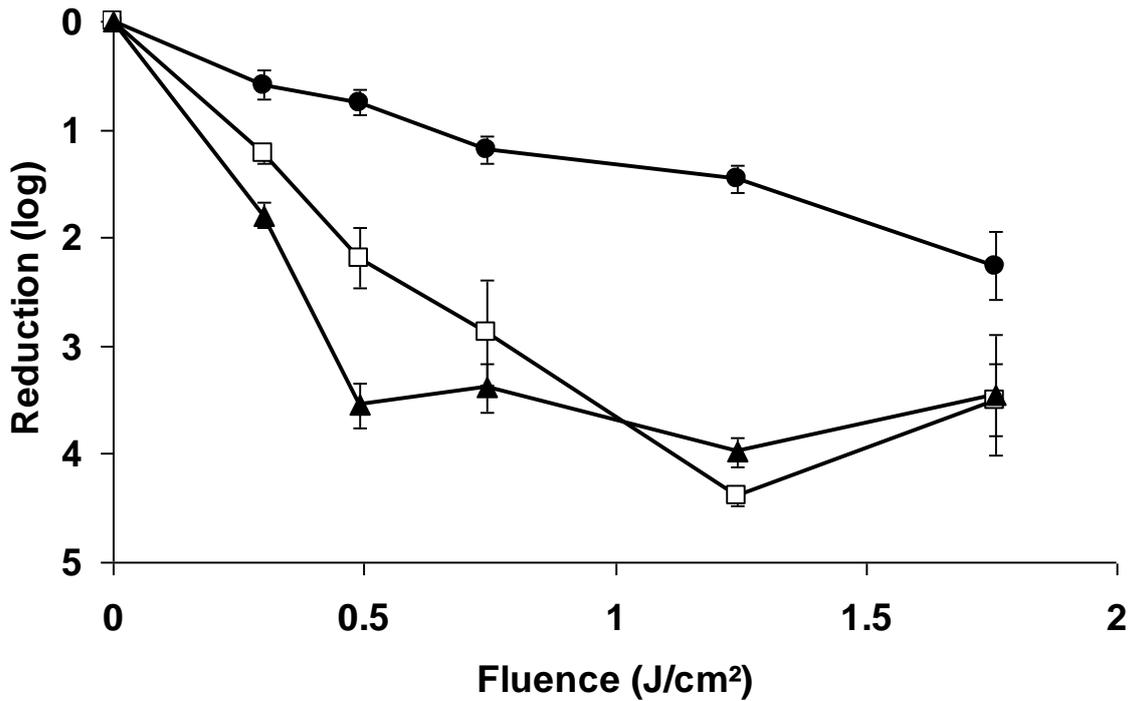


Figure 15: Inactivation des spores de *B.subtilis* DSM 402 inoculées par spots de 10 μ L (50% éthanol) sur surface polystyrène, en fonction de la fluence moyenne (J/cm²). Les courbes correspondent aux concentrations approximatives de 5 x 10⁶ spores/spot (●), 5 x 10⁵ spores/spot (□) et 5 x 10⁴ spores/spot (▲).

Table 10: Valeurs de F₃ (fluences nécessaires à une réduction de 3 log) en fonction de la concentration du spot. (*test statistique de Student*)

Concentration approximative (spores/spot de 10 μ L)	F ₃ (J/cm ²)	
	Spots en solution aqueuse	Spots en solution hydro-alcoolique
3 à 5 x 10 ⁶	>1.76 ^a	>1.76 ^a
3 à 5 x 10 ⁵	>1.76 ^a	0.76 ^b
3 à 5 x 10 ⁴	0.53 ^b	0.63 ^b

Une suspension hydro-alcoolique de spores permet de traiter des spots environ dix fois plus concentrés, grâce au meilleur étalement du spot sur polystyrène, surface très hydrophobe. Cela reste néanmoins limité, car une trop forte concentration des spots entraînera à nouveau des amas cellulaires, empêchant ainsi la pénétration des rayons lumineux, et provoquant une

faible efficacité germicide de la lumière. Il est à noter qu'une variabilité relativement élevée est obtenue lors du traitement des spots. La variabilité existe également au niveau de la récupération, et ceci d'autant plus que la concentration est faible.

L'utilisation du spray, pour inoculer de manière homogène et reproductible des monocouches de microorganismes sur des surfaces même hydrophobes, se révèle être une méthode plus simple que la méthode par dépôt de gouttelettes et très fiable, surtout lorsqu'il est nécessaire d'avoir une répartition des spores sur une large surface de traitement. La mise au point et les résultats déterminés par cette méthode vont permettre l'étude de l'efficacité décontaminante de la lumière pulsée sur différents types de surfaces d'intérêt industriel, afin d'avoir des courbes utilisables pour la modélisation des réflecteurs et la validation du traitement par LP d'emballage, ou de support industriel.

Etude de la résistance à la LP de différentes souches déposées sur polystyrène par la méthode de spray

L'étude de l'efficacité décontaminante de la lumière pulsée sur une surface polystyrène hydrophobe a été menée sur les spores de deux espèces bactériennes supplémentaires, en utilisant la méthode d'inoculation des microorganismes par spray. Les courbes de réduction logarithmiques en fonction de la fluence appliquée sont présentées ci-après, pour *B. atrophaeus* (figure 16) et *G. stearothermophilus* (figure 17)

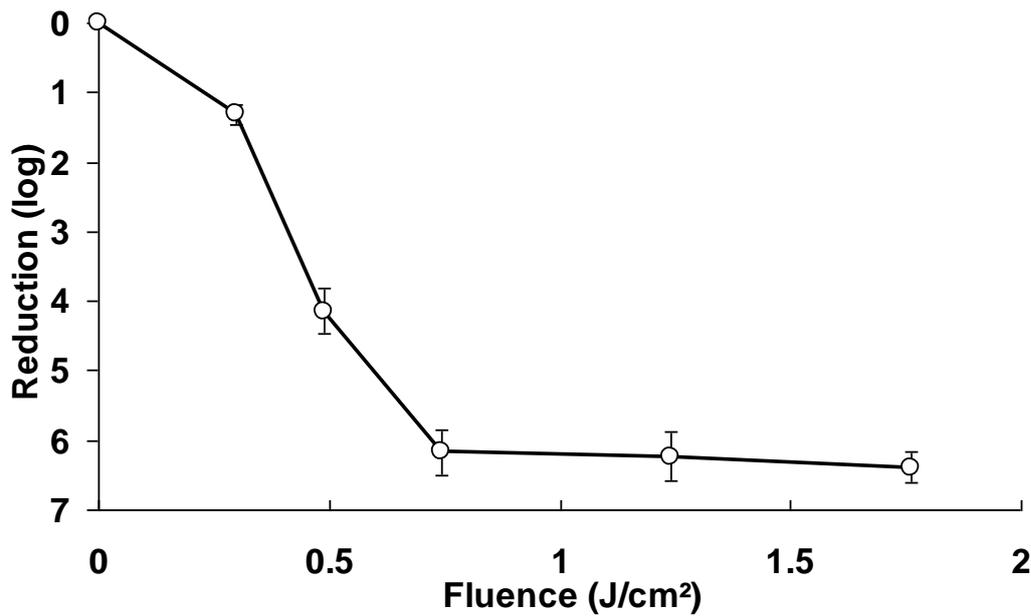


Figure 16: Inactivation de spores de *B. atrophaeus* inoculées sur polystyrène par spray, en fonction de la fluence moyenne (J/cm²). La concentration moyenne de l'inoculum est ici de 4×10^6 spores/surface inoculée

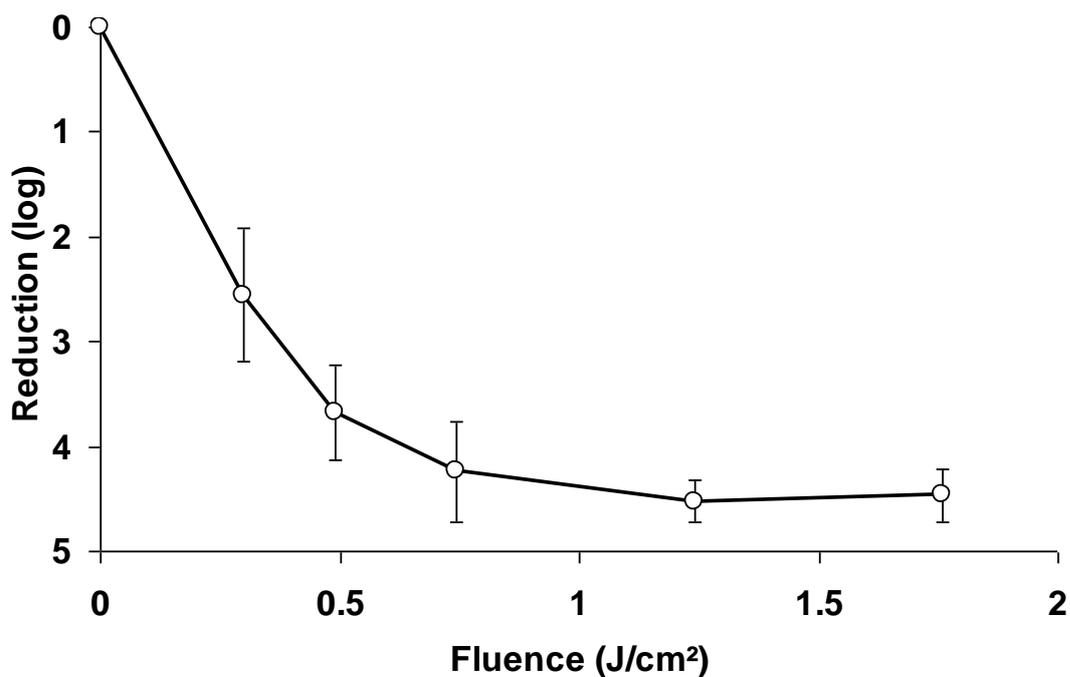


Figure 17: Inactivation de spores de *G. stearotherophilus* inoculées sur polystyrène par spray, en fonction de la fluence moyenne (J/cm²). La concentration moyenne de l'inoculum est ici de 5×10^4 spores/surface inoculée.

Les vérifications d'étalement et de dénombrement ont été effectuées selon les mêmes méthodes appliquées pour *B.subtilis*. Aucun effet de la concentration de l'inoculum n'a été mis en évidence pour ces deux nouvelles souches. Les observations microscopiques ont montré, dans chaque cas et quelle que soit la concentration de l'inoculum (jusqu'à 10^7 par surface traitée), une répartition homogène et en monocouche sur la surfaceensemencée.

Une forte décontamination a été observée dans les deux cas. Les fluences permettant d'atteindre une réduction de 3 cycles logarithmiques sont de 0.51 J/cm^2 et 0.6 J/cm^2 pour *B.atrophaeus* et *G. stearothermophilus* respectivement.

Résultats

3. Décontamination des microorganismes par lumière pulsée: importants facteurs influençant l'efficacité germicide.

Les nouvelles techniques de conservation des aliments tendent à minimiser voire à supprimer totalement l'utilisation des agents chimiques. L'efficacité décontaminante de la LP ne fait plus aucun doute (Elmnasser *et al.*, 2007b). Il est difficile de relier l'efficacité de la technologie CLARANOR avec les données déjà existantes, du fait des expressions différentes des doses de lumière appliquées. La détermination des paramètres physiques du traitement ainsi que l'acquisition de méthodes d'inoculation de différentes surfaces nous a permis d'aller un peu plus loin dans la compréhension de l'effet de la LP sur les microorganismes. Deux mécanismes d'action sont évoqués dans la littérature. Le principal mécanisme se réfère à l'effet des longueurs d'onde UV sur l'ADN. Le second mécanisme appelé photothermique expliquerait l'action des rayons lumineux par échauffement au niveau du microorganisme entraînant une altération des membranes. L'impact de chacun est encore assez mal défini. Nous avons tenté de répondre à plusieurs questions afin de trouver des pistes permettant de déterminer les éléments entrant en jeu dans l'inactivation des germes, ainsi que ceux responsables de leur résistance.

Les spores de *B. subtilis* et *A. niger* ont été traitées. L'efficacité du traitement a été évaluée sur quatre surfaces; un milieu nutritif gélosé, pour reproduire la surface humide d'un aliment, et trois surfaces d'intérêt industriel: polystyrène (PS), verre et aluminium. Afin de mettre en évidence des altérations possibles des structures externes après traitement thermique, des observations en microscopie électronique à balayage ont été faites sur les spores des deux microorganismes, déposées sur coupons PS et traitées par LP. L'importance de la composition du spectre de LP a été étudiée par plusieurs techniques. L'impact de différentes parties de la lumière émise a été déterminé, soit en coupant certaines longueurs d'ondes grâce à des filtres optiques, soit en modifiant la tension appliquée (qui modifie le pourcentage d'UV), soit en comparant la LP à un traitement UV continu basse pression. La comparaison LP/UV continu a également permis d'apprécier l'impact de la puissance du flash. Le fait de connaître avec précision les fluences émises par flash nous a mené à étudier l'influence de la répartition de la fluence en un ou en plusieurs flashes. Ce travail donne des réponses particulièrement

intéressantes pour discuter le choix de certaines expériences sur l'expression de la dose en termes de "nombre de flashes". Enfin, plusieurs espèces microbiennes d'intérêt industriel (agents pathogènes ou d'altération des aliments, souches particulièrement résistantes à certains traitements) ont été choisies, et traitées par lumière pulsée. La variabilité interspécifique des souches ainsi que les différences entre spores et cellules végétatives d'un même germe ont été définies.

Une décontamination logarithmique de plus de 5 unités a été obtenue sur des spores de *B. subtilis* déposées aussi bien sur agar, PS ou aluminium, avec une fluence de seulement 1.24 J/cm² (délivrée en 1 flash). Aucune différence de résistance des spores n'a été constatée sur ces trois surfaces. La décontamination sur verre est plus difficile, avec une réduction maximum de 4 cycles logarithmiques. Les spores d'*A.niger* sont beaucoup plus sensibles lorsqu'elles sont traitées sur PS, par rapport à la surface gélosée. La différence de résistance de *B. subtilis* et *A. niger* sur PS est beaucoup moins prononcée que sur milieu gélosé. Les observations par microscopie électronique à balayage des spores après un traitement affectant la viabilité de plus de 99.99% des cellules n'a montré aucune altération visible de la structure des spores de *B. subtilis* et *A. niger*. La fraction UV-C de la lumière pulsée est essentielle pour l'inactivation de spores de *B. subtilis* et joue un rôle majeur dans le cas d'*A. niger*: couper la fraction UV-C de la LP provoque une perte totale de l'efficacité sur les spores de *B. subtilis*, mais uniquement une forte diminution de l'efficacité dans le cas d'*A. niger*. De plus, aucune décontamination des spores d'*A. niger* n'a été obtenue avec un traitement UV continu basse pression, contrairement aux spores de *B. subtilis*, ce qui montre que la dose UV-C n'est pas suffisante pour expliquer la destruction des spores d'*A. niger*. Une grande variabilité interspécifique est visible en ce qui concerne la résistance à la LP. Les spores des espèces testées sont ici toujours nettement plus résistantes que les cellules végétatives. Enfin, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre thermorésistance et résistance à la lumière pulsée.

Article 3

Relevant factors affecting microbial decontamination by pulsed light

Article soumis

Abstract

Pulsed Light (PL) uses intense flashes of white light rich in UV for decontamination. A log-reduction higher than 5 was obtained in one flash and at fluences lower than 1.8 J/cm² on a range of spore-forming bacteria, of nonspore-forming bacteria and on yeasts spread on agar media. Vegetative cells were more sensitive than spores. The inactivation by PL of *Bacillus subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *Geobacillus stearothermophilus*, and *Aspergillus niger* spores sprayed on polystyrene was similar. The inactivation by PL of *B. subtilis* and *A. niger* spores sprayed on glass was slightly lower than on polystyrene. No alteration of the spore structures was detected by scanning electron microscopy for both PL treated *B. subtilis* and *A. niger* spores. The inactivation of *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. pumilus* and by PL or by continuous UV-C at identical fluences was not different, and was much higher by PL for *A. niger* spores. Increasing the input voltage of the lamps, which also increases the UV-C %, resulted in a higher inactivation. There was no correlation between the resistance to heat and the resistance to PL.

1. Introduction

Pulsed light (PL) can replace chemicals in decontamination operations in the food industry (Lagunas-Solar *et al.*, 2006; Ozen & Floros, 2001; Rajkovic *et al.*, 2010a). This has motivated during the last decade an increasing interest in this technology. PL is a non thermal poorly penetrating technology mostly applied for surface decontamination. PL uses intense flashes of white light (200 nm - 1100 nm wavelengths), rich in UV (200 nm – 400 nm) and produced by a xenon flashlamp (Wekhof, 2000). Inactivation by PL is commonly attributed to DNA damages caused by the UV radiations. Additional mechanisms may also be involved, such as membrane disruption and vacuole extension on yeast cells (Takeshita *et al.*, 2003). The ability of PL to kill micro-organisms is well documented (Bialka & Demirci, 2007; Uesugi & Moraru, 2009). Krishnamurthy *et al.* (2004) obtained a 7-log reduction of *S.aureus* cells in a water suspension with a 5 s treatment (Krishnamurthy *et al.*, 2004). Fernandez *et al.* (2009) observed a 5 log reduction of *L. monocytogenes* on plastic films with a fluence of 0.175 J/cm² (Fernandez *et al.*, 2009). Diverse applications have been considered on food (Gomez-Lopez *et al.*, 2005a; Ozer & Demirci, 2006; Sharma & Demirci, 2003), surface of equipment (Ozen & Floros, 2001; Rajkovic *et al.*, 2010b), packaging materials (Dunn *et al.*, 1995; Turtoi & Nicolau, 2007) or liquids (Sauer & Moraru, 2009; Smith *et al.*, 2002). Microbial targets (bacteria, moulds, yeasts, spores, vegetative cells...) (Gomez-Lopez *et al.*, 2005b; Luksiene *et al.*, 2007; MacGregor *et al.*, 1998), treated products (Fine & Gervais, 2004; Jun *et al.*, 2003; Krishnamurthy *et al.*, 2007), and pulsed light equipments (Gomez-Lopez *et al.*, 2005a; Uesugi *et al.*, 2007; Wekhof, 2000) are also very diverse. Some PL equipments require more than 50 flashes to achieve a significant inactivation, and other only 1 or 2 flashes (Rajkovic *et al.*, 2010b). Consequently, the evaluation of the PL requires a comprehensive study of the factors actually involved in the treatment efficiency. Inactivation of bacterial spores requires higher heat, continuous UV, irradiation and PL treatments than vegetative cells (Farkas, 2007). Moreover, fungal spores, such as *A. niger*, are known to have a high resistance to UV. The objective of this work is to evaluate the influence of physical (light dose, input voltage, and UV content), biological (microbial strains, spores, vegetative cells) or environmental (quality of surfaces) factors on PL efficiency. A detailed evaluation will be performed on the bacterium *B. subtilis* and on the mould *A. niger*. The work will be enlarged to various microorganisms of interest for food safety and quality. A comparison with a continuous UV treatment and with a heat treatment at 90°C will also be presented.

2. Material and methods

1) Microbial strains and preparation of cells cultures

Tested microbial species and strains, culture media and incubation temperature used in this study are summarized in table 1. A loopful of a stock culture stored at -20°C in a 30 % (v/v) glycerol solution of each bacteria and yeast strain was inoculated into 10 ml solution of the appropriate broth, and incubated for 16 h, under gentle shaking. A loopful of this culture was then inoculated into 100 ml of the appropriate broth to have an A_{600} of approx. 0.01. The culture was then incubated at temperatures and for times indicated in Table 1 and shaken at 200 rpm. After a A_{600} determination the culture was immediately used for further tests.

Table 1. Origin and culture conditions of the tested microorganisms.

Species	Strain designation ^a	Growth media ^b	Sporulation media ^b	Incubation temperature (°C)	Incubation time of cell cultures (h)
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 402 (168)	LBB, LBA	FNA	30	16
<i>B. cereus</i>	ATCC 14579	LBB, LBA	FNA	30	16
<i>B. cereus</i>	CIP 391.98	LBB, LBA	FNA	30	16
<i>B. cereus</i>	INRA KBAB4	LBB, LBA	FNA	30	16
<i>B. pumilus</i>	CIP 77.25	LBB, LBA	FNA	30	16
<i>B. licheniformis</i>	CIP 52.71	LBB, LBA	FNA	30	16
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	CIP 66.23 T	LBB, LBA	FNA	55	16
<i>B. megaterium</i>	DSM 32 T	LBB, LBA	FNA	30	16
<i>B. subtilis (atrophaeus)</i>	CIP 77.18	LBB, LBA	FNA	30	16
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	ATCC 49025	OSB, OSA	OSA	45	?
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	LBB, LBA		30	16
<i>E. coli</i>	K12	LBB, LBA		30	16
<i>Listeria innocua</i>	CIP 80.12	LBB, LBA		30	16
<i>Salmonella enteritidis</i>	CIP 82.97	LBB, LBA		30	16
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 1988 (ATCC 16404)	MEA	YGC	30	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	W 303	PDB, PDA		30	48
<i>Candida albicans</i>	UMIP 118.079	PDB, PDA		30	48

^aDSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany; ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA ; CIP Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France ; INRA, Institut national de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France ; UMIP, Collection des Champignons de l'Institut Pasteur, Paris, France.

^b: LBB, LBA, Luria Bertani broth and agar; OSA, OSB, Orange Serum broth and agar (Murray et al., 2007); MEA, Malt Extract agar; PDB, PDA, potato dextrose broth and agar (Daryany et al., 2008); FNA: Fortified Nutrient Agar (Fernandez et al., 1999); YGC, Yeast Extract Chloramphenicol (Muranyi et al., 2007)

2) Preparation of spore suspensions

A loopful of a stock culture stored at -20°C in a 30 % (v/v) glycerol solution of bacterial cells was inoculated into 10 ml of the appropriate nutrient broth, and incubated under gentle shaking at temperatures and for times indicated in Table 1. Volumes of 200 µl of this culture were spread on sporulation agar, and then incubated at the appropriate temperature (Table 1). After 7 days, all tested strains showed by microscope examination a > 90 % sporulation and were detached from agar plates using 2 x 3 mL of demineralized sterile water. The suspension was centrifuged for 15 min at 7000 x g and the pellet was suspended again in 25 ml of sterile demineralized water. This operation was twice performed. Then, the pellet was resuspended and twice centrifuged at 5000 x g and twice at 4000 x g for 15 min. After the last wash, the purified suspension was collected in 2 mL of demineralised sterile water, stored at 4°C and heated at 70°C for 10 min to inactivate vegetative cells. Spore counts were determined by

spreading 100 µL volumes of decimal serial dilutions on duplicate LB Agar plates. The spore suspensions contained from 10^6 to 10^9 spores cfu/mL.

The suspensions of purified *A.niger* spores in sterile water were prepared as previously described (Muranyi et al., 2007) and were received from the Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV), Freising, Germany. The spore suspensions contained approx. 10^7 *A. niger* spores cfu/mL.

3) Inoculation methods

Agar surfaces were inoculated with spore or vegetative cell suspensions. Polystyrene (PS), glass, and aluminum surfaces were inoculated with spore suspensions. Volumes of 100 µL of 6-7 decimal serial dilutions of a spore or cell suspensions were spread with a rake on 9 cm diameter agar plates. To prevent spore germination, suspensions were kept on melting ice during experiments. The spray inoculation of spores on PS, glass or aluminum was performed with a Mecafer AG-1 airbrush (Mecafer SA, Valence, France), connected to a compressor delivering compressed air at 2.5×10^5 Pa, as recommended by the manufacturer. Volumes of 100 µL of 6-7 decimal serial dilutions of a spore suspension containing from 10^6 to 10^9 cfu/mL were sprayed on empty polystyrene (PS) Petri dishes, on glass Petri dishes, or on 9 cm diameter aluminum coupons placed on the bottom of PS Petri dish. Petri dishes and aluminium coupons were placed vertically and perpendicularly to the spray direction. The serial dilutions were sprayed from the most diluted to the less diluted. The inoculation and enumeration method were previously checked and showed a reproducible monolayer distribution on the inoculated surfaces, with no observable clusters, and a reliable enumeration of the spores (Levy et al., 2011). A monolayer has also been observed on the agar surface. After spray inoculation, plates were dried for 24 h under a laminar flowhood at room temperature. PL treated inoculated plates were filled with 20mL molten agar media at 45-50°C. All plates were incubated at the appropriate temperature (Table 1) before colony counting.

4) Scanning electron microscopy

Spores of *B.subtilis* and *A.niger* were sprayed on 1.2 cm diameter PS coupons, and dried for 24 h at room temperature under a laminar flow hood. The coupons were then pasted on a metallic support and gold plated before observation by scanning electron microscopy at 10 kV.

5) Pulsed light treatment

Pulsed Light was delivered by lab-scale PL equipment (CLARANOR SA, Avignon, France). This equipment and the physical characteristics of the emitted light were previously studied (Levy et al., unpublished data). Briefly pulses (duration 250µs) of broad spectrum (200-1100 nm) white light rich in UV (200-400 nm) were produced by a xenon flashlamp. The PL fluences (PL doses) were from 0.17 J/cm² to 5.28 J/cm² and were measured using a joulemeter Gentec QE 12 LP, with a 1.1 cm edge square probe connected to a SOLO 2 Power and Energy meter (Gentec Electro-Optics Inc, Quebec, Canada). Those fluences were delivered in one to 10 flashes at 1 s interval, depending on the input voltage. Variations in fluences were obtained in changing the distance between the light source and the samples. The fluence applied to *A. niger* was delivered in one flash, except otherwise specified. Unflashed samples were used as controls. For the PS, glass and aluminium surfaces, the PL treatment was performed just before the addition of the molten agar. For agar surface, the PL treatment was performed in the 1-2 min following spreading. The reduction was expressed as log N₀/N, where N₀ is the initial concentration of the spread suspensions and N the number of survivors as a function of the applied fluence. The % of UV-C contained in PL decreased by a factor 2 as input voltage between 1 kV and 3 kV decreased by a factor 2 (CLARANOR SA, unpublished data). PL treatments without UV-C radiations were performed in placing optical filters above the agar plates. These filters were two pass band filters cutting off wavelengths below 225 nm and 280 nm (ORIEL, Stratford, CT, USA) or a PS Petri dish lid cutting off wavelengths below 300 nm (spectrophotometric data not shown). The transmitted fluences under the filters were measured as previously described.

6) Continuous UV-C treatment

An UV-C chamber was equipped with three low pressure mercury lamps. The 2.5 cm-diameter and 43.5 cm-long glass tubes (Mazda Eclairage, Suresnes, France) were placed in parallel at 45 cm from the target. The power delivered in experimental conditions was

measured with a radiometer (model VLX-3W, Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) and was equal to (mean \pm sd) $1.34 \pm 0.046 \cdot 10^{-3}$ W/cm². The lamps emitted germicidal UV-C at 254 nm. Tested UV-C fluences ranged from 25 to 1000 mJ/cm² and were obtained by times of treatment ranging from 19 s to 12 min. Untreated samples were used as controls. *B. subtilis* and *A. niger* spores were sprayed on PS Petri dishes. Inoculated Petri dishes were immediately placed under the lamps for UV-C exposure then filled with molten agar. The reduction was expressed as $\log N_0/N$, where N_0 is the initial concentration of the spread suspensions and N the number of survivors, as a function of the applied mean fluence.

7) Fitting of log reduction curves

A modified Weibull model was chosen to deal with microbial reduction curves. The model of Albert & Mafart (2005) describes sigmoidal survival curves with a shoulder and tailing (Albert & Mafart, 2005). The equation (1) of the model is:

$$\log_{10} \frac{N_F}{N_0} = \log_{10} \left[\left(1 - \frac{N_{res}}{N_0} \right) \times 10^{-\left(\frac{F}{F_1}\right)^p} + \left(\frac{N_{res}}{N_0} \right) \right] \quad (1)$$

where F is the fluence applied (J/cm²), N_F is the number of cfu after treatment at a fluence F , N_0 is the initial number of cfu, N_{res} is the residual bacterial number, F_1 is the fluence allowing the first 10-fold \log_{10} reduction and p is a parameter which determines the curve convexity or concavity (upward concavity: $p < 1$, upward convexity: $p > 1$). The model determines the last 3 parameters. The fluences allowing a n log reduction were calculated using equation (2):

$$F_n = F_1 \left[\log_{10} \left(\frac{1 - \frac{N_{res}}{N_0}}{10^{-n} - \frac{N_{res}}{N_0}} \right) \right]^{\frac{1}{p}} \quad (2)$$

F_1 , p and N_0 were calculated using the Microsoft® Excel 2002 solver function.

8) Determination of heat resistance

Moist-heat resistance at 90°C was performed on a spore suspension in capillary tubes heated for 5, 10, 15, 20, 30 and 60 minutes (Leguerinel *et al.*, 2007). At each time interval, tubes were removed and immediately cooled on ice water. For each experiment, a control sample was submitted to a heat treatment at 70°C during 15 minutes. The time to first decimal reduction (δ) and the curvature index p were calculated using equation (3) (Mafart *et al.*, 2002):

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (3)$$

where N_0 and N are the initial population and population at time t , and using the Microsoft® Excel 2002 solver function.

The time to a 3 log reduction ($t_{.3}$) was calculated using equation (4)

$$t_3 = \delta \times 3^{\frac{1}{p}} \quad (4)$$

9) Statistical analysis

The mean values and standard deviation were calculated from data obtained from at least three independent experiments done with *B. subtilis* and *A. niger* (different dates, different cells cultures and spores preparations), and from at least two independent experiments with others species, unless otherwise specified. Means were compared by Student's t-test or by Tukey's Honest Significant Difference test (SPSS Systat version 9, Chicago, USA).

3. Results

1) Inactivation of *B. subtilis* and *A. niger* on different surfaces

Figure 1A shows the log reduction curves of *B. subtilis* spores spread on agar, PS, aluminum and glass. The input voltage was 2.5 kV. A 3 log-reduction was obtained on all tested surfaces with a fluence of 0.5 J/cm². A 5-log reduction was obtained on agar, PS and aluminium with a fluence equal to 1.25 J/cm². The log reduction on glass was significantly lower ($P < 0.05$) for fluences of 1.24 J/cm² and 1.76 J/cm². The figure 1B shows the log reduction curves of *A.*

niger on agar, PS or glass. The reductions are clearly dependent on the surface properties. The lowest reduction was observed on agar and the highest on PS. On agar, the log reduction was lower than 1 even for fluence equal to 1.25 J/cm². At the same fluence a 5 log reduction was reached only on PS. The comparison of inactivation curves of figures 1A and 1B shows that *A. niger* spores are much more resistant than *B. subtilis* spores when inoculated on agar. Although F1, F3 and F5 values were significantly higher for *A. niger* spores when inoculated on PS, the differences with *B. subtilis* spores were much less pronounced than those reported for agar inoculation..

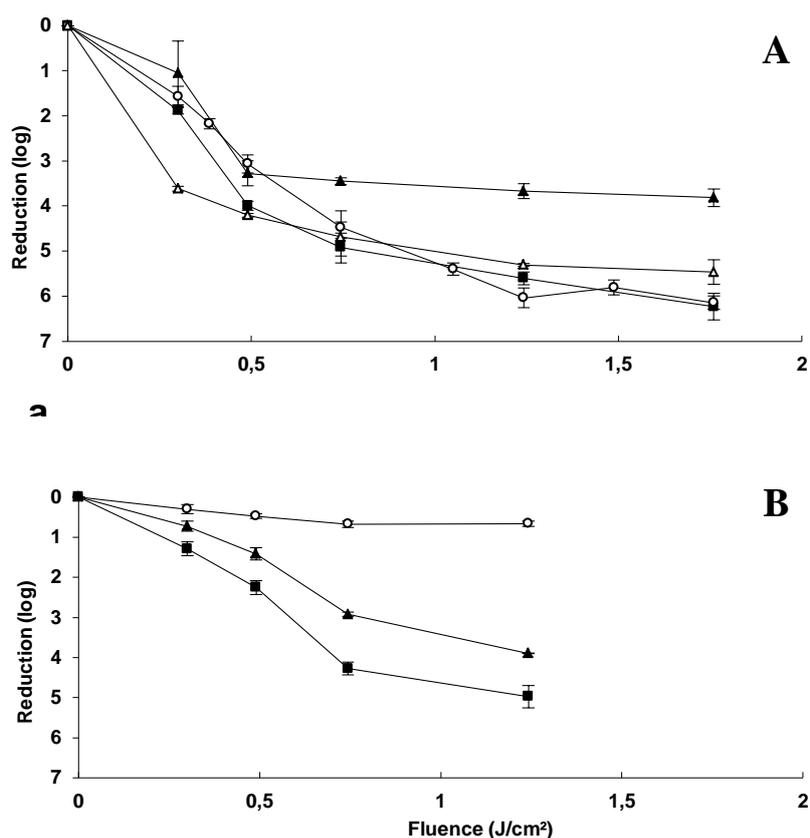


Figure 1. Inactivation by pulsed light of *B.subtilis* spores (A) and *A.niger* spores (B) on agar surface (○), polystyrene (■),aluminium (Δ) and glass (▲). The input voltage was 2.5 kV. Bars represent standard error

No test on aluminium with *A. niger* spores

2) SEM observation of *B. subtilis* and *A. niger* after a PL treatment

B.subtilis and *A.niger* spores were spread on a PS surface and treated by two flashes each at a fluence of 1.8 J/cm² and under an input voltage of 2.5 kV. This treatment consistently resulted in at least 4 log reductions in numbers of spores of both micro-organisms (Figure 1). Treated and untreated spores looked very similar for both *B.subtilis* and *A.niger* spores (Figure 2). In particular no disruption in spore structures, such as spore blowing, was observed. The few altered *B. subtilis* spores depressed in their center were found in the same proportion in both treated and untreated samples.

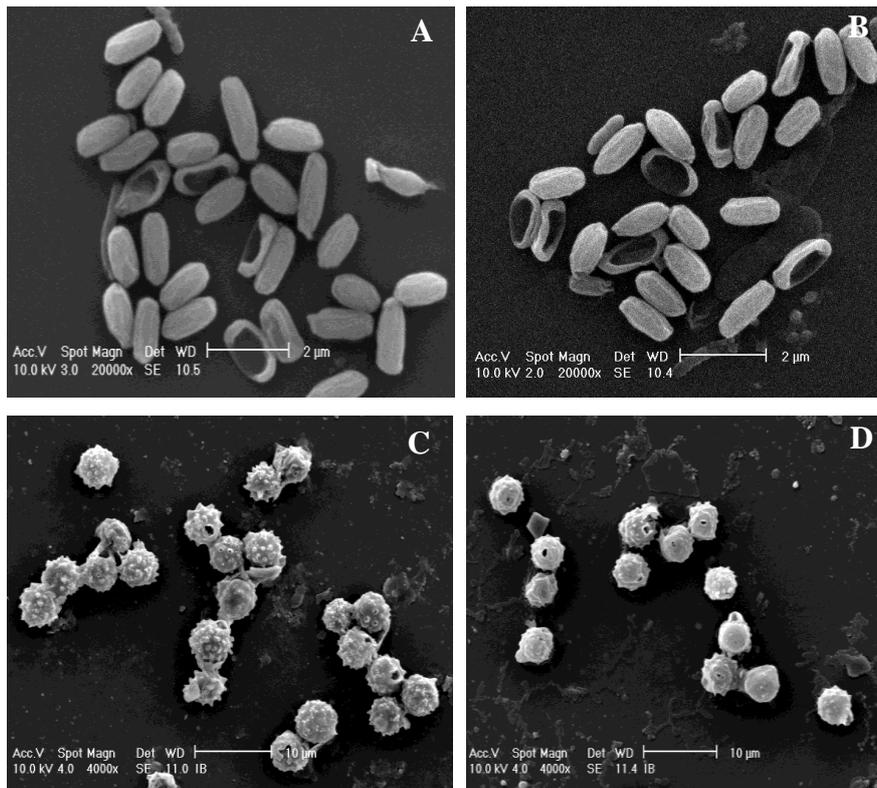


Figure 2. Scanning electron microscopy images of *B.subtilis* spores (A, B) and *A. niger* spores (C,D), untreated (A,C) and treated (C, D) by two light pulses at 1.8 J/cm² each with an input voltage of 2.5kV

3) Influence of the composition of the transmitted PL spectrum

Cutting off wavelengths below 300 nm corresponding to UV-C made the PL treatment mostly ineffective (Figure 3A and 3B). The inactivation of *B. subtilis* spores was close to 0 for fluences varying between 0.2 and 1.75 J/cm². With *A. niger* sprayed on PS some reduction in the number of viable spores (approx. 2 log-reductions with a fluence of 1.5 J/cm²) was

obtained as wavelengths below 300 nm were cut-off. However, this reduction was significantly lower than that obtained with the full spectrum, which reached at least 5 log reductions for fluences higher than 1.5 J/cm² (Figure 3B). Experiments on both microorganisms illustrate the major role played by the UV-C wavelengths in the PL treatment. In addition PL in which wavelengths shorter than 225 nm were eliminated was as efficient as unfiltered PL on *B. subtilis* spores, confirming the major role played by the 225 nm – 300 nm fraction containing UV-C.

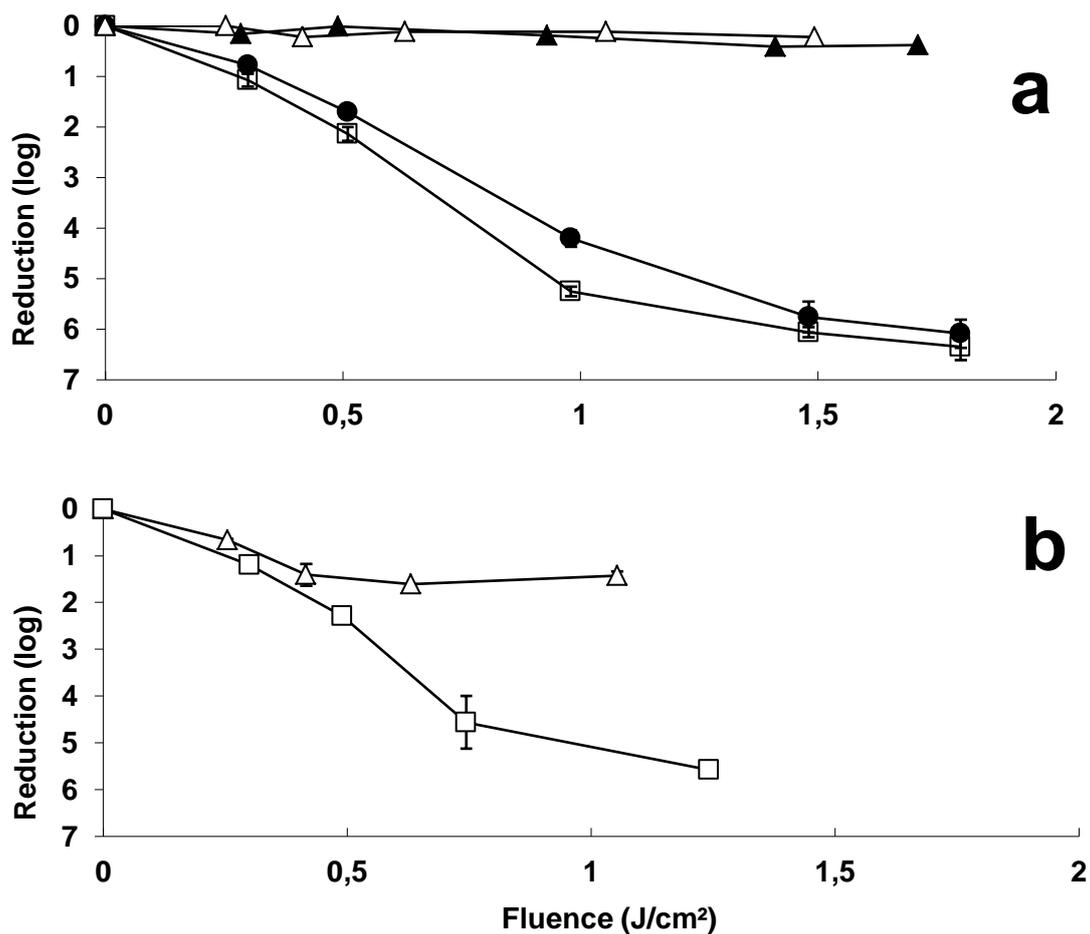


Figure 3. Inactivation by pulsed light of (A) *B. subtilis* spores on agar medium as a function of total fluence (□), 225-1100 nm fluence (●), 280-1100 nm fluence (▲) and 300-1100 nm fluence (△) and (B) *A. niger* spores on polystyrene as a function of total fluence (□) and 300-1100 nm fluence. The input voltage was 2.5 kV. Bars represent standard error.

4) Influence of the delivery of PL energy at different input voltages

Reducing the input voltage in PL treatment reduces the % of UV-C (Schaefer *et al.*, 2007). The inactivation by a range of fluences obtained with input voltages of 1 kV, 1.5 kV and 2.5 kV were tested on *B. subtilis* spores spread on agar (Figure 4). F1, F3 and F5 values were significantly higher ($P < 0.05$) when spores were treated with PL emitted under an input voltage of 1 kV and 1.5 kV, compared with 2.5 kV

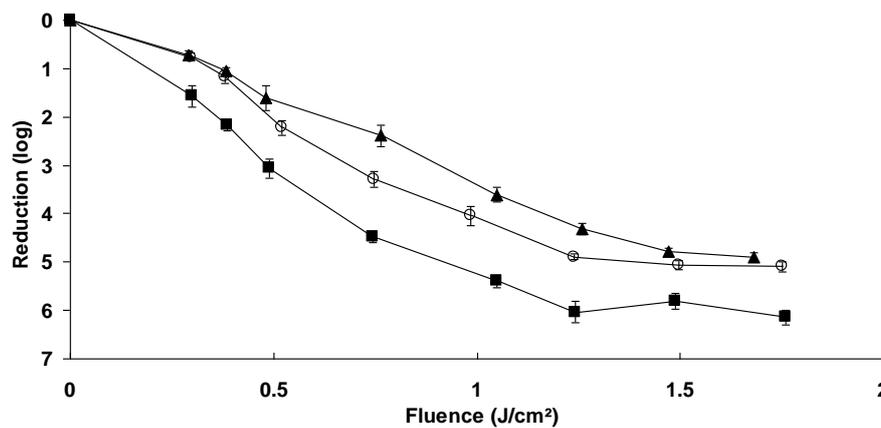


Figure 4. Inactivation by pulsed light delivered input voltages were 2.5 kV (■), 1.5 kV (○) and 1 kV (▲) of *B.subtilis* spores spread on agar medium. Bars represent standard error.

5) Delivery of PL energy by accumulation of flashes

The delivery of fluence in one flash or in several flashes was considered. With *B. subtilis* and *B. cereus* ATCC14579 spores and vegetative cells spread on agar, the delivery of PL in 1 or up to 5 flashes, at a wide range of fluences comprised between 0.5 J.cm2 to 1.5 J.cm2 and under input voltages of 2 kV, 2.5 kV and 3 kV, led to the same reductions in viable cell counts (data not shown). For *A. niger*, splitting up a target fluence in several flashes had a strong effect on the inactivation of spores sprayed on PS (Figure 5). The multiplication of flashes, each at a fluence of 0.17 J/cm2 was almost inefficient, even as the total received fluence reached 1.7 J/cm2. With a slightly higher fluence per flash (0.3 J/cm²) it was possible to obtain a 2 log reduction with 3 flashes.

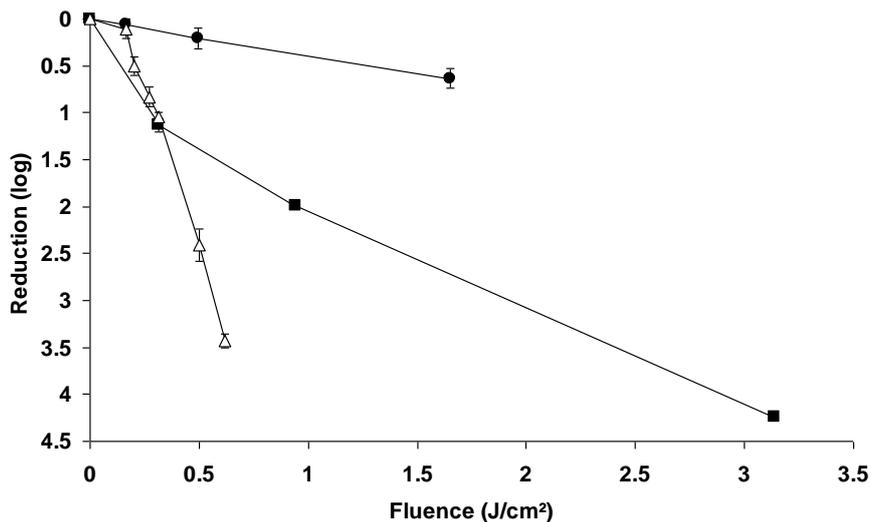


Figure 5. Inactivation by pulsed light on *A. niger* sprayed on PS as a function of fluence delivered in one flash (Δ) or in 1, 3 and 10 flashes at 0.16 J/cm² per flash (\bullet) or at 0.3 J/cm² per flash (\blacksquare). The input voltage was 2 kV. Bars represent standard error.

6) Compared inactivation of *B. subtilis* and *A. niger* spores by PL and continuous UV-C

A continuous UV-C treatment at 1.3×10^{-3} W/cm² with low pressure mercury lamps was compared to PL treatment delivering the same UV-C doses. The figure 6A shows the log reduction of *B. subtilis* spores, spread on agar as a function of the UV-C dose for PL or continuous UV-C light. The differences in the log reductions between both treatments were not significant ($P > 0.1$) for the lowest tested doses and were marginal for higher UV-C doses. The time needed to obtain a 4-log-reduction of *B. subtilis* spores was approx. 200000 times shorter with PL than with continuous UV-C. Similarly the inactivation of spores *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, and *B. cereus* strain KBAB4 by PL and by continuous UV-C with the same UV-C fluence was almost identical. The inactivation of *G. stearothermophilus* spores was higher with PL. The difference progressively increased as the delivered fluence increased. At the maximal fluence tested a 2 log reduction was obtained with continuous UV-C and a 4 log reduction was obtained with PL (data not shown). With *A. niger* spread on PS there was almost no reduction with continuous UV-C (Figure 6B) and also with a 3-fold higher UV-C dose (data not shown). In contrast there was a marked reduction with PL even with the lowest tested fluence (Figure 6B).

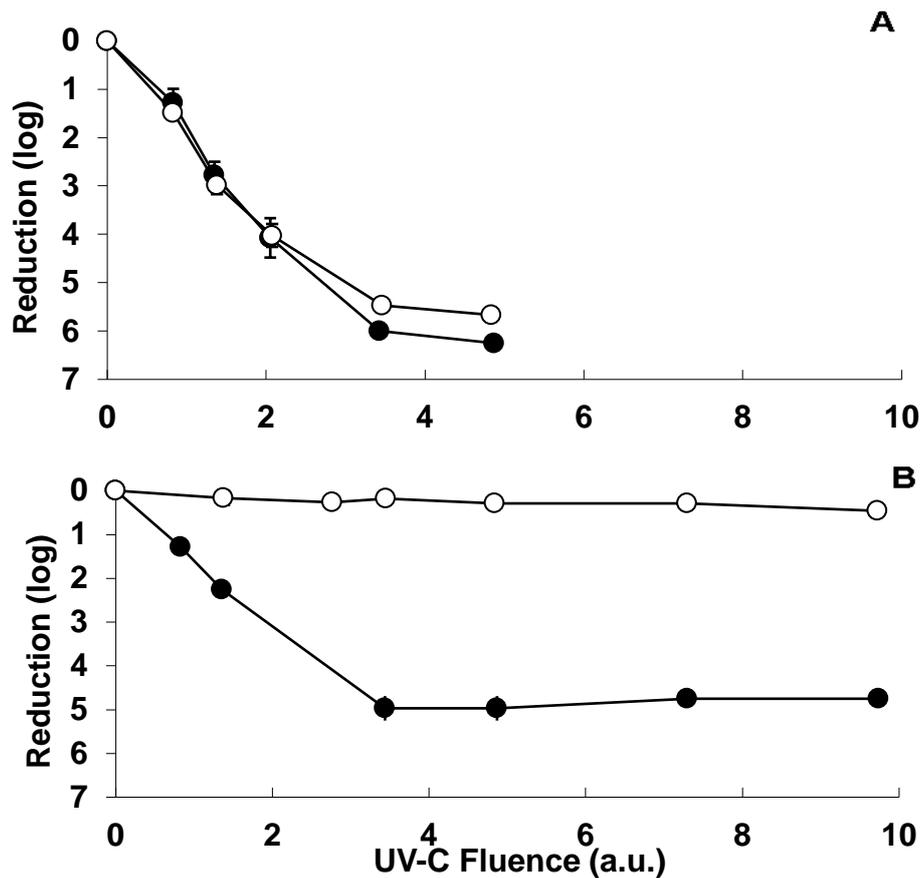


Figure 6. Inactivation of *B.subtilis* spores on agar (A) and *A.niger* spores on polystyrene (B) as a function of the UV-C fluence of pulsed light at 2.5 kV (●) and continuous UV-C light (254nm) (○). Bars represent standard error. a.u.: arbitrary units.

7) Comparison of the sensitivity to PL of some relevant microorganisms to food safety and quality

Vegetative cells of all tested bacteria species were highly sensitive to PL and showed a 5-log reduction at doses lower than 0.5 J/cm² under an input voltage of 2.5 kV (Table 2). Cells of *C. albicans* and *S. cerevisiae* were slightly more resistant at a fluence of 0.3 J/cm², which is expressed by higher F3 values. Bacterial spores of all tested species were more resistant than vegetative cells, despite some differences between strains (Table 2). The inactivation rates also showed some differences between strains: for instance the highest F1 values did not correspond to the highest F5 values. *A. niger* spores were the most resistant of the panel of microorganisms tested. The PL resistance of spores of *B. subtilis*, *G. stearotherophilus*, *B. cereus* strain KBAB4, *B. atrophaeus* and *A. niger* sprayed on PS was mostly lower than the

PL resistance of spores of the same strains spread on agar; this was particularly pronounced for *A. niger* spores. There was no relation between the heat resistance expressed by the first decimal reduction times (delta values at 90°C) or time to 3 log reduction and resistance to PL expressed by F1 or F3. For instance the resistance to PL of *B. cereus* strain KBAB4 and of *G. stearothermophilus* was quite similar, while the resistance to heat was highly different. In addition *A. niger* was by far the most heat sensitive, while it was the most PL resistant of the tested micro-organisms.

Table 2. Resistance to PL of microorganisms inoculated on agar or on polystyrene and comparison to their resistance to moist-heat

Microorganisms	Resistance to Pulsed Light on agar	Resistance to Pulsed Light on polystyrene	Heat resistance at 90°C
	F ₁ , F ₃ , F ₅ ^a (J/cm ²)	F ₁ , F ₃ , F ₅ (J/cm ²)	δ value, t ₃ ^b values (min)
<i>B. subtilis</i> DSM 402, spores	0.24, 0.53, 0.8	0.16, 0.40, 0.60	15, 34
<i>B. cereus</i> CIP 391.98, spores	nd ^c , 0.44, 1.18	nt ^c	Nt
<i>B. cereus</i> KBAB4, spores	0.35, 0.98, 1.66	0.03, 0.32, 1.0	0.4, 5.5
<i>B. pumilus</i> CIP 77.25, spores	0.2, 0.5, 0.77	nt	33, 54
<i>B. licheniformis</i> CIP 52.71, spores	nd, 0.24, 1.96	nt	14, > 60
<i>G. stearothermophilus</i> CIP 66.23 T, spores	nd, 1.05, 1.61	0.15, 0.60, >1.76	> 60, > 60
<i>B. megaterium</i> DSM 32 T, spores	0.33, 0.92, 1.62	nt	21, > 60
<i>B. subtilis (atrophaeus)</i> CIP 77.18, spores	0.35, 0.68, 0.91	0.27, 0.51, 0.70	Nt
<i>A. acidoterrestris</i> ATCC 49025 T, spores	0.53, 1.13, 1.61	nt	8.4, 27
<i>B. subtilis</i> DSM 402, cells	nd, 0.14, 0.36	nt	Nt
<i>B. cereus</i> ATCC 14579, cells	nd, 0.02, 0.2	nt	nt
<i>B. cereus</i> CIP 391.98, cells	nd, 0.06, 0.22	nt	nt
<i>B. cereus</i> KBAB4, cells	nd, 0.07, 0.22	nt	nt
<i>B. pumilus</i> CIP 77.25, cells	nd, 0.14, 0.48	nt	nt
<i>B. licheniformis</i> CIP 52.71, cells	nd, 0.02, 0.11	nt	nt
<i>B. megaterium</i> DSM 32 T, cells	nd, 0.020, 0.48	nt	nt
<i>E. coli</i> ATCC 25922, cells	nd, 0.03, 0.15	nt	nt
<i>E. coli</i> K12, cells	nd, 0.16, 0.3	nt	nt
<i>L. innocua</i> , CIP 80.12, cells	nd, 0.22, 0.35	nt	nt
<i>S. enteritidis</i> CIP 82.97, cells	nd, 0.03, 0.11	nt	nt
<i>S. cerevisiae</i> w303, cells	0.19, 0.34, 0.45	nt	nt
<i>C. albicans</i> UMIP 118.079, cells	nd, 0.26, nd	nt	nt
<i>A. niger</i> DSM 1988, spores	1.24, 2.24, >3.52	0.26, 0.57, 0.80	nd, <5

^aFluence to 1 log, 3 log, and 5 log reduction. See Material and Methods for details

^bTime to first log reduction and to 3 log reduction. See Material and Methods for details

^cnd: not determined; nt: not tested

^d*A. niger* heat resistance tested at 60°C instead of 90°C

4. Discussion

The pulsed light treatment was able to achieve in only one flash several log reductions on a wide range of microorganisms and on a range of surfaces. Tested fluences and number of flashes were in the low range among those reported in the literature. For instance only a few papers reports 2 or 3 log reduction on bacterial spores with the same range of fluences or the same low number of flashes as used in this work (Elmnasser et al., 2007). Some studies may report a high PL efficiency with a low dose on vegetative cells (Fernandez et al., 2009; Rajkovic et al., 2010), but most of the time high inactivations are obtained with treatments higher than that used in this work (Bialka et al., 2008; MacGregor et al., 1998; Uesugi and Moraru, 2009). Spores of bacteria were more resistant than vegetative cells of the same organisms. In our hands the F5 values of spores were up to 18-fold higher than F5 values of vegetative cells. This is significant, but probably much lower than the difference in resistance to moist-heat between spores and vegetative cells. Inactivation of spores requires an approx. 45°C higher temperature than inactivation of vegetative cells (Coleman et al., 2007; Warth, 1978). This means, in assuming z values of 10°C, > 1000-fold longer moist-heat treatments at any temperature to achieve on spores the same inactivation as on vegetative cells of a given bacterium.

High log reductions were also obtained with spores of several *Bacillus* spp. and of *A. niger* on diverse surface materials common in the food industry, such as PS, aluminium and glass. Inactivation on those surfaces was usually higher than on agar. Survival was depending on the surface, as shown for instance with a better survival of *B. subtilis* and *A. niger* spores inoculated on glass. Microscopic examinations of the tested glass plates did not reveal any surface irregularities that could create a shading effect and the dispersion of the microorganisms was similar to that observed on PS (data not shown). Several authors reported possible interactions between PL or UV treated surface and inoculated microorganisms because of reflection properties, absorbance of the material or chemical reactions of the material (Woodling and Moraru, 2005; Zacarias et al., 2010). In the present work we are not able to determine the origin of the better survival observed.

The UV-C radiations play a major role in the decontamination by PL for several reasons: (i) PL was mostly inefficient on *B. subtilis* spores when UV-C wavelengths were cut off; (ii) reducing the flashlamp input voltage that decreases the % of UV-C in PL significantly lowered the efficiency of the treatment on *B. subtilis* spores even when the total fluence was

maintained; (iii) UV-C fluences delivered by UV-C lamps in a continuous treatment or by PL had the same effect on *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus* and *B. atrophaeus* spores. However, our *A. niger* particular data suggest that a photothermal (i.e. momentaneous microscopic overheating effect) cannot be excluded (Gomez-Lopez et al., 2007; Wekhof et al., 2001). A blowing of *A. niger* spores after a PL treatment was attributed to this photothermal effect (Wekhof et al., 2001) but this was never observed in this work on both *A. niger* and *B. subtilis* spores. *A. niger* was much more resistant when PL treated on agar than when treated on PS or glass. Considering that *A. niger* spores are much more sensitive to heat than spores of spore-forming bacteria, we may hypothesize that a heat diffusion in agar higher than in a non-aqueous dry surface is at the origin of this lower sensitivity on agar of PL treated *A. niger* spores. There was also some *A. niger* inactivation when UV-C wavelengths were cut off. Factors other than UV-C such as heat, UV-A and UV-B radiation may also play a role (Wekhof, 2000). Effects of radiations other than UV-C will depend on the proper sensitivity of each microorganism and of its environment at the time of the PL treatment.

In conclusion PL can be efficient on a wide range of microorganisms including highly heat resistant species such spore forming bacteria. Decontamination by PL has to account for possible interactions between the target surface and the microorganism. Further research on the mechanisms of action of PL on bacteria and on eukaryotic microorganisms (yeasts and moulds) is needed for précising the possible applications of the technology in decontamination processes..

Acknowledgements

This work is a partial fulfillment of author's C. Levy PhD Thesis. She has received a grant from the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie*, Paris, France. The authors would like to thank Isabelle Bornard for the microscopic imaging and Claire Bérard for skilful technical assistance.

References

- Albert, I. & Mafart, P. (2005).** A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* **100**, 197-211.
- Bialka, K. L. & Demirci, A. (2007).** Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-Light. *Journal of Food Science* **72**, M391-M396.
- Bialka, K. L., Demirci, A., Walker, P. N. & Puri, V. M. (2008).** Pulsed UV-light penetration of characterization and the inactivation of *Escherichia coli* K12 in solid model systems. *Transactions of the Asabe* **51**, 195-204.
- Coleman, W.H., De, C., Li, Y.Q., Cowan, A.E., Setlow, P. (2007).** How moist heat kills spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **189**, 8458-8466.
- Daryany, M. K. A., Massudi, R. & Hosseini, M. (2008).** Photoinactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* suspended in phosphate-buffered saline-A using 266- and 355-nm pulsed ultraviolet light. *Current Microbiology* **56**, 423-428.
- Dunn, J., Ott, T. & Clark, W. (1995).** Pulsed-light treatment of food and packaging. *Food Technology* **49**, 95-98.
- Elmnasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A. & Federighi, M. (2007).** Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **53**, 813-821.
- Farkas, J. (2007).** Physical methods of food preservation. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 685-712.
- Farrell, H. P., Garvey, M., Cormican, M., Laffey, J. G. & Rowan, N. J. (2010).** Investigation of critical inter-related factors affecting the efficacy of pulsed light for inactivating clinically relevant bacterial pathogens. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 1494-1508.
- Fernandez, A., Salmeron, C., Fernandez, P. S. & Martinez, A. (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, M., Manzano, S., de la Hoz, L., Ordonez, J. A. & Hierro, E. (2009).** Pulsed light inactivation of *Listeria monocytogenes* through different plastic films. *Foodborne Pathogens and Disease* **6**, 1265-1267.
- Fine, F. & Gervais, P. (2004).** Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection* **67**, 787-792.
- Gomez-Lopez, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V. & Debevere, J. (2005a).** Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 460-470.

Gomez-Lopez, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V. & Debevere, J. (2005b). Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* **103**, 79-89.

Gomez-Lopez, V. M., Ragaert, P., Debevere, J. & Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in food science & technology* **18**, 464-473.

Jun, S., Irudayaraj, J., Demirci, A. & Geiser, D. (2003). Pulsed UV-light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. *International Journal of Food Science and Technology* **38**, 883-888.

Krishnamurthy, K., Demirci, A. & Irudayaraj, J. (2004). Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light sterilization. *Journal of Food Protection* **67**, 1027-1030.

Krishnamurthy, K., Demirci, A. & Irudayaraj, J. M. (2007). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-Light treatment system. *Journal of Food Science* **72**, M233-M239.

Lagunas-Solar, M. C., Pina, C., MacDonald, J. D. & Bolkan, L. (2006). Development of pulsed UV light processes for surface fungal disinfection of fresh fruits. *Journal of Food Protection* **69**, 376-384.

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

Levy, C., Bornard, I., Carlin, F. (2011). Deposition of *Bacillus subtilis* spores using an airbrush-spray or spots to study surface decontamination by pulsed light. *Journal of Microbiological Methods* **84**, 223-227.

Luksiene, Z., Gudelis, V., Buchovec, I. & Raudeliuniene, J. (2007). Advanced high-power pulsed light device to decontaminate food from pathogens: effects on *Salmonella typhimurium* viability in vitro. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1545-1552.

MacGregor, S. J., Rowan, N. J., McIlvaney, L., Anderson, J. G., Fouracre, R. A. & Farish, O. (1998). Light inactivation of food-related pathogenic bacteria using a pulsed power source. *Letters in Applied Microbiology* **27**, 67-70.

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

Muranyi, P., Wunderlich, J., Heise, M. (2007). Sterilization efficiency of a cascaded dielectric barrier discharge. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1535-1544.

Murray, M. B., Gurtler, J. B., Ryu, J. H., Harrison, M. A. & Beuchat, L. R. (2007). Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology* **115**, 59-69.

Ozen, B. F. & Floros, J. D. (2001). Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. *Trends in food science & technology* **12**, 60-67.

Ozer, N. P. & Demirci, A. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *International Journal of Food Science and Technology* **41**, 354-360.

Rajkovic, A., Smigic, N. & Devlieghere, F. (2010a). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology* **141**, S29-S42.

Rajkovic, A., Tomasevic, I., Smigic, N., Uyttendaele, M., Radovanovic, R. & Devlieghere, F. (2010b). Pulsed UV light as an intervention strategy against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of a meat slicing knife. *Journal of Food Engineering* **100**, 446-451.

Sauer, A. & Moraru, C. I. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider, using pulsed light treatment. *Journal of Food Protection* **72**, 937-944.

Schaefer, R., Grapperhaus, M., Schaefer, I. & Linden, K. (2007). Pulsed UV lamp performance and comparison with UV mercury lamps. *Journal of Environmental Engineering and Science* **6**, 303-310.

Sharma, R. R. & Demirci, A. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modeling. *Journal of Food Science* **68**, 1448-1453.

Smith, W. L., Lagunas Solar, M. C. & Cullori, J. S. (2002). Use of pulsed ultraviolet laser light for the cold pasteurisation of bovine milk. *Journal of Food Protection* **65**, 1480-1482.

Takeshita, K., Shibato, J., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K. & Itoh, M. (2003). Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 151-158.

Turtoi, M. & Nicolau, A. (2007). Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material. *Journal of Food Engineering* **83**, 47-53.

Uesugi, A. R., Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2007). Inactivation kinetics and factors of variability in the pulsed light treatment of *Listeria innocua* cells. *Journal of Food Protection* **70**, 2518-2525.

Uesugi, A. R. & Moraru, C. I. (2009). Reduction of *Listeria* on ready-to-eat sausages after exposure to a combination of pulsed light and nisin. *Journal of Food Protection* **72**, 347-353.

Warth, A.D. (1978). Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* **134**, 699-705.

Wekhof, A. (2000). Disinfection with flash lamps. *Pda Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **54**, 264-276.

Wekhof, A., Trompeter, F. J. & Franken, O. (2001). Pulsed UV Disintegration (PUVD): a new sterilisation mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. In *The First International Conference on Ultraviolet Technologies*, pp. 15. Washington D.C.

Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2005). Influence of surface topography on the effectiveness of pulsed light treatment for the inactivation of *Listeria innocua* on stainless-steel surfaces. *Journal of Food Science* **70**, M345-M351.

Zacarias, S. M., Vaccari, M. C., Alfano, O. M., Irazoqui, H. A. & Imoberdorf, G. E. (2010). Effect of the radiation flux on the photocatalytic inactivation of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **214**, 171-180.

Influence du stade de culture de cellules ou du milieu de sporulation sur la résistance de *B. subtilis* à la lumière pulsée

Les résultats de décontamination des cellules végétatives bactériennes ont été obtenus sur des cultures cellulaires de 16h. Il est judicieux de se demander si le stade de croissance des cellules végétatives peut avoir une influence sur la résistance à la LP. En effet, dans le cas des traitements à la chaleur, plusieurs souches de *S. aureus* ont montré une plus grande thermorésistance lorsque les cellules se trouvaient en phase stationnaire de croissance plutôt qu'en phase exponentielle (Cebrian *et al.*, 2007). L'impact de la phase de croissance des cellules végétatives sur la résistance à la lumière pulsée a ainsi été étudié sur *B. subtilis* 168 et *E. coli* K12, cultivées en milieu LB liquide.

Influence du stade de culture sur la résistance à la LP de cellules végétatives de B. subtilis et E. coli

Les cellules végétatives ont été traitées par LP à différents stades de leur croissance (figure 17). Aucune influence du stade sur la résistance des cellules d'*E. coli* à la LP n'a été mise en évidence: quel que soit leur état physiologique, elles présentent toujours une grande sensibilité au traitement, avec une destruction très marquée (supérieure à 5 réductions logarithmiques dès 0,3 J/cm² (figure 18)). En revanche, en phase stationnaire avancée, les cellules végétatives de *B. subtilis* sont plus résistantes face à la lumière pulsée que lors des stades précédents (figure 19).

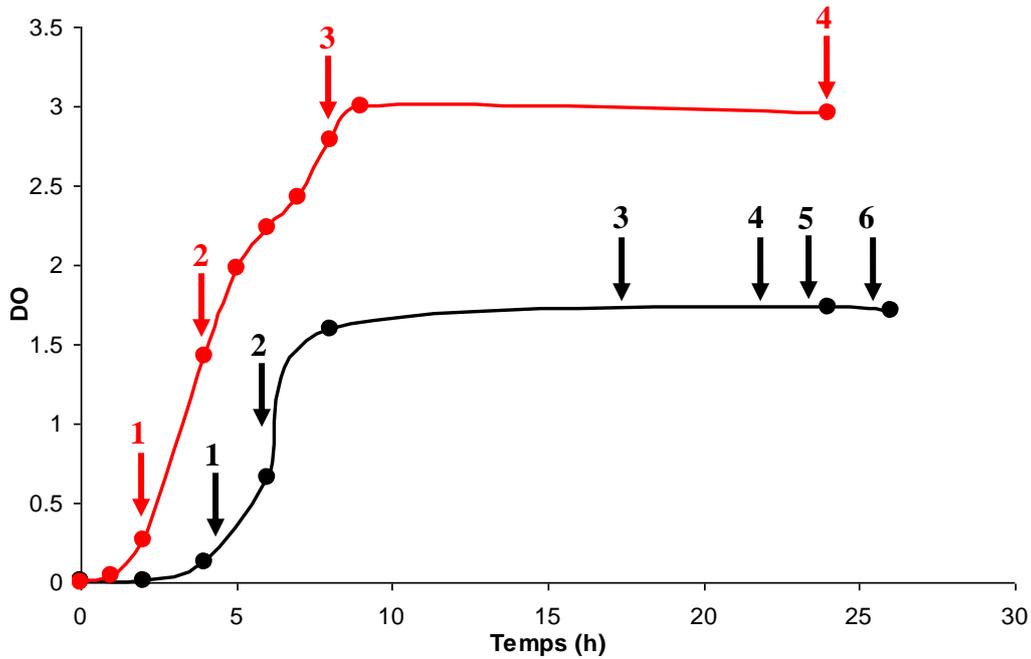


Figure 17: Croissance de *B.subtilis* (—) et *E.coli* (—) à 30°C. Les cultures ont été réalisées en flacons de 500 mL contenant 100 mL de milieu LB mise en incubation à 30°C, 200 rpm. La DO_{600} initiale de l'inoculum était de 0,01. Les flèches représentent les stades de croissance auxquels les cellules ont été traitées par la lumière pulsée, après un étalement sur milieu gélosé.

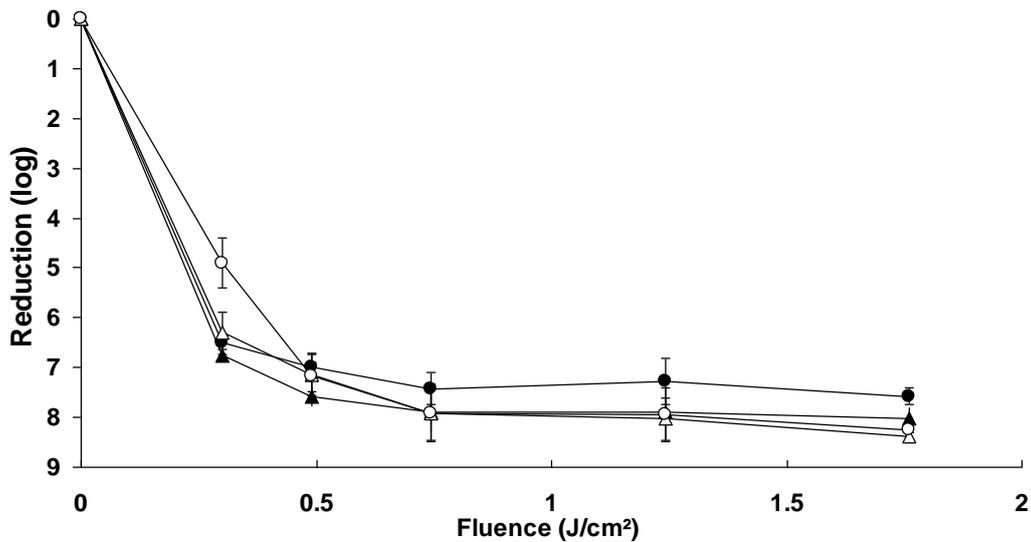


Figure 18: Inactivation des cellules végétatives d'*E. coli* traitées par lumière pulsée à différents stades de la phase de croissance: 1-début de phase exponentielle (●), 2-milieu de phase exponentielle (▲), 3-début de phase stationnaire (Δ), 4-phase stationnaire avancée (○) (les stades de croissance sont représentés sur la figure 17)

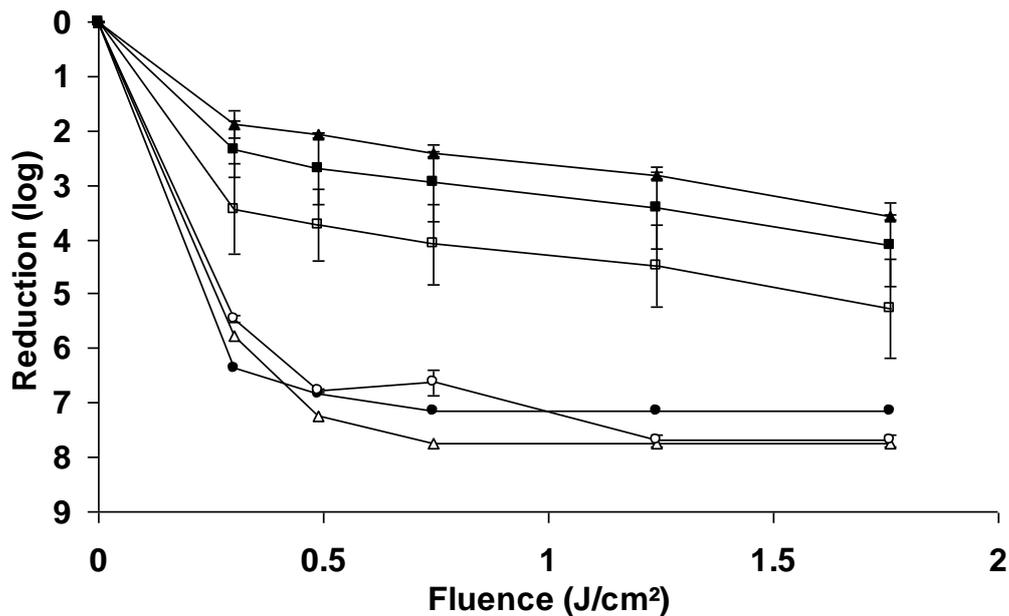


Figure 19: Inactivation des cellules végétatives de *B. subtilis* traitées par lumière pulsée à différents stades de la phase de croissance: 1-début de phase exponentielle (●), 2-début de phase stationnaire (△), phase stationnaire avancée: points 3 (○), 4 (□), 5 (■), et 6 (▲).

Afin de vérifier que l'augmentation de la résistance des cellules de *B. subtilis* n'est pas simplement due à l'augmentation de débris cellulaires ou de macromolécules (de type mucilage) dans le milieu extracellulaire, le traitement par LP a été testé sur des cellules de *B. subtilis* préalablement lavées. La décontamination des cellules lavées est identique à celle obtenue sur des cellules non lavées. L'ombrage créé par le matériel extracellulaire accumulé lors de la culture est négligeable, et ne peut donc pas expliquer la plus forte résistance des cellules en phase stationnaire avancée.

La mise en place de la sporulation chez *B. subtilis* pourrait avoir un lien avec les comportements observés. En effet, l'apparition de la résistance est un phénomène qui n'a pas lieu chez *E. coli*. Des expériences complémentaires de dénombrements de spores dans la culture cellulaire, ont révélé que l'apparition des spores se faisait environ 1 à 2 h après l'acquisition de la résistance des cellules végétatives de *B. subtilis*. Il est fort possible que les mécanismes mis en place lors de la sporulation soient corrélés à cette augmentation de résistance face à la lumière pulsée. Les différences obtenues entre *B. subtilis* et *E. coli*, ainsi que la détection des spores dans le milieu ne permettent pas de répondre de manière précise à la question. Il serait donc intéressant de vérifier cette hypothèse par exemple par l'étude de

mutants de sporulation. Un mutant par délétion du gène *spo0A*, gène principal impliqué dans l'initiation de la sporulation chez *B. subtilis* (Fujita & Losick, 2005), pourrait être un moyen d'étudier le lien possible entre l'apparition de la résistance à la LP et la mise en place de la sporulation.

Influence du milieu de sporulation sur la résistance des spores de B.subtilis à la LP

Les cellules végétatives en phase stationnaire tardive présentent une résistance importante à la lumière pulsée. Cette résistance semble même plus marquée que les spores de cette souche produites sur milieu gélosé (une réduction maximale de 3 cycles logarithmiques pour des cellules végétatives en phase stationnaire avancée, contre plus de 6 cycles logarithmiques dans le cas des spores). La possible corrélation entre mise en place de la sporulation et acquisition de la résistance à la lumière pulsée a soulevé une nouvelle question, à savoir l'influence du milieu de sporulation sur la résistance à la lumière pulsée. De plus, la comparaison de la thermorésistance à une température de 90°C de spores de *B. subtilis* produites en milieu 2 x SG liquide ou sur milieu 2 x SG solide (Rose *et al.*, 2007) a montré que les spores produites sur milieu gélosé présentent une thermorésistance plus élevée que les spores produites en liquide. Dans un premier temps, aucune différence de résistance des spores de *B. subtilis* produites sur FNA ou 2 x SG gélosé (Nicholson & Setlow, 1990) n'a été mise en évidence. Dans un second temps les spores de *B. subtilis* produites sur 2 x SG gélosé ou en 2 x SG liquide ont été traitées par lumière pulsée (figure 20).

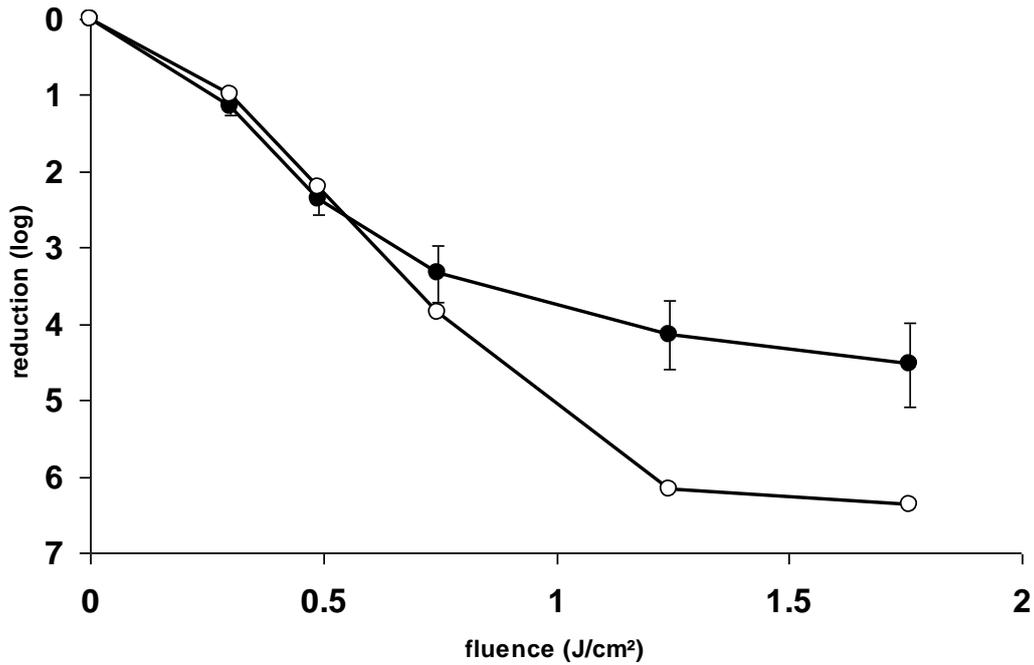


Figure 20: courbes de réduction de spores de *B. subtilis* en fonction de la fluence appliquée, pour des spores produites sur milieu 2 x SG gélifié (○) ou liquide (●).

La variabilité de résistance de spores produites en milieu liquide est marquée. Pourtant il semble quand même y avoir une différence entre les deux courbes. Les spores produites sur surface gélifiée semblent plus sensibles que celles produites en liquide (à l'inverse du résultat obtenu dans le cas des traitements thermiques). Cette nouvelle donnée va dans le sens d'une corrélation entre résistance et mise en place de la sporulation dans des cultures liquides de *B. subtilis*.

Résultats

4. Décontamination de sirop de sucre par lumière pulsée.

Le sirop de sucre, largement utilisé en industrie, peut être contaminé par des bactéries sporulantes, levures ou moisissures. Après dilution (dans les jus par exemple), ces microorganismes peuvent se multiplier, et ainsi causer des problèmes d'altération, voire d'intoxications. Certains microorganismes acidophiles thermophiles, et en particulier *Alicyclobacillus acidoterrestris*, connus pour leur résistance à la pasteurisation, ont été récemment responsables de problèmes d'altération de jus de fruits au Royaume Uni et en Allemagne (Pettipher *et al.*, 1997). La lumière pulsée est ici une alternative séduisante à la pasteurisation pour décontaminer des liquides clairs, son efficacité ayant été prouvée sur des produits comme l'eau ou le miel. Une étude a donc été menée en vue de caractériser l'efficacité décontaminante de la lumière pulsée sur du sirop de sucre, et de déterminer les conditions de traitement nécessaires à une décontamination suffisante du produit.

Trois types de liquides clairs ont été sélectionnés, de l'eau distillée, ainsi que du sirop de saccharose à 65 ou 67° Brix, dans le but d'étudier la possible influence de la composition et de la viscosité du produit à traiter. Afin d'apprécier les limites de l'efficacité de la LP, définie en général comme peu pénétrante, deux épaisseurs de liquide ont été testées, à la fois pour le traitement de l'eau et du sirop de saccharose à 65° Brix.

Comme pour chaque traitement, un microorganisme de référence ne peut suffire à caractériser l'efficacité. L'efficacité de la LP appliquée au sirop de sucre a donc été évaluée sur cinq microorganismes différents (spores d'*A. acidoterrestris*, *B. subtilis*, *G. stearothermophilus*, *A. niger* et cellules végétatives de *S. cerevisiae*).

Les études préliminaires de faisabilité concernant le traitement du sirop de sucre par lumière pulsée ont pour but une application au niveau industriel. L'application du traitement en flux continu et la comparaison des résultats par rapport au traitement statique (discontinu) ont donc été les éléments clés de la validation de la lumière pulsée pour décontaminer le sirop de sucre.

Grâce à ces travaux, il a été mis en évidence que la composition du liquide, sa coloration et sa viscosité ont une importance capitale. Le sirop de sucre est plus difficile à décontaminer que l'eau distillée. L'épaisseur de traitement est limitée, mais une décontamination efficace (3

cycles logarithmiques) de spores *d'A. acidoterrestris* a été obtenue sur des épaisseurs de sirop jusqu'à 10 mm, dans des conditions statiques. Parmi les 5 microorganismes traités, les spores *d'A. niger* semblent ici les plus résistantes au traitement. Enfin, le traitement de LP en flux continu (traitement de liquide à hauteur de 1.5 m³/h) à révélé une efficacité identique aux résultats statiques (pour une épaisseur donnée).

Article 4

Decontamination of sugar syrup by pulsed light

Article à soumettre

Abstract

Pulsed light was applied on 65-67° Brix sugar syrups artificially contaminated with a selection of micro-organisms. At least three log reductions of *Saccharomyces cerevisiae*, and of spores of *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* suspended in sugar syrup with a fluence of the incident pulsed light equal to, or lower than 1.8 J/cm² were obtained in 3 mm thick sugar syrup, and on spores of *B. subtilis* and *A. acidoterrestris* in a 10 mm thick sugar syrup. *A. niger* spores were less sensitive and the maximal log reduction was close to 1 with a fluence of the incident pulsed light of 1.2 J/cm². A flow-through system designed for PL treatment of sugar syrup allowed a 3 log reduction of *A. acidoterrestris* spores with 3-4 pulses of incident light at 0.91 J/cm² per sugar syrup volume.

1. Introduction

Sugar syrups have a wide range of possible use in the food industry (Cordier, 2000). Many microorganisms, mainly spore-forming bacteria, yeast and moulds are contaminating sugar syrups. They will be unable to multiply because sugar syrups have a high osmotic pressure. After dilutions in the final products, for preparation of fruit and other soft drinks for example, they may find favourable conditions for growth, and ultimately cause the formation of off-odours and off-flavours, particle formation, swelling of packages or in some cases an increasing in the risk of food poisoning (Stratford *et al.*, 2000). *Clostridium botulinum* has been detected for instance in corn syrup (Lilly *et al.*, 1991). Microbial contaminants in sugar syrups can be eliminated by heating (Cordier, 2000). Pasteurization of the final product can cause a decrease in enzymes, or changes of colour, flavour and other organoleptic quality of the drinks, and may be restricted by the high resistance of some contaminants of food (Sauer & Moraru, 2009; Stratford *et al.*, 2000; Tran & Farid, 2004). Pulsed light (PL) appears as an alternative to conventional thermal and chemical decontamination processes. Pulsed light is already used to decontaminate surfaces (Fernandez *et al.*, 2009; Turtoi & Nicolau, 2007) and liquids (Huffman *et al.*, 2000) by killing microorganisms with the help of short and intense light pulses. The current study was then carried out in order to investigate the efficiency of pulsed light to decontaminate sugar syrup. Target microorganisms (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *B. subtilis*, *A. acidoterrestris*, *Geobacillus stearothermophilus*) were selected among those reported for contaminating sugar syrups and/or fruit and soft drinks.

2. Materials and methods

1) Bacterial spores suspensions

A loopful of a stock culture stored at -20°C in a 30% (v/v) glycerol solution of *A. acidoterrestris* strain ATCC 49025T, *Bacillus subtilis* DSM 402 (= *B. subtilis* 168), *Geobacillus stearothermophilus* CIP 6623T were, respectively, spread on Orange Serum agar (pH = 4.5) (OSA) (Oxoid, Cambridge, United-Kingdom) plates at 45°C for 72 h (Murray *et al.*, 2007), on Luria-Bertani (LB) agar plates at 30°C for 24h (pH = 7.0) and on Fortified

Nutrient agar (FNA) plates at 55°C for 24h (pH = 7.0) (Fernández *et al.*, 1999). A colony of each strain was picked, suspended in sterile distilled water, then volumes of 200 µl were spread on OSA, on LB agar and on FNA for 7 days at the temperature previously indicated. After 7 days, spores were detached from OSA, LBA or FNA plates with 3 x 1 ml of sterile water. The suspensions were centrifuged 15 min at 7000 rpm and the pellet was then resuspended in 25 ml of sterile water. This operation was performed twice. The pellet was suspended again and centrifuged two times at 5000 rpm and two times at 4000 rpm. After the last wash, the pellet was suspended in 2 ml of sterile distilled water and stored at 4°C until use. Before use, the spores suspensions were heated 10 min at 70°C for *B. subtilis* and 10 min at 80°C for *A. acidoterrestris* and *G. stearothermophilus* to eliminate vegetative cells (Pettipher *et al.*, 1997). Spores were kept at 4°C until use. Spores were counted by spreading volumes of 0.1 ml of decimal serial dilutions on OSA, LBA and FNA plates. The spore suspensions contained 10⁷-10⁸ CFU/ml.

2) *Aspergillus niger* spores suspensions

A loopful of a stock culture stored at -20°C in a 30% (v/v) glycerol solution of *Aspergillus niger* ATCC 9642 was spread on Malt Extract Agar (MEA) (Bonenfant *et al.*, 2010) plates at 30°C for 5 days. Mycelium of these plates was then spread on MEA for 7 days at 30°C. After 7 days, spores were detached from the mycelium with 2 x 5 ml of a sterile tween solution (0.1%). The spore suspension was stored at 4°C until use.

3) *Saccharomyces cerevisiae* vegetative cells suspensions

A loopful of a stock culture stored at -20°C in a 30% (v/v) glycerol solution of *Saccharomyces cerevisiae* was, spread on MEA (Bonenfant *et al.*, 2010) plates at 30°C for 48h. A colony was picked and then suspended in Malt Extract Broth (MEB) under gentle shaking for 48h at 30°C.

4) Sugar syrup preparation

Different sugar syrups were tested: pure sucrose syrup at 65 and 67° Brix (sucrose from VWR International, Leuven, Belgium), and industrial sugar syrup at 65° Brix and 67° Brix. Sterile filtration of sugar syrups was performed using 0.22 µm pore size filter (Millipore, Bedford,

MA). Sugar syrups were then artificially contaminated at 10^5 - 10^6 cfu/ml for bacterial spores and *S. cerevisiae* cells, and at 10^4 cfu/ml for *A. niger* spores.

5) Treatment of sugar syrup by pulsed light

Pulsed Light was delivered by lab-scale PL equipments (CLARANOR SA, Avignon, France). Briefly pulses (duration 200 μ s) of broad spectrum (200-1100 nm) white light rich in UV (200-400 nm) are produced by a xenon flashlamp. Two different syrup thicknesses were tested: 3 and 10 mm. The lamp input voltage was 2.5 kV. Petri dishes of 5 cm diameter were filled with 5.5 ml or 20 ml sugar syrup, giving respectively a 3 mm and a 10 mm thick layer, respectively. The PL fluences at the top of the sugar syrup (incident fluence) were from 0 to 1.86 J/cm² (delivered in 1 or 2 flashes). Variations in fluences were obtained in varying the distance between the samples and the lamps using an adjustable lab-elevator. Untreated samples were used as controls.

A flow-through system was designed for PL treatment of sugar syrup (CLARANOR, Avignon, France). Sugar syrup ran in a 2.15 mm-wide space between an outer stainless steel cylinder and an inner quartz cylindrical chamber containing in its center a xenon flash lamp. The flow rate was 320 ml/min. The fluence of the incident PL was 0.91 J/cm²/flash and the fluence of the transmitted PL was 0.75 J/cm². One to 4 pulses/volume were delivered. Before and after each use, the system was cleaned with 500 ml of a bleach solution (10%), 500 ml of hydro-alcoholic solution (25% ethanol), and 500 ml of sterile distilled water. Negative controls were made, before and after each experiment.

6) Microbial counts

After treatment by pulsed light, decimal dilutions in sterile distilled water of the sugar syrup samples were spread onto OSA and incubated at 45°C for 48 h when spiked with *A. acidoterrestris*, spread onto MEA incubated at 30°C for 48 h when spiked with *A. niger* spores or *S. cerevisiae* and spread onto LB agar and incubated for 24h at 30°C or 55°C respectively when spiked with *B. subtilis* spores or *G. stearothermophilus* spores.

7) Experimental design and expression of microbial inactivation

Each survival experiment was at least twice and up to four times reproduced, at different dates with independently prepared cell or spore suspensions. The reduction was expressed as $\log N_0/N$, where N_0 is the initial concentration of the spread suspensions and N the number of survivors, as a function of the applied fluence. The modified Weibull model of Albert & Mafart (2005) was used to fit the sigmoidal survival curves with shoulder and tailing (Albert & Mafart, 2005). The equation (1) of the model is:

$$\log_{10} \frac{N_F}{N_0} = \log_{10} \left[\left(1 - \frac{N_{res}}{N_0} \right) x 10^{-\left(\frac{F}{F_1}\right)^p} + \left(\frac{N_{res}}{N_0} \right) \right] \quad (1)$$

where F is the fluence applied (J/cm^2), N_F is the number of cfu after treatment at a fluence F , N_0 is the initial number of cfu, N_{res} is the residual bacterial number, F_1 is the fluence allowing the first log reduction and p is a parameter which determines the curve convexity or concavity (upward concavity: $p < 1$, upward convexity: $p > 1$). The fluence allowing a n log reduction was calculated using equation (2):

$$F_n = F_1 \left[\log_{10} \left(\frac{\left(1 - \frac{N_{res}}{N_0} \right)}{\left(10^{-n} - \frac{N_{res}}{N_0} \right)} \right) \right]^{\frac{1}{p}} \quad (2)$$

F_1 , p and N_0 were calculated using the Microsoft® Excel 2002 solver function. In total 22 sets of replicate fluence allowing a 1 log reduction (F_1) or 3 log reductions (F_3) were obtained. The percentage mean deviation (% difference between extreme values and the mean) was always lower than 20 % and lower than 10 % in 17 out of 22 data sets.

3. Results and discussion

1) Influence of the composition of the sugar syrup.

Three log reductions of *B. subtilis* spores were obtained at a fluence of 1.5 J/cm² in 67°Brix industrial sucrose syrup, but significantly higher log reductions of 4.2 and 4.6 were obtained in 65°Brix pure sucrose syrup and in sterile distilled water, respectively (Figure 1). Factors that affect the inactivation of microorganisms in liquids food include its colour, viscosity and opacity (Guerrero-Beltran & Barbosa-Canovas, 2004; Krishnamurthy *et al.*, 2007; Sauer & Moraru, 2009). Decontamination in the sugar syrup was lower than that obtained in water. These results are more likely due to the difference in UV-C absorption of industrial and pure sugar syrup and of water, hence reducing the effective UV-C fluence after a few mm through the liquid (Woodling & Moraru, 2007). The decontamination was possible only with uncoloured sugar syrups. A suspension of *B. subtilis* spores in a 3 mm thick layer of brown sugar syrup at 65° Brix was unaffected by a PL treatment at 1.8 J/cm² (data not shown).

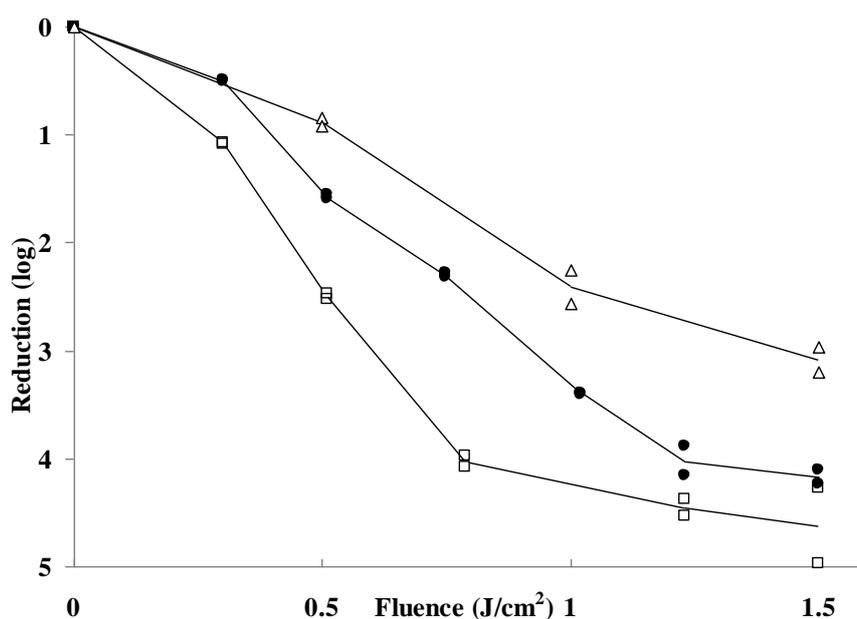


Figure 1. Effect of pulsed light treatment on *B. subtilis* spores in water (□), 65°Brix pure sucrose syrup (●) and 67°Brix industrial sucrose syrup (△). The input voltage was set at 2.5 kV. The thickness of the liquid layer was 10 mm. Each symbol represents data from one experiment. Solid lines represent the average value of experimental data obtained on spores suspended in each of the three liquids

2) Effect of the thickness of the sugar syrup layer

The log-reduction achieved on *A. acidoterrestris* spores in a 3 mm thick sugar syrup layer was equal to 4, while it was equal to 3 in a 10 mm thick sugar syrup layer at a fluence of 1.5 J cm² (figure 2). At fluences lower than 1 J/cm² differences in log reductions were almost not detectable. A similar behaviour was observed with *B. subtilis* spores in a 3 mm and 10 mm thick sterile water layers (data not shown). Testing higher thicknesses of the sugar syrup layer would likely have been necessary to detect a decrease in *B. subtilis* inactivation: increasing the thickness of the sugar syrup layer from 3 mm to 10 mm only did not modify the reduction in the *B. subtilis* spore concentration (Figure 2). Reduction in *A. acidoterrestris* spores was lower than that of *B. subtilis* spores at all tested fluences and for both sugar syrup thicknesses.

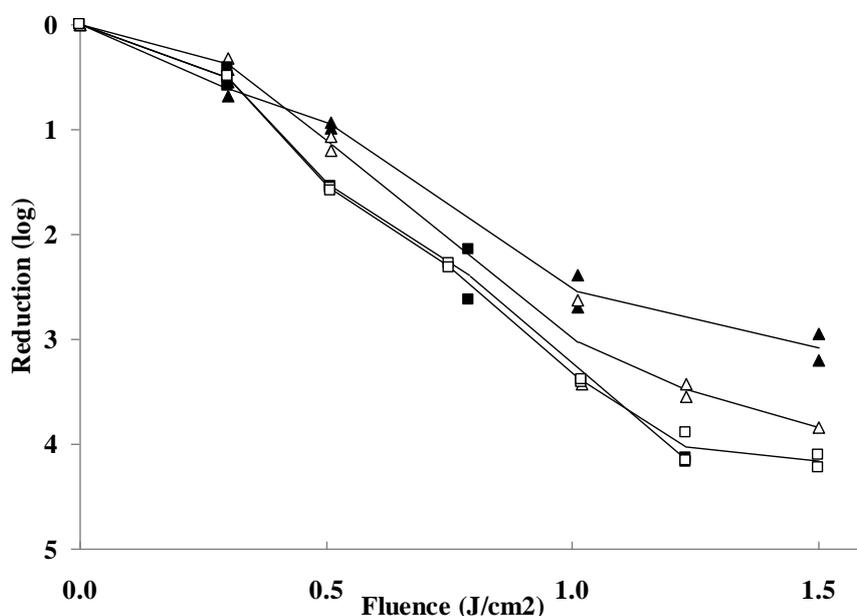


Figure 2. Effect of pulsed light treatment on *B. subtilis* (thickness of the layer: 3 mm, □ and: 10 mm, (■) and on *A. acidoterrestris* spores (3 mm, △; 10 mm, ▲) in 65°Brix pure sucrose syrup. The input voltage was set at 2,5 kV. Each symbol represents data from one experiment. Solid lines represent the average value of experimental data obtained on each species and with each thickness of sugar syrup.

3) Diversity of sensitivity in sugar syrup

The decontamination curves of different microorganisms treated by PL are shown in figure 3. The highest decontamination in sugar syrup was obtained with *S. cerevisiae* with 4.8 log reduction at a fluence of only 1.23 J/cm². The log reductions were also higher than 4 for the spore-forming strains *B. subtilis* and *G. stearothermophilus* spores with log reductions of respectively, 4.0 and 2.9 at 1.23 J/cm². PL treatment of *A. acidoterrestris* spores achieved a 3 log reduction at 1.86 J/cm². The most resistant micro-organism of the panel was *A. niger* spores with a reduction of only 1.3 log at 1.2 J/cm². *A. niger* is generally known to be among the most resistant microorganism to UV-C irradiation (Begum *et al.*, 2009; Guerrero-Beltran & Barbosa-Canovas, 2004). The differences in the relative sensitivity to PL of the microorganisms mixed to sugar syrup were in agreement with those observed after PL treatment of the same species spread on agar (Levy *et al.*, unpublished data, article 3).

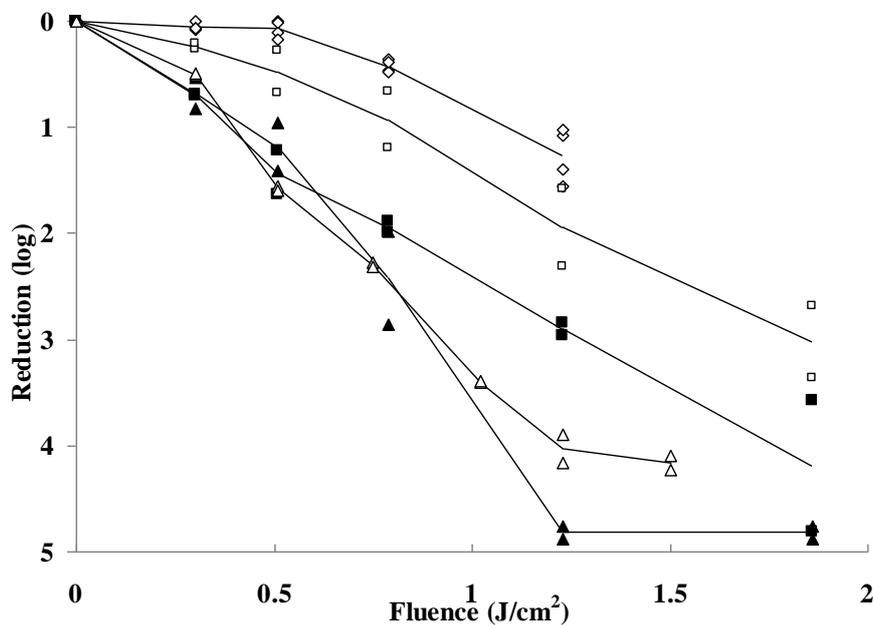


Figure 3. Effect of pulsed light treatment on *A. niger* spores (◇), *A. acidoterrestris* spores (□), *G. stearothermophilus* spores (■), *B. subtilis* spores (Δ) and *S. cerevisiae* vegetative cells (▲) in 65°Brix industrial sucrose syrup. The thickness of the sugar syrup layer was 3 mm. The input voltage was set at 2.5 kV. Each symbol represents data from one experiment. Solid lines represent the average value of experimental data obtained with each strain.

4) Inactivation of *A. acidoterrestris* in a flow-through PL system

Previous tests were performed in a static way. In industry PL treatment of sugar syrup has to be performed in a continuous flow of product. The inactivation of *A. acidoterrestris* in the flow-through PL system was linked to the number of pulses delivered per sugar syrup volumes and reached 4 log reductions with three pulses/volume for instance (figure 4). This reduction is higher than the common recommendation in commercial canning, in which sugar syrup may be used (Silva & Gibbs, 2001). From different sources reporting *A. acidoterrestris* D-values in fruit juices (Silva & Gibbs, 2001), a heat treatment of 5-20 min at 95°C would be necessary to achieve the same log reduction. This treatment could be even longer because of a low water activity of sugar syrup that increases the heat resistance of microorganisms.

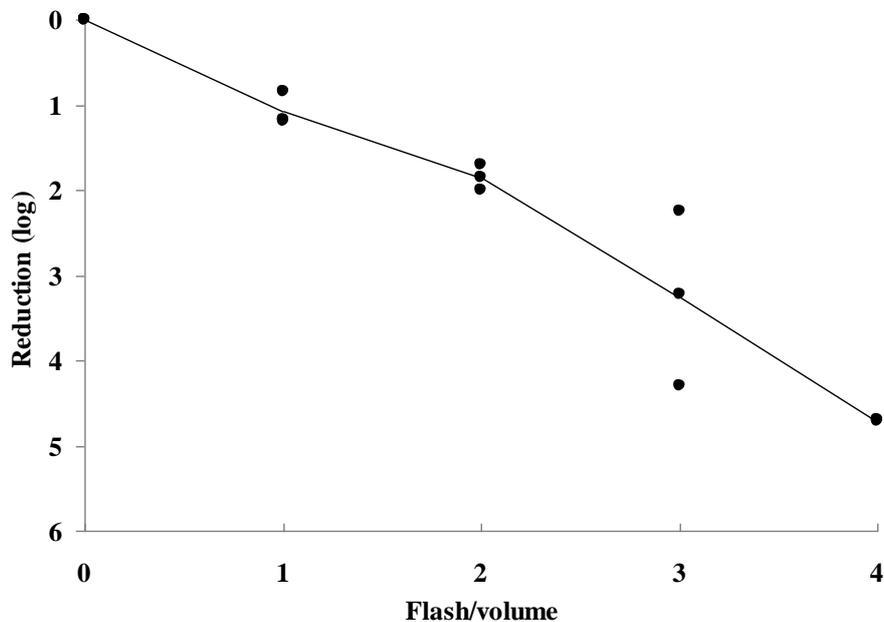


Figure 4. Effect of pulsed light treatment on *A. acidoterrestris* spores using a flow through system (●) in 65°Brix industrial sucrose syrup. The thickness of the sugar syrup layer was 2.15 mm. The input voltage was set at 2.5 kV. Each symbol represents data from one experiment. The solid line represents the average value of experimental data.

4. Conclusion

A significant inactivation (i.e. several log reductions) of spore-forming bacteria and *S. cerevisiae* was obtained in sugar syrup subjected to PL. This was obtained with a low number of flashes (from 1 to 4) and in up to 10 mm thick sugar syrup. The same efficiency was obtained in a continuous flow system with *A. acidoterrestris*. Consequently PL appears as a promising alternative for the decontamination of sugar syrup for food industry applications.

Acknowledgements

This work is a partial fulfilment of Caroline Levy's PhD thesis. She has received a grant from the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie*, Paris, France

Références

- Albert, I. & Mafart, P. (2005).** A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* **100**, 197-211.
- Begum, M., Hocking, A. D. & Miskelly, D. (2009).** inactivation of food spoilage fungi by ultra violet (UVC) irradiation. *International Journal of Food Microbiology* **129**, 74-77.
- Bonenfant, D., Niquette, P., Mimeault, M. & Hausler, R. (2010).** Adsorption and recovery of nonylphenol ethoxylate on a crosslinked beta-cyclodextrin-carboxymethylcellulose polymer. *Water Science and Technology* **61**, 2293-2301.
- Cordier, J.-L. (2000).** Sugars, honey, cocoa, chocolate, and confectionery products. In *The Microbiological Quality and Safety of Food Volume I*, pp. 941-959. Edited by B. M. Lund, A. C. Baird-Parker & G. W. Gould. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Fernandez, A., Salmeron, C., Fernandez, P. S. & Martinez, A. (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, M., Manzano, S., de la Hoz, L., Ordonez, J. A. & Hierro, E. (2009).** Pulsed light inactivation of *Listeria monocytogenes* through different plastic films. *Foodborne Pathogens and Disease* **6**, 1265-1267.
- Guerrero-Beltran, J. A. & Barbosa-Canovas, G. V. (2004).** Review: advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Science and Technology International* **10**, 137-147.
- Huffman, D. E., Slifko, T. R., Salisbury, K. & Rose, J. B. (2000).** Inactivation of bacteria, virus and *Cryptosporidium* by a point-of-use device using pulsed broad spectrum white light. *Water Research* **34**, 2491-2498.
- Krishnamurthy, K., Demirci, A. & Irudayaraj, J. M. (2007).** Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-Light treatment system. *Journal of Food Science* **72**, M233-M239.
- Lilly, T., Rhodehamel, E. J., Kautter, D. A. & Solomon, H. M. (1991).** *Clostridium botulinum* spores in corn syrup and other syrups. *Journal of Food Protection* **54**, 585-587.
- Murray, M. B., Gurtler, J. B., Ryu, J. H., Harrison, M. A. & Beuchat, L. R. (2007).** Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology* **115**, 59-69.
- Pettipher, G. L., Osmundson, M. E. & Murphy, J. M. (1997).** Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology* **24**, 185-189.

Sauer, A. & Moraru, C. I. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider, using pulsed light treatment. *Journal of Food Protection* **72**, 937-944.

Silva, F. V. M. & Gibbs, P. (2001). *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in food science & technology* **12**, 68-74.

Stratford, M., Hofman, P. D. & Cole, M. B. (2000). Fruit juices, fruit drinks, and soft drinks. In *The Microbiological Quality and Safety of Food Volume I*, pp. 836-869. Edited by B. M. Lund, A. C. Baird-Parker & G. W. Gould. Gaithersburg: Aspen Publishers.

Tran, M. T. T. & Farid, M. (2004). Ultraviolet treatment of orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **5**, 495-502.

Turtoi, M. & Nicolau, A. (2007). Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material. *Journal of Food Engineering* **83**, 47-53.

Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2007). Effect of spectral range in surface inactivation of *Listeria innocua* using broad-spectrum pulsed light. *Journal of Food Protection* **70**, 909-916.

Etude d'un équipement pilote industriel de lumière pulsée pour la décontamination de sirop de sucre en dynamique sur ligne.

Un pilote industriel mis au point par CLARANOR a été caractérisé en laboratoire. Le réacteur est équipé de 4 lampes centrales autour desquelles circule le sirop de sucre dans un tube de quartz d'épaisseur 10mm (figure 21). Le débit testé est de 1.5 m³/h. La fréquence des flashes est ajustée en fonction du débit et des paramètres du flux, afin d'avoir des données de dose minimale reçue par la totalité du liquide. L'ajustement des fréquences est commandé par l'électronique du pilote.

Les courbes de destruction sont exprimées en fonction d'une fluence minimale reçue par la cible (cf article 4). Suite aux résultats ultérieurs, deux microorganismes ont été définis: les spores *d'A. acidoterrestris* (présentant un intérêt industriel important) et *d'A. niger* (déterminées pour le moment comme les plus résistantes parmi les souches testées).

Dans le cas du traitement des spores *d'A. niger*, la puissance du flash a été augmentée, avec 1.5 J/cm²/ flash, contre 1 J/cm²/flash pour *A. acidoterrestris* (cf article 3).

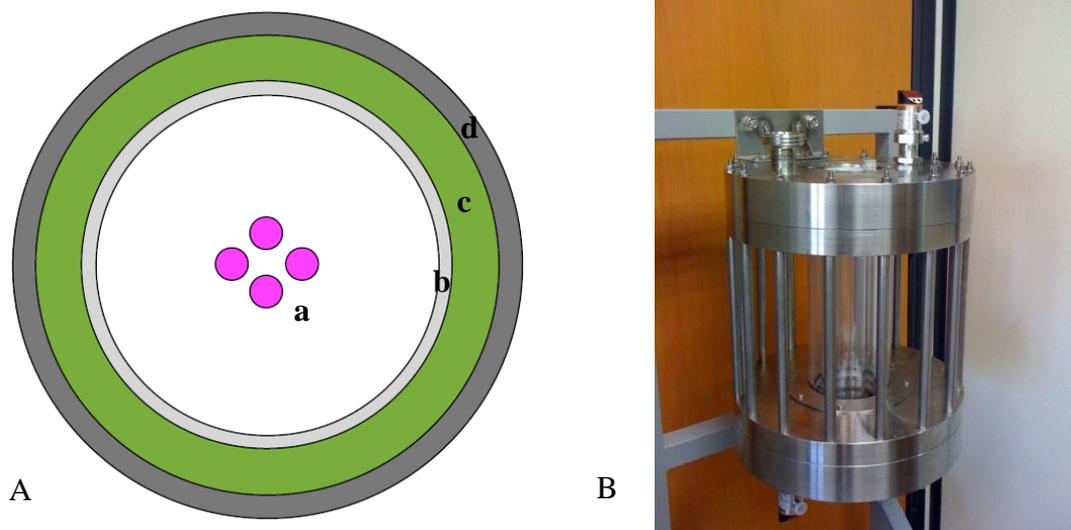


Figure 21: schéma en coupe transversale (A) et photo (B) de l'intérieur du réacteur dynamique de traitement de sirop de sucre. a) lampes, b) quartz, c) sirop de sucre, d) ensemble quartz + réflecteur + inox

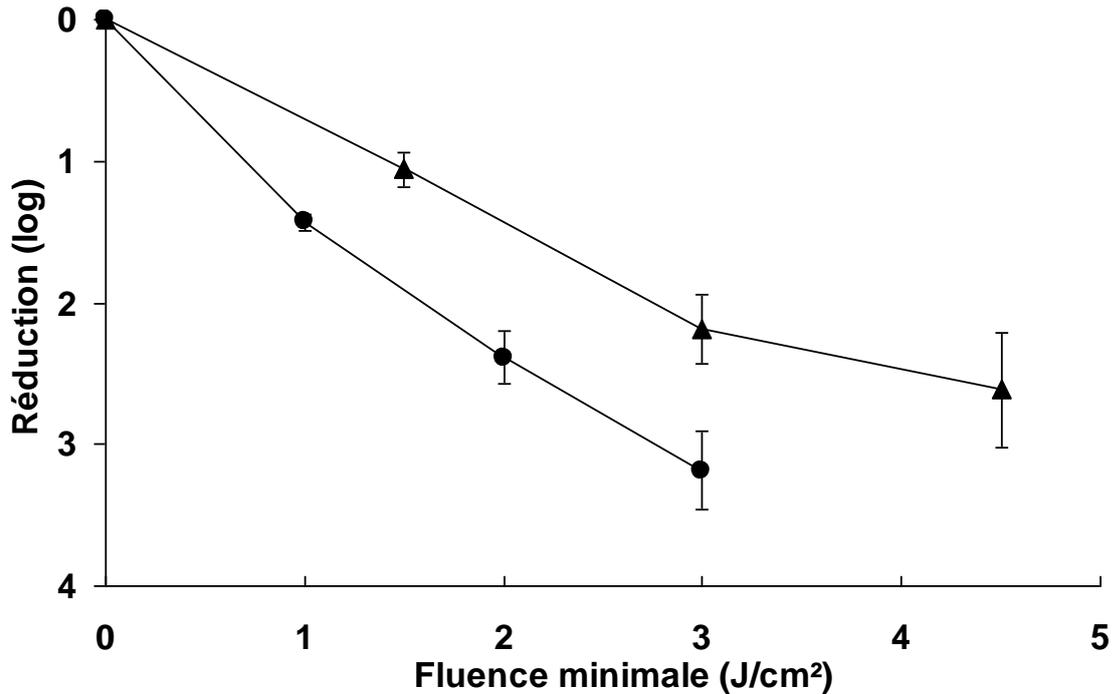


Figure 22: Inactivation de spores *d'A.niger* (▲) et *d'A. acidoterrestris* (●) traitées par lumière pulsée en continu (1,5 m³/h) dans 10mm de sirop de sucre. La contamination initiale était d'environ 3 x 10³ ufc/mL dans les deux cas.

Les résultats obtenus (figure 22) montrent une décontamination efficace dans les 2 cas, bien qu'une forte variabilité et une plus grande résistance soit rencontrée pour *A. niger*. Pour cette dernière, une réduction de 3 cycles logarithmiques semble être difficilement atteinte. La lumière pulsée reste un très bon candidat pour l'élimination des spores *d'A. acidoterrestris* dans le sirop de sucre.

Ces résultats sont en cours de validation sur chaîne industrielle.

Discussion générale

La lumière pulsée est une technologie dont l'efficacité a été clairement démontrée. L'équipement pilote de lumière pulsée CLARANOR a révélé une très forte efficacité dès le premier flash sur divers microorganismes. Des réductions logarithmiques supérieures à 5 unités ont été obtenues sur des spores de *B. subtilis* déposées en monocouche sur milieu gélosé. Les cellules végétatives de nombreuses espèces microbiennes ont montré une réduction supérieure à 5 cycles logarithmiques dès 0.5 J/cm². Bien qu'il y ait des différences de résistance plus marquées pour les formes sporulées, des décontaminations supérieures à 3 cycles logarithmiques ont pu être obtenues sur un grand nombre d'espèces bactériennes (*B. atrophaeus*, *A. acidoterrestris*, *G. stearothermophilus*...) en seulement un flash. L'acquisition d'une méthode fiable, simple et reproductible d'ensemencement par spray des spores de microorganismes a permis de démontrer l'efficacité de la lumière pulsée sur différentes surfaces, notamment sur une surface polystyrène, avec une réduction de plus de 5 cycles logarithmiques obtenue sur des spores de *B. subtilis*. Sur du polystyrène également, la lumière pulsée s'est avérée très efficace pour décontaminer des spores d'*A. niger* (réduction supérieure à 4 unités logarithmiques), espèce par ailleurs très résistante sur milieu gélosé, et ce avec une fluence inférieure à 1 J/cm². Il est désormais possible de qualifier le traitement sur de nombreuses bactéries, moisissures et levures, ainsi que sur de nombreuses surfaces, grâce à la connaissance des caractéristiques physiques de la lumière incidente et aux méthodes d'ensemencement rapide utilisées.

Grâce à ces travaux, l'influence de certains facteurs a été clairement établie. Il est évident que la répartition des microorganismes sur la surface de traitement est un élément primordial à l'évaluation de l'efficacité germicide, en raison des possibles superpositions des microorganismes protégeant les couches inférieures de la lumière. Il est également bien établi que la fraction UV-C de la lumière a une importance capitale pour l'efficacité du traitement.

Cependant, nous sommes encore loin de comprendre tous les phénomènes concernant les mécanismes d'action de la lumière pulsée, les mécanismes cellulaires de protection ou de réparation des microorganismes, ou encore leurs interactions avec les surfaces de traitement. Ce travail de recherche a permis de mettre en évidence la résistance de certains microorganismes face à la lumière pulsée. Comprendre de manière plus précise les

phénomènes mis en jeu lors de l'illumination des germes est maintenant devenu une étape clé pour mieux utiliser la technologie.

Rôle des UV

L'effet des longueurs d'ondes UV, bien qu'incontestable, suscite des interrogations. Il semble que les différentes espèces de microorganismes ne soient pas sensibles aux mêmes gammes de longueur d'onde de la lumière. La partie UV-C serait l'unique facteur important pour traiter *B. subtilis*. Supprimer les UV-C contenus dans la LP entraîne une perte totale de son efficacité germicide. De plus, les mêmes courbes de décontamination de *B. subtilis* ont été obtenues avec un traitement UV continu ou un traitement lumière pulsée à même fluence UV-C. Ce résultat semble montrer que toutes les longueurs d'onde UV-C sont sensiblement aussi efficaces que le 254 nm. En revanche, la dose UV-C seule ne suffit pas à expliquer la destruction d'*A. niger*. Dans ce dernier cas la suppression des UV-C de la lumière pulsée provoque une diminution considérable de la destruction, mais ne supprime pas totalement son efficacité. En outre, une même dose émise par une lampe à mercure basse pression ne provoque aucune destruction. *A. niger* semble répondre à la puissance du flash, et pas seulement à la dose délivrée.

De nombreux travaux se sont intéressés à la fraction UV contenue dans la LP dans le but de comparer les technologies LP et UV continus. Woodling et Moraru (2007) démontrent, en utilisant des filtres optiques, que l'absence d'UV entraîne une perte quasi totale de l'efficacité bactéricide de la lumière pulsée sur *L. innocua*. Ces auteurs en déduisent que les longueurs d'onde visibles et infrarouges n'ont aucun effet germicide. Wekhof et al. (2001) soutiennent que la partie visible de la lumière ne jouerait aucun rôle dans l'efficacité germicide. Wang et al. (2005) utilisent un monochromateur UV pour tester l'influence des différentes longueurs d'onde sur l'efficacité des UV pulsés pour décontaminer *E. coli* et ne constatent aucune décontamination avec des longueurs d'onde au dessus de 300 nm. Ces résultats vont tous dans le sens d'une efficacité de la LP entièrement due à la dose UV, c'est à dire un mécanisme d'action comparable à ce qui existe déjà dans le cas du traitement par émission continue d'UV.

La puissance du flash pourrait être responsable de la meilleure efficacité de la partie UV-C, mais pas uniquement. Wekhof (2000) souligne que la part UV de la LP est responsable de la quasi totalité de la désinfection, mais que les UV-C ne seraient pas les seules longueurs d'ondes actives. Les UV-A et B pourraient être impliqués dans la décontamination, en provoquant un échauffement du microorganisme. L'existence de l'effet photothermique

montrerait que la LP ne se réduit pas simplement à une nouvelle technologie d'application des UV continus.

Mécanismes d'action

Si l'on considère l'importance des longueurs d'onde UV dans l'efficacité germicide, les mécanismes d'action de la LP peuvent être reliés aux effets déjà connus des UV sur l'ADN. Les lésions causées au sein de la molécule d'ADN semblent être majoritairement responsables de la destruction des germes, et en particulier des bactéries. Un travail de recherche au niveau moléculaire, dans la même optique que ceux réalisés pour les traitements UV continus (Setlow, 2001) pourrait permettre non seulement d'apprécier l'impact de la lumière pulsée sur l'ADN des spores et des cellules, mais également de démontrer les facteurs de réparation mis en jeu, en fonction de l'état physiologique des cellules (Moeller *et al.*, 2007). Une extraction de l'ADN des cellules suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose pourrait mettre en évidence, dans un premier temps, les possibles lésions de l'ADN causées par les UV pulsés (Yang & Wang, 2008). Il serait par là très intéressant de comparer *B. subtilis* et d'*A. niger*, afin de comprendre les différences de réaction des deux germes.

L'effet photothermique est un second mécanisme qui pourrait expliquer les différents comportements des microorganismes. Leur plus grande sensibilité sur surfaces sèches (surtout dans le cas d'*A. niger*) pourrait être due à des transferts de chaleur au milieu environnant moins efficaces que sur milieu humide où le refroidissement est plus rapide. Wekhof *et al.* (2001) présentent l'effet photothermique comme responsable de l'éclatement des spores d'*A. niger*.

Au cours de la présente thèse, lors d'observations microscopiques, aucune modification de structure n'a été constatée sur les spores d'*A. niger* sur surface polystyrène. La surface autour des spores n'a pas non plus montré de déformation, contrairement à ce que l'on peut retrouver dans la littérature (Wekhof *et al.*, 2001). Il n'est pourtant pas exclu qu'un tel effet ait bien lieu, c'est pourquoi des expériences supplémentaires de coloration seraient intéressantes afin de mettre en évidence quelques possibles modifications d'intégrité des membranes causées par la chaleur (Coleman *et al.*, 2007). L'utilisation de colorants fluorescents spécifiques (coloration Live/Dead *Backlight*) pourrait permettre d'évaluer l'intégrité des membranes des spores (Laflamme *et al.*, 2004).

Le comportement des microorganismes face à différentes conditions post-traitement peut livrer des indications sur les dommages provoqués au sein d'un microorganisme (spores ou

cellules végétatives). Ainsi, certaines caractéristiques du milieu de récupération (pH, aw, teneur en chlorure de sodium, nitrites.....) et des conditions d'incubation (température) ou même l'utilisation de stress après traitement par LP (choc thermique, stress osmotique, utilisation d'antibiotiques), pourront mettre en évidence des sites possibles de lésions causées par la LP. En effet, il a été établi que certaines réactions caractéristiques peuvent être associées à des dommages spécifiques, tant au sein des spores que des cellules végétatives. Par exemple, Mackey (2000) évoque la perte de la thermorésistance des spores bactériennes après traitement ionisant comme caractéristique de dommages causés au niveau du cortex de la spore.

La résistance d'*A. niger* est parfois définie comme liée à la couleur des spores (Farkas, 2007). Plusieurs études ont également démontré la capacité des pigments de mélanine à protéger l'ADN de différents microorganismes contre les UV (Geng *et al.*, 2008; Ruan *et al.*, 2004). Des spores pigmentées d'espèces de *Bacillus* se sont révélées plus résistantes aux longueurs d'onde UVA que des spores non pigmentées (Moeller *et al.*, 2005). En revanche, la résistance de ces différentes spores aux UV-C n'a pas prouvé de lien avec la pigmentation. L'étude de la résistance aux UVA de 37 souches d'*A. niger* (divisées en 2 groupes en fonction de la teneur en mélanine) a montré une plus forte résistance du groupe présentant des concentrations élevées de pigments (Singaravelan *et al.*, 2008). Le traitement de souches à teneurs différentes en mélanine, ou de mutants non colorés d'*A. niger* pourrait nous permettre de mettre en évidence l'impact de ces pigments de mélanine dans la protection des microorganismes traités par LP.

Fractionnement de la dose

Le fractionnement de la fluence en un ou plusieurs flashes n'a montré aucun impact négatif sur la décontamination des spores de *B. subtilis*. Une même fluence totale délivrée en un ou plusieurs flashes (jusqu'à 5) a entraîné une même réduction logarithmique, quelles que soient la fluence testée et la tension appliquée. En revanche, la multiplication des flashes de faible fluence (0.17 J/cm² par flash) a entraîné une décontamination très faible voire quasiment nulle des spores d'*A. niger*, même si la fluence totale atteignait 1.7 J/cm² (10 flashes). La méthode d'application de la dose peut avoir une importance marquée selon le microorganisme traité. Il s'avère donc nécessaire de qualifier le traitement à la fois par la fluence reçue, et par le nombre de flashes appliqués. Ceci peut poser des problèmes d'ordre technique, car augmenter la fluence au delà d'une certaine valeur n'est possible qu'en multipliant les flashes. La multiplication des flashes de faible énergie pourra ainsi entraîner

une décontamination plus faible que ce qu'il est possible d'atteindre avec la même énergie mais délivrée en un seul flash.

Interactions avec les surfaces

Outre les effets de diffusion thermique, certains résultats (Woodling & Moraru, 2005) évoquent plusieurs facteurs d'influence de la surface sur la décontamination. L'exemple de *B. subtilis* traité sur polystyrène et sur verre en est une bonne illustration. En effet, d'un point de vue microscopique, les deux surfaces présentent un profil très similaire, à savoir l'absence de failles et rugosités. Pourtant, la résistance des spores sur le verre est supérieure à celle sur plastique. Les propriétés optiques de la surface, peuvent avoir une incidence sur l'efficacité du traitement. Ainsi, d'après Woodling & Moraru (2005), une surface présentant une forte réflectivité provoquera une absorption de la lumière moins importante au niveau de la cellule. En fait le problème est sans doute plus compliqué. Il faudrait aussi tenir compte de la diffusion en surface et en volume et de la géométrie des microorganismes. L'adhésion des microorganismes aux surfaces inertes peut dépendre de l'hydrophobicité du matériaux (Peng *et al.*, 2001), de la composition du milieu de suspension (Barnes *et al.*, 1999), mais aussi du microorganisme (Faille *et al.*, 2002). Elle peut être différente selon la phase de croissance des microorganismes testés, en raison des charges de surfaces différentes selon le stade (Peng *et al.*, 2001). L'hydrophobicité plus ou moins marquée des microorganismes peut être à l'origine d'agréations importantes, entraînant une meilleure protection face à l'illumination (Mamane-Gravetz & Linden, 2005).

Applications industrielles

L'étude de la décontamination de sirop de sucre par lumière pulsée a révélé une efficacité germicide supérieure à 3 cycles logarithmiques sur des spores d'*A. acidoterrestris*, agent d'altération de jus de fruits ou encore de sodas, et ce sur une épaisseur de traitement allant jusqu'à 10 mm. La lumière pulsée s'est également avérée efficace pour traiter le sirop de sucre en flux continu, sur une épaisseur de 2 mm. La validation en laboratoire du procédé appliqué en continu a permis la réalisation d'un pilote industriel de plus grande capacité, conçu pour décontaminer du sirop de sucre sur une épaisseur de 10 mm, avec un débit continu pouvant aller jusqu'à 5 m³/h. La mise au point d'un protocole de test a permis de valider une décontamination des spores d'*A. acidoterrestris* supérieure à 3 cycles logarithmiques, pour un flux continu avec un débit égal à 1,5 m³/h. Le protocole appliqué en laboratoire n'est pour l'instant qu'une étape préliminaire à la validation de l'équipement au niveau industriel. Les

résultats ont montré une variabilité marquée, du fait des expériences difficiles à mettre en œuvre et des gros volumes de sirop nécessaires.

L'application de la technologie de lumière pulsée est limitée par certaines contraintes, à la fois techniques et pratiques. Tout comme les UV continus, cela reste une technique de décontamination de surfaces ou de produits de faible épaisseur. La plupart des produits ne peuvent donc pas être traités au travers de leur emballage. La décontamination de liquides ne sera possible que sur de faibles épaisseurs et qui plus est, sur des fluides transparents aux UV. En revanche, les résultats obtenus valident la technologie en termes d'efficacité décontaminante. Les études menées sur différents microorganismes et différentes surfaces nous donnent des indications sur des niveaux de décontamination envisageables en industrie, notamment grâce aux logiciels d'optimisation (APILUX, OPTILUX). Ainsi, les demandes industrielles concernant des géométries précises de produits peuvent faire l'objet de réponses spécifiques.

A l'heure actuelle, le développement de la technologie s'oriente vers l'étude d'autres sources lumineuses. Grâce aux travaux présentés ici concernant l'efficacité des UV nous sommes intéressés à une catégorie particulière de lampes UV appelées excimères. Ces lampes émettent à haute cadence des impulsions quasi monochromatiques à différentes longueurs d'onde dans le domaine de l'UV-C. Selon le mélange de gaz utilisé on obtient 280 nm (XeBr), 222 nm (KrCl) ou 206 nm (KrCl). D'autres longueurs d'onde dans le domaine UVA sont également possibles. Des expériences préliminaires d'inactivation de spores de *B. subtilis* ont démontré, à fluence UV-C équivalente, une efficacité comparable à la LP ou l'UV continu à 254 nm. Il serait intéressant de voir si ce type de lampes peut permettre une décontamination des spores d'*A. niger*.

Nous sommes encore loin de maîtriser la lumière pulsée aussi bien que les traitements thermiques. Il reste des points importants à éclaircir, afin d'avoir le recul nécessaire à la connaissance précise du procédé. La lumière pulsée est cependant une technologie propre, économique et compacte. Elle n'utilise aucun produit chimique, ne nécessite pas d'eau, et ses lampes ne contiennent pas de mercure, et permettant une décontamination microbiologique efficace applicable à plusieurs domaines industriels.

Peut-être a-t-on là le début d'un nouveau siècle des Lumières...

Références bibliographiques:

1. **Aertsen, A., Vanoirbeek, K., De Spiegeleer, P., Sermon, J., Hauben, K., Farewell, A., Nystrom, T. & Michiels, C. W. (2004).** Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 2660-2666.
2. **Aertsen, A., Meersman, F., Hendrickx, M. E. G., Vogel, R. F. & Michiels, C. W. (2009).** Biotechnology under high pressure: applications and implications. *Trends in Biotechnology* **27**, 434-441.
3. **Afssa (2007).** Revue des données récentes relatives à l'ionisation des denrées destinées à l'alimentation humaine, pp. 18.
4. **Afssa (2009).** Saisine n° 2008-SA-0289. Avis relatif à l'utilisation de la lumière pulsée comme procédé de décontamination microbiologique de surface des produits de panification, à la suite de l'avis de l'Afssa du 2 juin 2008, pp. 2. Maisons-Alfort.
5. **Aguirre, J. S., Pin, C., Rodriguez, M. R. & Fernando, G. D. G. d. (2009).** Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6992-6997.
6. **Albert, I. & Mafart, P. (2005).** A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* **100**, 197-211.
7. **Appert, N. (1810).** *L'Art de conserver pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales*. Paris.
8. **Badr, H. M. (2005).** Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* from raw beef sausage by gamma-irradiation. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**, 343-349.
9. **Barnes, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R. & Chamberlain, A. H. L. (1999).** Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4543-4548.
10. **Barsotti, L. & Cheftel, J. C. (1999).** Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. *Food Reviews International* **15**, 181-213.
11. **Bartlett, D. H. (2010).** Introduction to high-pressure bioscience and biotechnology. In *High-Pressure Bioscience and Biotechnology*, pp. 1-5.
12. **Begum, M., Hocking, A. D. & Di, M. (2009).** Inactivation of food spoilage fungi by ultra violet (UVC) irradiation. *International Journal of Food Microbiology* **129**, 74-77.

13. **Bialka, K. L. & Demirci, A. (2007).** Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-Light. *Journal of Food Science* **72**, M391-M396.
14. **Bialka, K. L., Demirci, A., Walker, P. N. & Puri, V. M. (2008).** Pulsed UV-light penetration of characterization and the inactivation of *Escherichia coli* K12 in solid model systems. *Transactions of the Asabe* **51**, 195-204.
15. **Bigelow, W. D. (1921).** The logarithmic nature of thermal death time curves. *The Journal of Infectious Diseases* **29**, 528-536.
16. **Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Robinson, R. K. (2000).** Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 637-645.
17. **Bloomfield, S. F. & Scott, E. (1997).** Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 1-9.
18. **Bonenfant, D., Niquette, P., Mimeault, M. & Hausler, R. (2010).** Adsorption and recovery of nonylphenol ethoxylate on a crosslinked beta-cyclodextrin-carboxymethylcellulose polymer. *Water Science and Technology* **61**, 2293-2301.
19. **Braun, F. (1897).** Over a procedure for the demonstration and for the study of the course of variable currents. *Annalen Der Physik Und Chemie*.
20. **Brown, G. S., Betty, R. G., Brockmann, J. E. & other authors (2007).** Evaluation of a wipe surface sample method for collection of *Bacillus* spores from nonporous surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 706-710.
21. **Butz, P., Koller, W. D., Tauscher, B. & Wolf, S. (1994).** Ultra-High pressure processing of onions - chemical and sensory changes. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **27**, 463-467.
22. **Buzrul, S. (2008).** High hydrostatic pressure (HHP) applications in food science: a study on compression heating, microbial inactivation kinetics, pulsed pressure and high pressure carbon dioxide treatments, pp. 144: University of Bordeaux.
23. **Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A. & Demazeau, G. (2008).** Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **124**, 275-278.
24. **Campos, F. P. & Cristianini, M. (2007).** Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenisation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **8**, 226-229.
25. **Cebrian, G., Sagarzazu, N., Pagan, R., Condon, S. & Manas, P. (2007).** Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *International Journal of Food Microbiology* **118**, 304-311.

26. **Cerf, O. (1987).** Inactivation Kinetics of Bacterial-Spores and UHT Process Optimization. *Le Lait* **67**, 97-109.
27. **Chang, J. C. H., Ossoff, S. F., Lobe, D. C., Dorfman, M. H., Dumais, C. M., Qualls, R. G. & Johnson, J. D. (1985).** UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 1361-1365.
28. **Chéret, R. (2005).** Effet des hautes pressions sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson, pp. 197: Ecole doctorale Mécanique, Thermique et Génie Civil, Université de Nantes.
29. **Christofi, N., Misakyan, M. A., Matafonova, G. G., Barkhudarov, E. M., Batoev, V. B., Kossyi, I. A. & Sharp, J. (2008).** UV treatment of microorganisms on artificially-contaminated surfaces using excimer and microwave UV lamps. *Chemosphere* **73**, 717-722.
30. **Chun, H. H., Kim, J. Y., Lee, B. D., Yu, D. J. & Song, K. B. (2010).** Effect of UV-C irradiation on the inactivation of inoculated pathogens and quality of chicken breasts during storage. *Food Control* **21**, 276-280.
31. **Cleaver, J. E. (2003).** Photoreactivation. *DNA Repair* **2**, 629-638.
32. **Codex Alimentarius (2003).** Codex Stan 106-1983. rev 1-2003. General standard for irradiated foods, pp. 3.
33. **Coleman, W. H., De, C., Li, Y. Q., Cowan, A. E. & Setlow, P. (2007).** How moist heat kills spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **189**, 8458-8466.
34. **Collectif contre l'irradiation des aliments (2008).** *Aliments irradiés/atome, malbouffe et mondialisation.*
35. **Collectif contre l'irradiation des aliments (2010).** From <http://www.irradiation-aliments.org>.
36. **Coleman, W.H., De, C., Li, Y.Q., Cowan, A.E., Setlow, P. (2007).** How moist heat kills spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **189**, 8458-8466.
37. **Commission des communautés Européennes (2008).** Proposition de directive du parlement Européen et du conseil relative à la limitation de l'utilisation de certaines substances dangereuses dans les équipements électriques et électroniques, pp. 48.
38. **Conseil National de l'Alimentation (2009).** Avis sur le développement des nouvelles technologies dans la fabrication, le conditionnement et la conservation des denrées alimentaires: conséquences, responsabilités des opérateurs et acceptabilité sociale, pp. 55.
39. **Coohill, T. P. & Sagripanti, J. L. (2008).** Overview of the inactivation by 254 nm ultraviolet radiation of bacteria with particular relevance to biodefense. *Photochemistry and Photobiology* **84**, 1084-1090.

40. **Coohill, T. P. & Sagripanti, J. L. (2009).** Bacterial inactivation by solar ultraviolet radiation compared with sensitivity to 254 nm radiation. *Photochemistry and Photobiology* **85**, 1043-1052.
41. **Cordier, J.-L. (2000).** Sugars, honey, cocoa, chocolate, and confectionery products. In *The Microbiological Quality and Safety of Food Volume I*, pp. 941-959. Edited by B. M. Lund, A. C. Baird-Parker & G. W. Gould. Gaithersburg: Aspen Publishers.
42. **Crawford, L. M. & Ruff, E. H. (1996).** A review of the safety of cold pasteurization through irradiation. *Food Control* **7**, 87-97.
43. **Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, A., Toth-Markus, M. & Lechner, N. (2006).** Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **7**, 49-54.
44. **Daryany, M. K. A., Massudi, R. & Hosseini, M. (2008).** Photoinactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* suspended in phosphate-buffered saline-A using 266- and 355-nm pulsed ultraviolet light. *Current Microbiology* **56**, 423-428.
45. **De Reu, K., Grijspeerdt, L., Herman, L., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., Putirulan, F. F. & Bolder, N. M. (2005).** The effect of UV irradiation the bacterial load of shell eggs. In *XI European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Product*. Oorwerth, Netherlands.
46. **Décret n°55-241 (1955).** Décret pris pour l'application en ce qui concerne le commerce des conserves et semi-conserves alimentaires de la loi du 1er août 1905 modifiée et complétée sur la répression des fraudes: Version consolidée au 03 avril 1997
47. **Devlieghere, F., Vermeiren, L. & Debevere, J. (2004).** New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal* **14**, 273-285.
48. **Dunn, J., Ott, T. & Clark, W. (1995).** Pulsed-light treatment of food and packaging. *Food Technology* **49**, 95-98.
49. **Edmonds, J. M., Collett, P. J., Valdes, E. R., Skowronski, E. W., Pellar, G. J. & Emanuel, P. A. (2009).** Surface sampling of spores in dry-deposition aerosols. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 39-44.
50. **Elmnasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A. & Federighi, M. (2007a).** Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **53**, 813-821.
51. **Elmnasser, N., Orange, N., Bakhrouf, A. & Federighi, M. (2007b).** High intensity pulsed light for food preservation: a review. *Revue De Medecine Veterinaire* **158**, 274-282.
52. **Exapro (2010).** From <http://www.exapro.com>.

53. **Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M. N., Slomianny, C. & Benezech, T. (2002).** Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 728-738.
54. **Farkas, J. (1998).** Irradiation as a method for decontaminating food - A review. *International Journal of Food Microbiology* **44**, 189-204.
55. **Farkas, J. (2007).** Physical methods of food preservation. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, pp. 685-712.
56. **Farrell, H. P., Garvey, M., Cormican, M., Laffey, J. G. & Rowan, N. J. (2009).** Investigation of critical inter-related factors affecting the efficacy of pulsed light for inactivating clinically relevant bacterial pathogens. *Journal of Applied Microbiology*.
57. **Federighi, M. & Tholozan, J. L. (2001).** *Traitements ionisants et hautes pressions des aliments*.
58. **Fellows, P. J. (2000).** *Food processing technology: principles and practice*.
59. **Fernández, A., Salmerón, C., Fernández, P. S. & Martínez, A. (1999).** Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science and Technology* **10**, 158-162.
60. **Fernandez, M., Manzano, S., de la Hoz, L., Ordonez, J. A. & Hierro, E. (2009).** Pulsed light inactivation of *Listeria monocytogenes* through different plastic films. *Foodborne Pathogens and Disease* **6**, 1265-1267.
61. **Ferrandon, P. (2008).** Les Aliments Irradiés. From <http://www.criirad.org>.
62. **Fine, F. & Gervais, P. (2004).** Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection* **67**, 787-792.
63. **Fleischman, G. J., Ravishankar, S. & Balasubramaniam, V. M. (2004).** The inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiology* **21**, 91-95.
64. **Fournier, V. (2003).** Irradiation des aliments.
65. **Frey, W., White, J. A., Price, R. O., Blackmore, P. F., Joshi, R. P., Nuccitelli, R., Beebe, S. J., Schoenbach, K. H. & Kolb, J. F. (2006).** Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure. *Biophysical Journal* **90**, 3608-3615.
66. **Fujita, M. & Losick, R. (2005).** Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes & Development* **19**, 2236-2244.
67. **Gaillard, S. (2003).** Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus*, en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse., pp. 156. Quimper: Université de Bretagne Occidentale.

68. Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A. H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J. F. & Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology* **117**, 1-28.
69. Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A. H., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J. F. & Devlieghere, F. (2009). Influence of type of microorganism, food ingredients and food properties on high-pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **129**, 253-263.
70. Garcia-Gonzalez, L., Rajkovic, A., Geeraerd, A. H., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J. F. & Devlieghere, F. (2010). The development of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* variants resistant to high-pressure carbon dioxide inactivation. *Letters in Applied Microbiology* **50**, 653-656.
71. Geeraerd, A. H., Herremans, C. H. & Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* **59**, 185-209.
72. Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. & Van Impe, J. F. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 95-105.
73. Geng, J., Yu, S. B., Wan, X., Wang, X. J., Shen, P., Zhou, P. & Chen, X. D. (2008). Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **70**, 1151-1155.
74. George, S. M. & Peck, M. W. (1998). Redox potential affects the measured heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 independently of oxygen concentration. *Letters in Applied Microbiology* **27**, 313-317.
75. Gomez-Lopez, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V. & Debevere, J. (2005a). Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* **103**, 79-89.
76. Gomez-Lopez, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V. & Debevere, J. (2005b). Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 460-470.
77. Gomez-Lopez, V. M., Ragaert, P., Debevere, J. & Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in food science & technology* **18**, 464-473.
78. Gongora-Nieto, M. M., Sepulveda, D. R., Pedrow, P., Barbosa-Canovas, G. V. & Swanson, B. G. (2002). Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* **35**, 375-388.

79. **Goodridge, L. D., Willford, J. & Kalchayanand, N. (2006).** Destruction of *Salmonella* Enteritidis inoculated onto raw almonds by high hydrostatic pressure. *Food Research International* **39**, 408-412.
80. **Guerrero-Beltran, J. A. & Barbosa-Canovas, G. V. (2004).** Review: advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Science and Technology International* **10**, 137-147.
81. **Heimbuch, B. K., Kinney, K., Nichols, B. & Wander, J. D. (2009).** The Dry Aerosol Deposition Device (DADD): An instrument for depositing microbial aerosols onto surfaces. *Journal of Microbiological Methods* **78**, 255-259.
82. **Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A. & Knorr, D. (2001).** Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - basic concepts for process design. *Trends in food science & technology* **12**, 103-111.
83. **Hierro, E., Manzano, S., Ordonez, J. A., de la Hoz, L. & Fernandez, M. (2009).** Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. *International Journal of Food Microbiology* **135**, 125-130.
84. **Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. & Medema, G. J. (2006).** Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research* **40**, 3-22.
85. **Hillegas., S. L. & Demirci, A. (2003).** Inactivation of *Clostridium sporogenes* in clover honey by pulsed UV-light treatment. *Agricultural Engineering International* **5**.
86. **Hiramoto, T. (1984).** Method of sterilization. Japan.
87. **Horneck, G., Stoffler, D., Eschweiler, U. & Hornemann, U. (2001).** Bacterial spores survive simulated meteorite impact. *Icarus* **149**, 285-290.
88. **Hu, Q., Viswanadham, S., Joshi, R. P., Schoenbach, K. H., Beebe, S. J. & Blackmore, P. F. (2005).** Simulations of transient membrane behavior in cells subjected to a high-intensity ultrashort electric pulse. *Physical review E: Statistical nonlinear and soft matter physics* **71**, 031914.
89. **Huang, E., Mittal, G. S. & Griffiths, M. W. (2006).** Inactivation of *Salmonella* Enteritidis in liquid whole egg using combination treatments of pulsed electric field, high pressure and ultrasound. *Biosystems Engineering* **94**, 403-413.
90. **Huffman, D. E., Slifko, T. R., Salisbury, K. & Rose, J. B. (2000).** Inactivation of bacteria, virus and *Cryptosporidium* by a point-of-use device using pulsed broad spectrum white light. *Water Research* **34**, 2491-2498.
91. **INVS (2009).** Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives, pp. 5.
92. **Ishikawa, H., Shimoda, M., Tamaya, K., Yonekura, A., Kawano, T. & Osajima, Y. (1997).** Inactivation of *Bacillus* spores by the supercritical carbon dioxide micro-bubble method. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **61**, 1022-1023.

93. **Journal officiel de l'Union Européenne (2010)**. Décision de la commission modifiant, aux fins de son adaptation au progrès scientifique et technique, l'annexe de la directive 2002/95/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exemptions relatives aux applications utilisant du plomb, du mercure, du cadmium, du chrome hexavalent, des polybromobiphényles ou des polybromodiphényléthers, pp. 7.
94. **Jun, S., Irudayaraj, J., Demirci, A. & Geiser, D. (2003)**. Pulsed UV-light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. *International Journal of Food Science and Technology* **38**, 883-888.
95. **Katzin, L. I., Sandholzer, A. & M., S. (1942)**. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. *Journal of Bacteriology* **45**, 265-272.
96. **Kaur, J., Ledward, D. A., Park, R. W. A. & Robson, R. L. (1998)**. Factors affecting the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* **26**, 325-330.
97. **Keklik, N. M. & Demirci, A. (2009)**. Pulsed UV-light: advantages for food decontamination. *Resource, Engineering & Technology for a Sustainable World* **16**, 18-19.
98. **Keklik, N. M., Demirci, A. & Puri, V. M. (2009)**. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on unpackaged and vacuum-packaged chicken frankfurters using pulsed UV-light. *Journal of Food Science* **74**, M431-M439.
99. **Keyser, M., Muller, I. A., Cilliers, F. P., Nel, W. & Gouws, P. A. (2008)**. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**, 348-354.
100. **Kikuchi, O. K., Todoriki, S., Saito, M. & Hayashi, T. (2003)**. Efficacy of soft-electron (low-energy electron beam) for soybean decontamination in comparison with gamma-rays. *Journal of Food Science* **68**, 649-652.
101. **Knorr, D., Geulen, M., Grahl, T. & Sitzmann, W. (1994)**. Food application of high electric field pulses. *Trends in food science & technology* **5**, 73-75.
102. **Kolb, J. F., Kono, S. & Schoenbach, K. H. (2006)**. Nanosecond pulsed electric field generators for the study of subcellular effects. *Bioelectromagnetics* **27**, 172-187.
103. **Koutchma, T. N., Forney, L.J., Moraru, C.I. (2009)**. *Ultraviolet light in Food Technology*.
104. **Krishnamurthy, K., Demirci, A. & Irudayaraj, J. (2004)**. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light sterilization. *Journal of Food Protection* **67**, 1027-1030.

105. **Krishnamurthy, K., Demirci, A. & Irudayaraj, J. M. (2007).** Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-Light treatment system. *Journal of Food Science* **72**, M233-M239.
106. **Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C. & Beumer, R. R. (2003).** Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 227-236.
107. **Laflamme, C., Lavigne, S., Ho, J. & Duchaine, C. (2004).** Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 684-692.
108. **Lagunas-Solar, M. C., Pina, C., MacDonald, J. D. & Bolkan, L. (2006).** Development of pulsed UV light processes for surface fungal disinfection of fresh fruits. *Journal of Food Protection* **69**, 376-384.
109. **Lamont, Y., Zutka, A. R., Anderson, J. G., MacGregor, S. J., Given, M. J., Deppe, C. & Cook, N. (2007).** Pulsed UV-light inactivation of poliovirus and adenovirus. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 564-567.
110. **Leguerinel, I., Couvert, O. & Mafart, P. (2007).** Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. *International Journal of Food Microbiology* **114**, 100-104.
111. **Levy, C., Bornard, I., Carlin, F. (2011).** Deposition of *Bacillus subtilis* spores using an airbrush-spray or spots to study surface decontamination by pulsed light. *Journal of Microbiological Methods* **84**, 223-227.
112. **Leyral, G. & Vierling, E. (2007).** *Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires.*
113. **Lilly, T., Rhodehamel, E. J., Kautter, D. A. & Solomon, H. M. (1991).** *Clostridium botulinum* spores in corn syrup and other syrups. *Journal of Food Protection* **54**, 585-587.
114. **Lopez, M., Gonzalez, I., Mazas, M., Gonzalez, J., Martin, R. & Bernardo, A. (1997).** Influence of recovery conditions on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International Journal of Food Science and Technology* **32**, 305-311.
115. **Luksiene, Z., Gudelis, V., Buchovec, I. & Raudeliuniene, J. (2007).** Advanced high-power pulsed light device to decontaminate food from pathogens: effects on *Salmonella typhimurium* viability in vitro. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1545-1552.
116. **Lund, B. M., Baird-Parker, T. C. & Gould, G. W. (2000).** *The microbiological safety and quality of food.*

117. **MacGregor, S. J., Rowan, N. J., McIlvaney, L., Anderson, J. G., Fouracre, R. A. & Farish, O. (1998).** Light inactivation of food-related pathogenic bacteria using a pulsed power source. *Letters in Applied Microbiology* **27**, 67-70.
118. **Mackey, B. M. (2000).** Injured Bacteria. In *The microbiological safety and quality of food*, pp. 315-341. Edited by B. M. Alund, T. C. Barird-Parker & G. W. Gould. Gaithersburg: Aspen.
119. **Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S. & Leguerinel, I. (2002).** On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* **72**, 107-113.
120. **Mafart, P., Leguerinel, I., Couvert, O. & Coroller, L. (2010).** Quantification of spore resistance for assessment and optimization of heating processes: a never-ending story. *Food Microbiol* **27**, 568-572.
121. **Mai Thu Thi, T. & Farid, M. (2004).** Ultraviolet treatment of orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **5**, 495-502.
122. **Mamane-Gravetz, H. & Linden, K. G. (2005).** Relationship between physiochemical properties, aggregation and u.v. inactivation of isolated indigenous spores in water. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 351-363.
123. **Marquez, V. O., Mittal, G. S. & Griffiths, M. W. (1997).** Destruction and inhibition of bacterial spores by high voltage pulsed electric field. *Journal of Food Science* **62**, 399-401.
124. **Martinez, S., Borrajo, R., Franco, I. & Carballo, J. (2007).** Effect of environmental parameters on growth kinetics of *Bacillus cereus* (ATCC 7004) after mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* **117**, 223-227.
125. **Mazas, M., Lopez, M., Gonzalez, I., Bernardo, A. & Martin, R. (1997).** Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* **25**, 331-334.
126. **Mehrle, W., Hampp, R. & Zimmermann, U. (1989).** Electric pulse induced membrane permeabilization - spatial orientation and kinetics of solute efflux in freely suspended and dielectrophoretically aligned plant mesophyll protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **978**, 267-275.
127. **Melly, E. & Setlow, P. (2001).** Heat shock proteins do not influence wet heat resistance of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* **183**, 779-784.
128. **Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A. & Setlow, P. (2002).** Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 1105-1115.
129. **Meyer, R. S., Cooper, K. L., Knorr, D. & Lelieveld, H. L. M. (2000).** High-pressure sterilization of foods. *Food Technology* **54**, 67-72.

130. **Min, Z., Moy, J. & Paull, R. E. (1996).** Effect of gamma-irradiation on ripening papaya pectin. *Postharvest Biology and Technology* **8**, 209-222.
131. **Mittendorfer, J., Bierbaumer, H. P., Gratzl, F. & Kellauer, E. (2002).** Decontamination of food packaging using electron beam - status and prospects. *Radiation Physics and Chemistry* **63**, 833-836.
132. **Moeller, R., Horneck, G., Facius, R. & Stackebrandt, E. (2005).** Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology* **51**, 231-236.
133. **Moeller, R., Stackebrandt, E., Reitz, G., Berger, T., Rettberg, P., Doherty, A. J., Horneck, G. & Nicholson, W. L. (2007).** Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *Journal of Bacteriology* **189**, 3306-3311.
134. **Movahedi, S. & Waites, W. (2000).** A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *Journal of Bacteriology* **182**, 4758-4763.
135. **Muranyi, P., Wunderlich, J., Heise, M. (2007).** Sterilization efficiency of a cascaded dielectric barrier discharge. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1535-1544.
136. **Murray, M. B., Gurtler, J. B., Ryu, J. H., Harrison, M. A. & Beuchat, L. R. (2007).** Evaluation of direct plating methods to enumerate Alicyclobacillus in beverages. *International Journal of Food Microbiology* **115**, 59-69.
137. **NC Hyperbaric (2010).** From <http://www.nchyperbaric.com>.
138. **Neetoo, H., Pizzolato, T. & Chen, H. Q. (2009).** Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds through a combination of high hydrostatic pressure and mild heat. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 1901-1907.
139. **Nemtanu, M. R., Brasoveanu, M., Grecu, M. N. & Minea, R. (2005).** Green coffee decontamination by electron beam irradiation. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* **240**, 83-86.
140. **Nicholson, W. L. & Setlow, P. (1990).** Sporulation, germination and outgrowth. In *Molecular Biology Methods for Bacillus*, pp. 391-450. Edited by C. R. Harwood & S. M. Cutting. Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd.
141. **Nicholson, W. L. & Law, J. F. (1999).** Method for purification of bacterial endospores from soils: UV resistance of natural Sonoran desert soil populations of *Bacillus* spp. with reference to *B. subtilis* strain 168. *Journal of Microbiological Methods* **35**, 13-21.

142. **Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. & Setlow, P. (2000).** Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 548-572.
143. **Nicholson, W. L. & Galeano, B. (2003).** UV resistance of *Bacillus anthracis* spores revisited: Validation of *Bacillus subtilis* spores as UV surrogates for spores of *B. anthracis* Sterne. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1327-1330.
144. **Novel Food (1997).** Regulation (EC) No 258/97 Of The European parliament and of the council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients.
145. **Ozen, B. F. & Floros, J. D. (2001).** Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. *Trends in food science & technology* **12**, 60-67.
146. **Ozer, N. P. & Demirci, A. (2006).** Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *International Journal of Food Science and Technology* **41**, 354-360.
147. **Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S. & Sala, F. J. (1999).** Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology* **46**, 243-249.
148. **Peng, J. S., Tsai, W. C. & Chou, C. C. (2001).** Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* **65**, 105-111.
149. **Perrier-Cornet, J. M., Hayert, M. & Gervais, P. (1999).** Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 1-7.
150. **Pettipher, G. L., Osmundson, M. E. & Murphy, J. M. (1997).** Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology* **24**, 185-189.
151. **Radomyski, T., Murano, E. A., Olson, D. G. & Murano, P. S. (1994).** Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation - a review. *Journal of Food Protection* **57**, 73-86.
152. **Rajkovic, A., Smigic, N. & Devlieghere, F. (2010a).** Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology* **141**, S29-S42.
153. **Rajkovic, A., Tomasevic, I., Smigic, N., Uyttendaele, M., Radovanovic, R. & Devlieghere, F. (2010b).** Pulsed UV light as an intervention strategy against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of a meat slicing knife. *Journal of Food Engineering* **100**, 446-451.

154. **Roberts, P. & Hope, A. (2003).** Virus inactivation by high intensity broad spectrum pulsed light. *Journal of Virological Methods* **110**, 61-65.
155. **Rose, L. J. & O'Connell, H. (2009).** UV light inactivation of bacterial biothreat agents. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2987-2990.
156. **Rose, R., Setlow, B., Monroe, A., Mallozzi, M., Driks, A. & Setlow, P. (2007).** Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 691-699.
157. **Rowan, N. J., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., Fouracre, R. A., McIlvaney, L. & Farish, O. (1999).** Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1312-1315.
158. **Ruan, L. F., Yu, Z. N., Fang, B., He, W., Wang, Y. J. & Shen, P. (2004).** Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 286-289.
159. **Sadat, T. (2004).** Do we need X-rays? *Radiation Physics and Chemistry* **71**, 545-549.
160. **Sarrias, J. A., Valero, M. & Salmeron, M. C. (2003).** Elimination of *Bacillus cereus* contamination in raw rice by electron beam irradiation. *Food Microbiology* **20**, 327-332.
161. **Satin, M. (2002).** Use of irradiation for microbial decontamination of meat: situation and perspectives. *Meat Science* **62**, 277-283.
162. **Sauer, A. & Moraru, C. I. (2009).** Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider, using pulsed light treatment. *Journal of Food Protection* **72**, 937-944.
163. **Schaefer, R., Grapperhaus, M., Schaefer, I. & Linden, K. (2007).** Pulsed UV lamp performance and comparison with UV mercury lamps. *Journal of Environmental Engineering and Science* **6**, 303-310.
164. **Schoenbach, K. H., Joshi, R. P., Kolb, J. F., Chen, N. Y., Stacey, M., Blackmore, P. F., Buescher, E. S. & Beebe, S. J. (2004).** Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. *Proceedings of the Ieee* **92**, 1122-1137.
165. **Sen Gupta, B., Masterson, F. & Magee, T. R. A. (2005).** Inactivation of *E. coli* in cranberry juice by a high voltage pulsed electric field. *Engineering in Life Sciences* **5**, 148-151.
166. **Setlow, P. (2001).** Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **38**, 97-104.
167. **Setlow, P. (2006).** Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 514-525.

168. **Sharma, R. R. & Demirci, A. (2003).** Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modeling. *Journal of Food Science* **68**, 1448-1453.
169. **Silva, F. V. M. & Gibbs, P. (2001).** Alicyclobacillus acidoterrestris spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in food science & technology* **12**, 68-74.
170. **Singaravelan, N., Grishkan, I., Beharav, A., Wakamatsu, K., Ito, S. & Nevo, E. (2008).** Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at "Evolution Canyon", Mount Carmel, Israel. *Plos One* **3**.
171. **Slieman, T. A. & Nicholson, W. L. (2000).** Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 199-205.
172. **Smelt, J. (1998).** Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in food science & technology* **9**, 152-158.
173. **Smelt, J. P. P. M., Bos, A. P., Kort, R. & Brul, S. (2008).** Modelling the effect of sub(lethal) heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* **128**, 34-40.
174. **Smiddy, M. A., Martin, J. E., Huppertz, T. & Kelly, A. L. (2007).** Microbial shelf-life of high-pressure-homogenised milk. *International Dairy Journal* **17**, 29-32.
175. **Smith, W. L., Lagunas Solar, M. C. & Cullori, J. S. (2002).** Use of pulsed ultraviolet laser light for the cold pasteurisation of bovine milk. *Journal of Food Protection* **65**, 1480-1482.
176. **Sobrino-Lopez, A., Raybaudi-Massilia, R. & Martin-Belloso, O. (2006).** High-intensity pulsed electric field variables affecting *Staphylococcus aureus* inoculated in milk. *Journal of Dairy Science* **89**, 3739-3748.
177. **Spilimbergo, S., Elvassore, N. & Bertucco, A. (2002).** Microbial inactivation by high-pressure. *Journal of Supercritical Fluids* **22**, 55-63.
178. **Stanton, A. & Rontgen, W. K. (1896).** On A New Kind of Rays. *Nature* **53**, 274-276.
179. **Steriflow thermal processing (2010).** From <http://www.steriflow.com/en>.
180. **Stratford, M., Hofman, P. D. & Cole, M. B. (2000).** Fruit juices, fruit drinks, and soft drinks. In *The Microbiological Quality and Safety of Food Volume I*, pp. 836-869. Edited by B. M. Lund, A. C. Baird-Parker & G. W. Gould. Gaithersburg: Aspen Publishers.

181. **Takeshita, K., Shibato, J., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K. & Itoh, M. (2003).** Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 151-158.
182. **Thayer, D. W., Boyd, G. & Fett, W. F. (2003).** Gamma-radiation decontamination of alfalfa seeds naturally contaminated with *Salmonella mbandaka*. *Journal of Food Science* **68**, 1777-1781.
183. **Thomas, J., Senthilkumar, R. S., Kumar, R. R., Mandal, A. K. A. & Muraleedharan, N. (2008).** Induction of gamma irradiation for decontamination and to increase the storage stability of black teas. *Food Chemistry* **106**, 180-184.
184. **Tobaly, P. (2002).** Les échangeurs de chaleur. [cours]. From <http://genie.industriel.iaa.free.fr>.
185. **Tran, M. T. T. & Farid, M. (2004).** Ultraviolet treatment of orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **5**, 495-502.
186. **Tribst, A. A. L., Franchi, M. A., Cristianini, M. & Massaguer, P. R. d. (2009).** Inactivation of *Aspergillus niger* in mango nectar by high-pressure homogenization combined with heat shock. *Journal of Food Science* **74**, M509-M514.
187. **Turtoi, M. & Nicolau, A. (2007).** Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material. *Journal of Food Engineering* **83**, 47-53.
188. **U.S. FDA (2000).** Title 21, Part 179. Irradiation in the production, processing and handling of food. In *Federal register 65: 71056-71058*. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC.
189. **U.S. FDA. (2005).** Title 21, Food and Drugs. Part 179, Irradiation in the production, processing and handling of food. Subpart B, Radiation and radiation sources. Sec. 179.41, Pulsed light for the treatment of food. In *Code of Federal regulations 21CFR17941*. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC.
190. **Uesugi, A. R., Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2007).** Inactivation kinetics and factors of variability in the pulsed light treatment of *Listeria innocua* cells. *Journal of Food Protection* **70**, 2518-2525.
191. **Uesugi, A. R. & Moraru, C. I. (2009).** Reduction of *Listeria* on ready-to-eat sausages after exposure to a combination of pulsed light and nisin. *Journal of Food Protection* **72**, 347-353.
192. **Wang, T., MacGregor, S. J., Anderson, J. G. & Woolsey, G. A. (2005).** Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Research* **39**, 2921-2925.
193. **Warth, A.D. (1978).** Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* **134**, 699-705

194. **Watanabe, T., Furukawa, S., Hirata, J., Koyama, T., Ogihara, H. & Yamasaki, M. (2003).** Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by high-pressure carbon dioxide treatment. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 7124-7129.
195. **Watson, I. A., Wang, R. K., Peden, I., Ward, G. D., Stewart-Tull, D. E. S. & Wardlaw, A. C. (2005).** Effect of laser and environmental parameters on reducing microbial contamination of stainless steel surfaces with Nd : YAG laser irradiation. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 934-944.
196. **Wei, J., Setlow, P. & Hoover, D. G. (2009).** Effects of moderately high pressure plus heat on the germination and inactivation of *Bacillus cereus* spores lacking proteins involved in germination. *Letters in Applied Microbiology* **49**, 646-651.
197. **Weiss, A. & Hammes, W. P. (2005).** Efficacy of heat treatment in the reduction of *Salmonellae* and *Escherichia coli* O157 : H7 on alfalfa, mung bean and radish seeds used for sprout production. *European Food Research and Technology* **221**, 187-191.
198. **Wekhof, A. (2000).** Disinfection with flash lamps. *Pda Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **54**, 264-276.
199. **Wekhof, A., Trompeter, F. J. & Franken, O. (2001).** Pulsed UV Disintegration (PUVD): a new sterilisation mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. In *The First International Conference on Ultraviolet Technologies*, pp. 15. Washington D.C.
200. **Widera, G., Austin, M., Rabussay, D. & other authors (2000).** Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *Journal of Immunology* **164**, 4635-4640.
201. **Wimalaratne, S. K. & Farid, M. M. (2008).** Pressure assisted thermal sterilization. *Food and Bioproducts Processing* **86**, 312-316.
202. **Wong, E., Linton, R. H. & Gerrard, D. E. (1998).** Reduction of *Escherichia coli* and *Salmonella senftenberg* on pork skin and pork muscle using ultraviolet light. *Food Microbiology* **15**, 415-423.
203. **Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2005).** Influence of surface topography on the effectiveness of pulsed light treatment for the inactivation of *Listeria innocua* on stainless-steel surfaces. *Journal of Food Science* **70**, M345-M351.
204. **Woodling, S. E. & Moraru, C. I. (2007).** Effect of spectral range in surface inactivation of *Listeria innocua* using broad-spectrum pulsed light. *Journal of Food Protection* **70**, 909-916.

-
205. **Wu, Y., Mittal, G. S. & Griffiths, M. W. (2005).** Effect of pulsed electric field on the inactivation of microorganisms in grape juices with and without antimicrobials. *Biosystems Engineering* **90**, 1-7.
206. **Wuytack, E. Y., Boven, S. & Michiels, C. W. (1998).** Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3220-3224.
207. **Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A. & other authors (2003).** Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection* **66**, 31-37.
208. **Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A. E. & Sheard, M. A. (1999).** A mathematical model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* **46**, 45-55.
209. **Yang, X. & Wang, Y. (2008).** Photocatalytic effect on plasmid DNA damage under different UV irradiation time. *Building and Environment* **43**, 253-257.
210. **Yaun, B. R., Sumner, S. S., Eifert, J. D. & Marcy, J. E. (2003).** Response of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 : H7 to UV energy. *Journal of Food Protection* **66**, 1071-1073.
211. **Zacarias, S. M., Vaccari, M. C., Alfano, O. M., Irazoqui, H. A. & Imoberdorf, G. E. (2010).** Effect of the radiation flux on the photocatalytic inactivation of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **214**, 171-180.
212. **Zyball, A. (1995).** Irradiation Technology - Industrial Use. *Radiation Physics and Chemistry* **46**, 449-452.

Valorisation du travail de thèse

Articles scientifiques

Planchon S., Dargaignaratz ., Levy C., Ginies C., Broussolle V., Carlin F. (2010). **Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 °C and 30 °C display variations in their properties.** *Food Microbiology*. 1-7.

Communications scientifiques

Levy C., Gatt G., Busnel M., Chemaly M., Coignard M., Valette M.A. (2009) "**Décontamination des oeufs coquilles par le procédé de lumière pulsée**" (communication orale). Huitièmes journées de la recherche avicole, St Malo, France, 25 et 26 mars.

Levy C., Aubert X., Lacour B., Riedel C., Carlin F. (2009). "**Quels sont les facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour l'élimination des microorganismes dans l'industrie alimentaire?**" (communication orale). Colloque de la SFM, Institut Pasteur, Paris, 5 novembre.

Levy C. (2009) "**Quels sont les facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour l'élimination des microorganismes dans l'industrie alimentaire?**" (Poster). Journées de l'école doctorale SP-SA Montpellier II.

Levy C. (2010) "**Quels sont les facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour l'élimination des microorganismes dans l'industrie alimentaire?**" (Poster). 8ème congrès national de la SFM, Marseille, 2, 3 et 4 Juin.

Levy C., Aubert X., Lacour B., Carlin F. (2010) "**Relevant factors of the decontamination by Pulsed Light in the food industry**". (communication orale). 22nd International ICFMH Symposium, Food Micro 2010, Copenhagen

Web conference

Riedel C., Aubert X., Levy C. (2010) "**Claranor sterilization purified**". 14th June.
www.claranor.com

Planchon S., Dargaignaratz ., Levy C., Ginies C., Broussolle V., Carlin F. (2010). **Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 °C and 30 °C display variations in their properties.** *Food Microbiology*. 1-7.

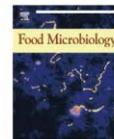
ARTICLE IN PRESS

Food Microbiology xxx (2010) 1–7



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 °C and 30 °C display variations in their properties

Stella Planchon^{a,b,*}, Claire Dargaignaratz^{a,b}, Caroline Levy^{a,b}, Christian Ginies^{a,b},
Véronique Broussolle^{a,b}, Frédéric Carlin^{a,b}

^a INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

^b Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 January 2010
Received in revised form
14 July 2010
Accepted 17 July 2010
Available online xxx

Keywords:
Spore
Sporulation
Resistance
Germination
Temperature

ABSTRACT

Spores of the psychrotrophic *Bacillus cereus* KBAB4 strain were produced at 10 °C and 30 °C in fermentors. Spores produced at 30 °C were more resistant to wet heat at 85 °C, 1 % glutaraldehyde, 5 % hydrogen peroxide, 1 M NaOH and pulsed light at fluences between 0.5 and 1.75 J cm⁻² and to a lesser extent to monochromatic UV-C at 254 nm. No difference in resistance to 0.25 mM formaldehyde, 1 M nitrous acid and 0.025 g l⁻¹ calcium hypochlorite was observed. Spores produced at 10 °C germinated more efficiently with 10 mM and 100 mM L-alanine than spores produced at 30 °C, while no difference in germination was observed with inosine. Dipicolinic acid (DPA) content in the spore was significantly higher for spores prepared at 30 °C. Composition of certain fatty acids varied significantly between spores produced at 10 °C and 30 °C.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bacillus cereus is an endospore forming bacterium and a recognized foodborne pathogen (Anonymous, 2005; Granum, 2007). Spores are a major concern for food industry because of their extreme resistance allowing persistence in the environment (Marquis et al., 1994b; Nicholson et al., 2000). Spores can survive to treatments such as heat, UV, chemicals and acidity (Clavel et al., 2004; Setlow, 2006; Tam et al., 2006). Mechanisms of spore resistance have mainly been investigated in *Bacillus subtilis*, and some are conserved among *Bacillus* species (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2006). In favourable conditions, germination initiates spores return to "active life". This process can occur in foods, as well as in human gut where *B. cereus* is able to adapt and produce diarrhoeal toxins (Arnesen et al., 2008).

The conditions under which sporulation takes place determine spore properties such as their ability to survive and germinate (Atrih and Foster, 2001; Melly et al., 2002; de Vries et al., 2004). Sporulation may occur in a wide range of environments (soil, animal gut including mammals, etc...), under very diverse

temperatures. Sporulation temperature affects resistance to different stress or germination (Melly et al., 2002; Cortezzo and Setlow, 2005). Sporulation temperature also affects the composition and spore structures such as coats (Condon et al., 1992; Melly et al., 2002). Alterations in spore structures or components of defective mutants or chemically treated spores was linked to modified resistance or germination properties (Marquis et al., 1994b; Nicholson et al., 2000; Riesenman and Nicholson, 2000; Setlow, 2006). Psychrotrophic strains are a major concern for food industry because of their ability to grow at refrigeration temperatures. In this work, the KBAB4 strain belonging to the *B. cereus* psychrotrophic group VI (Guinebretiere et al., 2008) was selected and the resistance and germination properties of its spores produced at 10 °C and 30 °C were studied.

2. Material and methods

2.1. Spore production

An overnight culture of *B. cereus* strain KBAB4 (isolated from soil, Versailles, France) (Vilas-Boas et al., 2002) in LB broth was centrifuged 10 min at 7000 g and room temperature, then suspended in CCY sporulation medium (Stewart et al., 1981). The suspension was inoculated into a 2 L bioreactor (Discovery 100, Inceltech, Toulouse, France) at an initial absorbance at 600 nm (A_{600}) of 0.1

* Corresponding author at: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR A408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 9, France. Tel: +334 32 72 25 97; fax: +334 32 72 24 92.

E-mail address: splanchon@avignon.inra.fr (S. Planchon).

Levy C., Gatt G., Busnel M., Chemaly M., Coignard M., Valette M.A. (2009)

"Décontamination des oeufs coquilles par le procédé de lumière pulsée" (communication orale). Huitièmes journées de la recherche avicole, St Malo, France, 25 et 26 mars.

DECONTAMINATION DES OEUFS COQUILLES PAR LE PROCEDE DE LUMIERE PULSEE

**Levy Caroline¹, Gatt Gérard¹, Busnel Morgane¹, Chemaly Marianne²,
Coignard Muriel^{1,3}, Valette Marie-Anne³**

¹CLARANOR, Chemin de la Rollande, Agroparc, BP 21 531, F-84916 Avignon cedex 9, France
²AFSSA, UHQAP, BP 53 22440 Ploufragan, ³ASEPT, Rue des Docteurs Calmette et Guérin - BP
2047 - 53020 LAVAL

La problématique de la contamination des oeufs par des microorganismes pathogènes est un sujet sensible pour une filière à laquelle très peu de solutions technologiques sont offertes. Une étude, menée en collaboration entre l'entreprise CLARANOR, l'AFSSA et le laboratoire ASEPT, visait à évaluer l'efficacité d'un procédé de décontamination par lumière pulsée d'oeufs coquille calibrés (60 - 70g) et mirés mais naturellement contaminés en germes totaux aérobies mésophiles (contamination > 104 germes totaux par oeuf). La lumière pulsée est une technologie de décontamination de surface qui met en oeuvre l'action bactéricide des rayons UV, appliqués aux surfaces sous la forme de flashes de lumière de grande intensité. Un lot d'oeufs témoin a servi à déterminer la contamination initiale du lot. Les oeufs présentant des salissures, souillures, ou traces de liquide séché ont été écartés, ainsi que les oeufs fêlés, déformés, auréolés ou avec une coquille poreuse. Trois lots d'oeufs ont été traités selon trois modalités différentes (1 flash de lumière à 3kV ; 3 flashes à 3 kV et 4 flashes à 2 kV) puis ont été analysés pour déterminer l'efficacité du procédé. La contamination résiduelle en flore totale aérobie mésophile a été dénombrée. L'analyse statistique des résultats a permis de montrer que les trois traitements par lumière pulsée permettent une réduction microbienne d'au moins 2 log UFC par oeuf. Les traitements 1 flash et 3 flashes à tension 3kV présentent une meilleure efficacité que le traitement 4 flash à 2 kV, mais ne sont pas significativement différents entre eux. Le procédé de décontamination par lumière pulsée testé permet donc une réduction microbienne de la surface de la coquille d'oeuf de plus de 3 Log UFC par oeuf. Suite à cette phase d'essais, un équipement industriel de traitement en ligne permettant d'atteindre les mêmes performances de décontamination que celles obtenues lors des essais a été mis au point. L'unité industrielle met en oeuvre 13 lampes installées en sortie de calibreuse et permet de traiter les oeufs à une cadence de 60 000 / heure.

Levy C., Aubert X., Lacour B., Riedel C., Carlin F. (2009). **"Quels sont les facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour l'élimination des microorganismes dans l'industrie alimentaire?"** (communication orale). Colloque de la SFM, les moyens de Maîtrise des contaminants microbiologiques de la chaîne alimentaire, Institut Pasteur, Paris, 5 novembre.

Quels sont les facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour l'élimination des microorganismes dans l'industrie alimentaire ?

Levy Caroline^{1,2}, Aubert Xavier¹, Lacour Bernard¹, Riedel Christophe¹, Carlin Frédéric²

¹*CLARANOR, Chemin de la Rollande, Agroparc, BP 21 531, F-84916 Avignon cedex 9, France,*

²*INRA, SQPOV, domaine St Paul site Agroparc 84914 AVIGNON Cedex 9*

La lumière pulsée détruit les microorganismes par l'application d'éclairs lumineux (« flashes ») de courte durée (quelques μs), et de très forte puissance. Le spectre lumineux émis comprend des longueurs d'onde de 200 à 1100nm (UV, visible, IR). Nos travaux consistent à déterminer les bases scientifiques de l'effet de la lumière pulsée sur les microorganismes afin d'établir un modèle, voire les lois générales de leur destruction, sur un mode semblable à ce qui peut exister pour les traitements thermiques. L'efficacité de la lumière pulsée dépend de nombreux facteurs, d'origine très différente. Le premier domaine étudié correspond aux qualités physiques de la lumière. Grâce à la connaissance d'une dose de lumière maîtrisée et qualifiée pour chaque traitement, il est possible d'exprimer la destruction microbienne en fonction d'une quantité de lumière connue. L'étude de l'importance des UV contenus dans la lumière pulsée a mené à la conclusion que la fraction UV-C (200-280nm) est indispensable à l'efficacité bactéricide. Comme tout traitement, l'efficacité germicide va dépendre de facteurs biologiques et environnementaux. Etablir des lois générales de destruction par lumière pulsée nécessite l'étude d'un grand nombre d'espèces microbiennes. Un même traitement appliqué sur différentes souches permet un classement des microorganismes en fonction de leur résistance plus ou moins marquée à la lumière pulsée. Grâce à cela, un parallèle avec le classement d'espèces selon leur thermorésistance a permis de constater que les mécanismes de résistance à la lumière pulsée ne sont pas ceux mis en jeu lors de la thermorésistance. L'étude de l'environnement dans lequel évoluent les microorganismes est également primordial et constitue un réel enjeu notamment pour les applications industrielles. En effet, les spores bactériennes sont souvent désignées comme sources de contamination dans les milieux industriels, du fait de leur capacité à adhérer aux surfaces et à résister à différents traitements. Des spores de *B.subtilis* DSM 402 ont été traitées sur milieu nutritif et sur 3 surfaces sèches (aluminium, polystyrène, verre). Un traitement d'un seul flash (200 μs) a permis de détruire plusieurs cycles logarithmiques, sur les 4 types surfaces traitées. Les méthodes utilisées pour tester ces différents supports pourront également s'appliquer au traitement de spores de moisissures, elles aussi responsables de contaminations dans le secteur agroalimentaire. Il est important d'obtenir un grand nombre de résultats de décontamination, en fonction d'une variété très importante de facteurs d'influence, afin de cibler les domaines d'application industrielle de la technologie.

Levy C. (2009) "Quels sont les facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour l'élimination des microorganismes dans l'industrie alimentaire?" (Poster). Journées de l'école doctorale SP-SA Montpellier II




Quels sont les facteurs influençant l'efficacité de la Lumière Pulsée pour l'élimination des microorganismes dans l'industrie alimentaire ?




Caroline Levy

CLARANOR SA, Manosque - UMR 408 (SQPOV) INRA-UAPV, Avignon
clevy@claranor.com

Introduction

La Lumière Pulsée détruit les microorganismes par l'application d'éclairs lumineux (« flashes ») de courte durée (quelques µs), et de très forte puissance. Le spectre lumineux émis comprend des longueurs d'onde de 200 à 1100nm (UV, visible IR), mais la fraction UV-C (200-280nm) est indispensable à l'efficacité bactéricide.

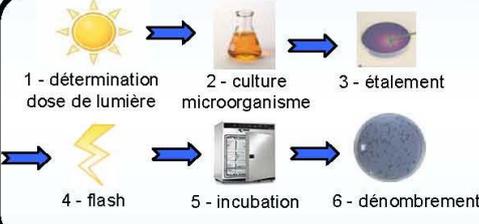
Objectifs

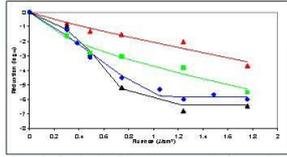
Déterminer les « lois générales » de la destruction des microorganismes sur un mode semblable à ce qui existe pour les traitements thermiques

facteurs physiques	facteurs biologiques	facteurs environnementaux
fluence (J/cm ²)...	spores/cellules végétatives	milieux humides
nombre de flashes	état des cellules	surfaces sèches
tension appliquée	diversité des microorganismes	milieux acides
composition du spectre		

Table 1: facteurs pris en compte pour définir l'effet de la Lumière Pulsée sur les microorganismes.

Méthode





Graphie 1: destruction de spores de 4 souches bactériennes par lumière pulsée. ▲ B. cereus, ■ Gb. stearothermophilus, ● B. subtilis, ▲ B. pumilus. Les courbes représentent l'ajustement par le modèle mathématique

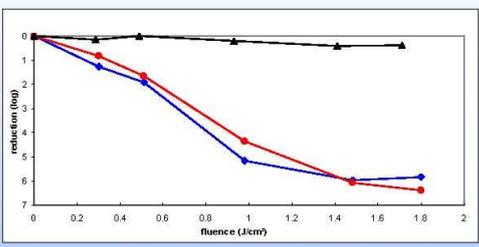
7 - Expression de la destruction

Courbes ajustées grâce au modèle mathématique de Mafart et Albert (2005)¹

$$\log \frac{N_t}{N_0} = \log \left[\left(1 - \frac{N_{res}}{N_0} \right) 10^{-\left(\frac{F}{F_1} \right)^p} + \left(\frac{N_{res}}{N_0} \right) \right]$$

NF = Nombre d'UFC après traitement, No = Nombre initial d'UFC, F = fluence appliquée (J/cm²), Nres/No = contamination résiduelle/contamination initiale, F1 = Fluence nécessaire pour réduction du premier log, p = paramètre déterminant l'allure de la courbe

1 - Importance des UV-C



Graphie 2: Destruction de spores de B. subtilis par lumière pulsée contenant ou non la fraction UV. ■ filtre neutre (200-1100nm), ■ spectre quasi total, sans UV lointains (225-1100nm), ■ spectre sans UV-C (280-1100nm)

Un flash sans UV-C ne produira aucune destruction. La fraction UV-C, qui ne représente qu'un faible pourcentage de la fluence appliquée, est indispensable à l'efficacité de la Lumière Pulsée.

2 - Résistance à la Lumière Pulsée

Microorganisme	dose de fluence (J/cm ²) pour une réduction de:			RANG (par ordre de résistance LP)	Valeurs de D* (min)	RANG (par ordre de thermorésistance)
	1 log ₁₀	3 log ₁₀	5 log ₁₀			
B. cereus	0.44	1.52	2.73	1	0.05	4
Gb. stearothermophilus	0.12	0.71	1.61	2	>60	1
B. Subtilis	0.23	0.52	0.75	3	20	3
B. pumilus	0.27	0.53	0.72	3	31	2

Table 2: classement des microorganismes en fonction de leur résistance à la Lumière pulsée. Comparaison à la thermorésistance
*D: temps de réduction décimal

On évalue la résistance d'un microorganisme à la Lumière Pulsée grâce aux paramètres F1, F3 et F5, déterminés grâce au modèle mathématique. Pas de relation entre le classement des bactéries selon leur degré de résistance à la lumière pulsée et leur thermorésistance.

Conclusions

- 1 seul flash détruit plusieurs cycles logarithmiques sur différents microorganismes
- les spores de bactéries sont ici toutes affectées par le traitement Lumière Pulsée
- Si l'on enlève la partie UV-C (225-280nm), aucune décontamination n'est obtenue: **les UV-C sont indispensables à l'efficacité bactéricide.**
- Les mécanismes de résistances à la Lumière Pulsée semblent être différents de ceux mis en jeux lors de la thermorésistance.
- Les résultats de décontamination obtenus par Lumière Pulsée sont en cours d'exploitation en Industrie.

Remerciements à toute l'équipe CLARANOR ainsi qu'à Frédéric Carlin et les personnes de l'unité microbiologie de l'INRA d'Avignon

¹Albert, J. and P. Mafart (2005). "A modified Weibull model for bacterial inactivation." *International Journal of Food Microbiology* 100(1-3): 197-211.

tel-00747302, version 1 - 31 Oct 2012

Levy C. (2010) "**Quels sont les facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour l'élimination des microorganismes dans l'industrie alimentaire?**" (Poster). 8ème congrès national de la SFM, Marseille, 2, 3 et 4 Juin.

**QUELS SONT LES FACTEURS INFLUENCANT L'EFFICACITE DE LA LUMIERE
PULSEE POUR L'ELIMINATION DES MICROORGANISMES DANS L'INDUSTRIE
ALIMENTAIRE ?**

Levy Caroline^{1,2}, Aubert Xavier¹, Lacour Bernard^{1,3}, Riedel Christophe¹, Carlin Frédéric²

¹CLARANOR, Chemin de la Rollande, Agroparc, BP 21 531, F-84916 Avignon cedex 9, France,

²INRA, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR 408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, 84000 AVIGNON Cedex 9, ³Laboratoire de Physique des Gaz et des Plasmas, UMR 8578 CNRS & Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

La lumière pulsée détruit les microorganismes par l'application d'éclairs de lumière blanche (« flashes ») de courte durée et de très forte puissance. Le spectre lumineux émis comprend des longueurs d'onde de 200 à 1100nm. Nos travaux consistent à déterminer les bases scientifiques de l'effet de la lumière pulsée sur les microorganismes afin d'établir un modèle, voire les lois générales de leur destruction, sur un mode semblable à ce qui peut exister pour les traitements thermiques. Un pilote de lumière pulsée (LP) fabriqué par la société CLARANOR S.A. à été caractérisé, et permet une illumination homogène à la surface de boîtes de Petri de diamètres compris entre 35 mm et 90 mm. Les caractéristiques physiques de la lumière incidente ont été déterminées et la destruction microbienne a été exprimée en fonction de la fluence. La fraction UV-C (200-280 nm) est indispensable à l'efficacité bactéricide. Les endospores de plusieurs espèces bactériennes et des spores d'*Aspergillus niger* ont été traitées par la lumière pulsée à des doses comprises entre 0 et 1,8 j cm⁻² (soit à des doses d'UV-C comprises entre 0 et 145 mJ/cm²) et classées. Les spores d'*Aspergillus niger* s'avèrent plus résistantes que les spores des *Bacillus* spp. Les espèces bactériennes les plus thermorésistantes, ne sont pas les plus résistantes à la LP. *B.subtilis*, *B.atrophaeus* et *B.pumilus* ont montré une destruction similaire par traitement à des fluences équivalentes de lumière pulsée et d'UV-C à une longueur d'onde de 254 nm. Les UV-C nécessitent un temps de traitement 50 000 fois supérieur à celui de la lumière pulsée pour permettre les mêmes niveaux de décontamination (et délivrer les mêmes fluences). Les spores bactériennes ont également été choisies pour tester l'efficacité de la lumière pulsée sur différentes surfaces représentatives de celles rencontrées dans l'industrie alimentaire. Un ensemencement par spray mis au point dans le cadre de ce travail a permis d'obtenir une monocouche de cellules sur les surfaces traitées. Un flash (200µs) a permis une réduction de plusieurs cycles logarithmiques, sur 3 surfaces sèches traitées, ainsi que sur milieu nutritif gélosé. La méthode d'ensemencement par spray s'est avérée beaucoup plus adaptée que la méthode d'ensemencement des surfaces par dépôts de gouttelettes de suspensions microbiennes à l'étude de la décontamination des surfaces par des radiations lumineuses, en raison d'un ensemencement homogène, en monocouche présentant très peu d'amas cellulaires. Les possibilités d'application de la lumière pulsée issues de ce travail seront discutées.



Quels sont les facteurs influençant l'efficacité de la Lumière Pulsée pour l'élimination des microorganismes dans l'industrie alimentaire ?



Caroline Levy, Xavier Aubert, Bernard Lacour, Frédéric Carlin

CLARANOR SA, Manosque - UMR 408 (SQPOV) INRA-UAPV, Avignon, cleavy@claranor.com

Introduction

La Lumière Pulsée détruit les microorganismes par l'application d'éclairs lumineux (« flashes ») de courte durée (200 µs), et de très forte puissance. Le spectre lumineux émis comprend des longueurs d'onde de 200 à 1100nm (UV, visible IR). La fluence (J/cm²) reçue par le microorganisme permet d'établir une relation entre la dose physique (facteur essentiel) et la destruction microbienne.

Objectifs

Déterminer les « lois générales » de la destruction des microorganismes sur un mode semblable à ce qui existe pour les traitements thermiques.

Facteurs physiques	Facteurs biologiques	Facteurs environnementaux
Fluence (J/cm²)	diversité des microorganismes	Surfaces humides
Nombre de flashes	spores/cellules végétatives	Surfaces industrielles
Tension appliquée	stades de croissance	milieux liquides
Composition du spectre		

Table 1: facteurs pris en compte pour définir l'effet de la Lumière Pulsée sur les microorganismes.

1 – Expression de la réduction – Etude du spectre

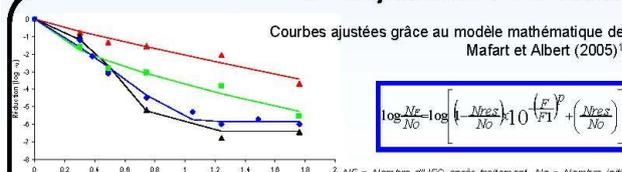


Figure 1: destruction de spores de 4 souches bactériennes par lumière pulsée à 2500V. Les courbes représentent l'ajustement par le modèle mathématique.

$$\log \frac{NF}{No} = \log \left[\left(\frac{NF_{res}}{No} \right) + 10^{-p} \left(\frac{F}{F_1} \right)^p + \left(\frac{NF_{res}}{No} \right) \right]$$

NF = Nombre d'UFC après traitement, No = Nombre initial d'UFC, F = fluence appliquée (J/cm²), NF_{res}/No = contamination résiduelle/contamination initiale, F₁ = Fluence nécessaire pour réduction du premier log, p = paramètre déterminant l'allure de la courbe

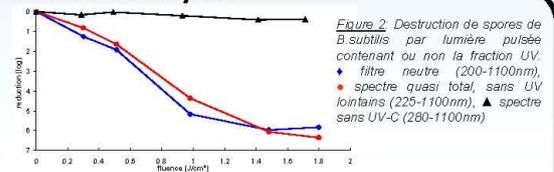


Figure 2: Destruction de spores de B. subtilis par lumière pulsée contenant ou non la fraction UV-C. Les courbes représentent l'ajustement par le modèle mathématique.

2- Traitement de surfaces

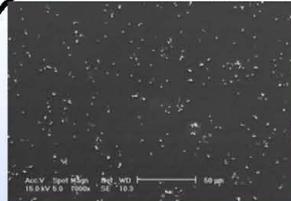
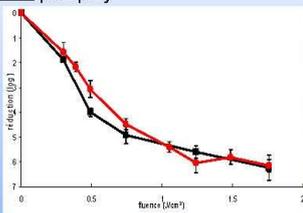


Figure 3: Distribution des spores de B. subtilis pulvérisées par la méthode spray sur surface polystyrène (microscopie électronique à balayage x1000)

Une distribution homogène des spores sur surface sèche avec absence d'amas est obtenue grâce à la méthode d'étalement par spray

La destruction des spores de B. subtilis est identique sur 2 types de surface traitées (gélose et polystyrène), avec plus de 5 log de réduction logarithmique dans les 2 cas en seulement 1 flash

Figure 4: destruction de spores de B. subtilis par lumière pulsée sur surface polystyrène, sur milieu nutritif gélose.



3 – Décontamination de liquides clairs

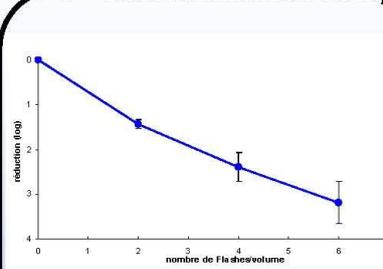


Figure 5: destruction de spores de A. acidoterrestis par lumière pulsée dans du sirop de sucre 10mm d'épaisseur traité en continu (débit de 1.5 m³/h). Dans ce cas, 1 flash/volume correspond à une fluence d'environ 1 J/cm² en surface du liquide.

Le traitement de spores d'A. acidoterrestis a permis des réductions allant jusqu'à plus de 3 log. La machine de traitement en continu de sirop de sucre permet la décontamination de 5 m³ de liquide par heure. Un traitement thermique (milieu aqueux) à 90°C nécessiterait un chauffage de plus d'une demi heure pour obtenir la même réduction logarithmique (D= 16 min)²

Conclusions

- Les spores de bactéries testées peuvent être réduites de plusieurs cycles logarithmiques en un nombre réduit de flashes.
- La suppression des UV-C (225-280nm) rend le traitement par lumière pulsée inefficace sur des spores de B. subtilis: dans ce cas les UV-C sont indispensables à l'efficacité bactéricide.
- La mise en place de méthode de spray a permis de tester l'efficacité de la lumière pulsée également sur des surfaces sèches.
- Une décontamination quasiment identique de spores de B. subtilis a été obtenue sur différents types de surface, avec une réduction de plusieurs cycles logarithmiques en seulement 1 Flash 200 µs.
- L'efficacité du traitement sur des spores de moisissures est en cours d'investigation.

Les auteurs tiennent à remercier le soutien technique de CLARANOR ainsi qu'Isabelle Bornard (microscopie)

¹ Albert, I. and P. Mafart (2005). "A modified Weibull model for bacterial inactivation." *International Journal of Food Microbiology* 100(1-3): 197-211.

² Murakami, M., H. Tedzuka, et al. (1998). "Thermal resistance of Alicyclobacillus acidoterrestis spores in different buffers and pH." *Food Microbiology* 18(6): 577-582.

Levy C., Aubert X., Lacour B., Carlin F. (2010) "**Relevant factors of the decontamination by Pulsed Light in the food industry**". (communication orale). 22nd International ICFMH Symposium, Food Micro 2010, Copenhagen

RELEVANT FACTORS OF THE DECONTAMINATION BY PULSED LIGHT IN THE FOOD INDUSTRY

Levy Caroline^{1,2}, Aubert Xavier¹, Lacour Bernard¹, Carlin Frédéric²

¹CLARANOR, Chemin de la Rollande, Agroparc, BP 21 531, F-84916 Avignon cedex 9, France,

²INRA, SQPOV, domaine St Paul site Agroparc 84914 AVIGNON Cedex 9

Decontamination by Pulsed light (PL) technology uses intense flashes of broad spectrum (200 -1100 nm) white light to kill microorganisms. This work presents the relevant physical, biological and environmental factors influencing the efficiency of PL decontamination. A PL equipment allowing to express a bacterial reduction as a function of the light dose effectively received by the sample (and not as a function of non adequate factors such as distance to the lamp or number of flashes) was qualified. A 5 log reduction of *B.subtilis* spores has been obtained with a fluence of 0.8 J/cm² delivered in 1 flash. The UV-C part of the light (wavelengths between 200 and 280 nm) is essential for the bactericidal activity. The log reductions as a function of UV-C dose of PL and the same UV-C dose using continuous UV light (254 nm) were similar for a given UV-C fluence, and this for several bacterial species, but with the continuous UV a treatment lasts at least 95000 times longer than the PL treatment. Bacterial and mould spores have been tested with PL fluences from 0 to 1.8 J/cm² under an input voltage of 2500 V (i.e. UV-C doses from 0 to 0.15 J/cm²). A high variability was found. Some species, like *B.subtilis*, *B.pumilus*, *B.licheniformis* showed a high sensitivity to pulsed light, with a 5log reduction with less than 1 J/cm². Some species, such as *Aspergillus niger* or *B.cereus* showed a higher resistance to PL. The most heat-resistant species were not necessarily the most resistant to PL. The PL efficiency has been tested on different supports: agar plates representing a wet surface and some dry surfaces representative of the surfaces of the food industry: polystyrene, aluminium and glass. A monolayer (observed by scanning electron microscopy) of *B. subtilis* spores was sprayed using a specifically developed method. A 3 log reduction was obtained with 1 flash only at a dose of 0.5 J/cm² whatever the surface agar, polystyrene, glass or aluminium. The spray method was shown to be better adapted than the droplets deposition to study the pulsed light decontamination on dry surfaces, in particular because of formation of aggregates and several cell layers. Industrial application of PL to the food industry resulting from this work will be discussed.

Riedel C., Aubert X., Levy C. (2010) "**Claranor sterilization purified**". 14th June.
www.claranor.com



STERILIZATION PURIFIED – SECURE YOUR FILLING LINE USING PULSED LIGHT

Date: Monday 14th June,
Time: 17:00 CET, 11:00 am EST
Duration: 1 hour

Pulsed light: a non chemical and dry technology to sterilize caps, closures and cups. Sterilizing caps, closures and cups in a filling line is, most of the time, a ‘dirty’ job. Chemicals, excessive use of water and wasting energy with heat. Until now manufacturers of dairy and beverages did, much to their disappointment, not have any alternative. But now they do, with pulsed light. After years of development, CLARANOR brought the pulsed light technology to a performance level that meets industry standard. So if you want to lead as an eco-responsible manufacturer, and improve on your cost performance: integrate CLARANOR in your filling line. This seminar will introduce you to the revolutionary pulsed light technology: - its perfect performance as a sterilizer;

- its cost performance benefits; and
- its environment friendly assets.

[Claranor Sterilization Purified](#)

