Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier

Radiosensibilisation de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* Typhimurium en présence de composés bioactifs *in vitro* et *in situ*

Par

Aude Ndoti-Nembe

pour l'obtention
du grade de Maître ès science (M. Sc.)
en microbiologie appliquée

Radiosensibilisation de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* Typhimurium en présence de composés bioactifs *in vitro* et *in situ*

Par

Aude Ndoti-Nembe

A été évalué par un jury composé de

M. Charles DOZOIS, président

Mme. Monique LACROIX, directeur de recherche

Nicolas DOUCET, co-directeur de recherche

M. George SZATMARI, évaluateur externe

Remerciements

Je ne saurais commencer ce mémoire sans exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé à la réalisation de mes travaux de recherche.

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Monique Lacroix pour m'avoir permis d'intégrer son laboratoire et pour avoir été un guide et un soutien tout au long de ma maîtrise. Ces années passées dans son laboratoire m'ont permis d'acquérir une expérience professionnelle des plus enrichissantes.

Je remercie également tous mes collègues de m'avoir accompagné et aussi l'ensemble du corps professoral de l'INRS-Institut Armand-Frappier pour la formation scientifique dispensée et pour avoir partagé leurs connaissances et leur rigueur avec moi.

Pour terminer, je remercie mes parents et mes amis pour leur amour et leur soutien inconditionnel.

Table des matières

Résumé VII

Liste des abréviations IX

Liste des tableaux X

Liste des figures XI

Chapitre I : Revue de littérature 1

Introduction 1

I- Les carottes 2

II- Contaminations alimentaires 5

III. Bactéries utilisées 7

IV- La conservation des aliments 9

V Traitement physique 12

VI Traitements naturels 22

VII- La combinaison de traitement 31

VIII. La D_{10} 33

IX. Hypothèses, objectif général et objectifs spécifiques, but 37

IX. Perspectives. 38

Chapitre II: Article 1 39

Effect of combination of essential oils and bacteriocins on the efficacy of gamma radiation against *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* 40

Introduction 43

Materials and methods 46

Essential oils and Bacteriocin preparation 46

Bacterial preparation 46

Treatment of bacteria by essential oils and nisin 47

Irradiation treatment 47

Microbiological analysis 48

Calculation of D_{10} value and relative radiosensitization 48

Statistical analysis 48
Results 49
The radiosensitization of *L. monocytogenes* 49
The radiosensitization of *Salmonella* Typhimurium 50
Discussion 51
Chapitre III: Article 2 64
Abstract 68
Introduction 69
Materials and Methods 71
Essential oils and Bacteriocin preparation 71
Bacterial preparation 72
Carrot preparation 72
Inoculation of pathogenic bacteria onto carrots 73
Antimicrobial coating of carrots 73
Irradiation treatment 73
Shelf life of carrots treated by combined treatments 73
Microbiologic analysis 74
Calculation of D_{10} values and relative radiosensitization 74
Statistical analysis 75
Results and discussion 75
Radiosensitivity of inoculated *Listeria monocytogenes* on carrots 75
Radiosensitivity of inoculated *Salmonella* Typhimurium on carrots 77
Effects of combined treatments on the shelf-life of carrots 78
Conclusion 85
Chapitre IV 96
Discussion 97
Effet des traitements combinés d'huiles essentielles, de nisine et d'irradiation *in vitro*. 98
Effet des traitements combinés d'huiles essentielles, de nisine et d'irradiation *in situ*. 101
Effet des traitements combinés sur la durée de vie des carottes. 104

Conclusion 112
Bibliographie.....114

Résumé

La contamination alimentaire à la salmonelle et à la listéria crée de plus en plus de problèmes de santé publique à travers le monde. Plusieurs milliers d'aliments sont ainsi contaminés chaque année, il y a notamment les viandes, les produits laitiers, mais de plus en plus on assiste à une augmentation de la contamination des fruits et légumes par des bactéries tels que *Escherichia coli, Salmonella* ou encore *Listeria*. Pour éliminer ces germes pathogènes et augmenter la durée de conservation des aliments, l'appel à des procédés d'irradiation est une solution raisonnable qui prend de plus en plus de place. Cette technique est acceptée aux États-Unis et préconisée dans d'autres pays. Toutefois, l'irradiation à des doses requises pour la destruction totale des germes pathogènes peut parfois générer des modifications chimiques et organoleptiques dans certains aliments.
Afin de remédier à ces modifications sur les aliments et afin de contrer la résistance de certaines bactéries à l'irradiation, il a été proposé à ce jour de prétraiter les aliments avant de les soumettre à l'irradiation. Plusieurs types de prétraitements ont été étudiés, dans notre étude, les prétraitements appliqués ici seront des huiles essentielles et des bactériocines.

Dans le cadre de cette étude, nous avons en premier évalué l'efficacité des huiles essentielles et des bactériocines à augmenter la radiosensibilité bactérienne de *Salmonella* Typhimurium et *Listeria monocytogenes* en milieu liquide (Tryptic soy broth). Deux huiles essentielles et une bactériocine ont été utilisées dans ces expériences. Ici, les bactéries ont été menées à pousser dans un milieu nutritif liquide jusqu'à une concentration volume 10^8 CFU/ml. Ensuite, les bactéries ont été mélangées aux huiles

essentielles toutes seules ou en combinaison avec des bactériocines. Une fois le mélange obtenu pour avoir une concentration finale de 10^6 UFC/ml le mélange a été soumis à des doses croissantes d'irradiation au ^{60}Co de 0 à 3 kGy. Il a été observé qu'en fonction du composé testé, il y a une augmentation de la sensibilité relative de 1 à 6.31 fois pour *Listeria monocytogenes* et de 1 à 1.84 fois pour *S.* Typhimurium. Les résultats montrent que l'addition d'huiles essentielles et/ou de bactériocines avant le traitement d'irradiation permet de réduire la dose d'irradiation nécessaire pour éliminer les deux pathogènes.

Une fois l'évaluation effectuée en milieu liquide, il était important de vérifier si les résultats que nous avons obtenus *in vitro* seraient les même lorsqu'appliqués à un aliment. Les mêmes huiles essentielles et la même bactériocine ont été appliquées sur des carottes pré-coupées. Ces carottes étaient au préalable inoculées par les bactéries cibles que nous voulions évaluer soit *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium. Une fois contaminées à une concentration de 10^6UFC/g et prétraitées avec les huiles essentielles et/ou la bactériocine, les carottes étaient soumises à des doses d'irradiation au ^{60}Co comprises entre 0 et 3 kGy.

Pour terminer, un test d'évaluation de l'effet de radiosensibilisation dans le temps a été effectué sur une période de 9 jours. Les résultats montrent qu'un traitement avec les huiles essentielles et les bactériocines en combinaison du traitement d'irradiation à faibles doses (0.5 et 1 kGy) ont un effet synergique pour réduire et stabiliser la charge microbienne. Ces traitements permettent d'étendre la durée de vie et d'assurer l'innocuité des carottes au cours du stockage à 4 °C pendant 9 jours.

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ACIA: Agence Canadienne d'Inspection des Aliments

AQR : Apport Quotidien Recommandé

Co: Cobalt

Cs: Césium

CVNC: Cellules viables mais non cultivables

UFC/ml: Colony Forming Unit par millilitre

D_{10} : Dose pour réduire de 90 % une population

DLC : Date Limite de Consommation

FAO: Food agriculture organisation

Gy: Gray

HEs: Huiles essentielles

kGy: Kilogray

kDa: Kilodalton

OMS: Organisation mondiale de la santé

SIDA: Syndrome d'Immuno Déficience Acquise

EO : Essential Oil

Liste des tableaux

1-Revue de littérature

Tableau 1 : Valeurs nutritives pour ½ tasse de carottes 4

Tableau 2 : Schéma représentant l'effet de l'irradiation par rapport à la dose appliquée 19

Tableau 3: Huiles essentielles ayant été reconnues pour avoir des effets antimicrobiens dans les aliments..... 23

Tableau 4 : Tableau de classification des bactériocines 27

Tableau 5 : Radiorésistance typique de certaines bactéries dans des aliments congelés d'origine animale 36

2-Tableaux deuxième article

Table 1 : Différents traitements contre *Listeria monocytogenes* sur carottes dans le temps 94

Table 2 : Différents traitements contre *Salmonella* Typhimurium sur carottes dans le temps 95

Liste des figures

1-Revue de littérature

Figure 1: Irradiateur utilisant le ^{60}cobalt comme source d'énergie 15

Figure 2-a: Mécanisme d'action des rayonnements ionisants par action indirecte 16

Figure 2-b: Mécanisme d'action des rayonnements ionisants par action directe 17

Figure 3: Symbole international désignant les aliments irradiés 22

Figure 4: Séquence et structure de la nisine 28

2-Premier article

Figure 1-c : Valeurs de D_{10} des différents traitements contre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium 62

Figure 2-a : Radiosensibilisation relative des différents traitements contre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium 63

2-Deuxième article

Figure 1-d : Valeurs de D_{10} des différents traitements contre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium sur carottes 92

Figure 2-b: Radiosensibilisation relative des différents traitements contre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium sur carottes 93

Chapitre I : Revue de littérature

Introduction

La contamination alimentaire par des microorganismes est un problème de santé publique auquel les gouvernements font face. Les bactéries pathogènes telles que *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7 et *Campylobacter* sont à l'origine de nombreuses maladies couramment appelées infections alimentaires. Chaque année, environ 30 % des personnes vivant dans les pays développés sont touchées par des maladies d'origine bactériennes. Selon l'agence canadienne de santé, chaque année 11 à 13 millions de Canadiens et Canadiennes souffrent de maladies d'origine alimentaire (Santé Canada). Aux États-Unis, le gouvernement estime le nombre de cas de maladies dues à la consommation d'aliments contaminés à 76 millions par an. Sur ces 76 millions de cas, on compte 325 000 hospitalisations et 5000 décès (Tauxe, 2001). Ce genre d'affection touche beaucoup plus les jeunes et les personnes âgées ayant déjà le système immunitaire affaibli par d'autres maladies, mais aussi, et surtout les personnes ayant des maladies touchant le système immunitaire tel que le SIDA. Chez des personnes en pleine santé, ce genre d'affection est dû à la consommation d'aliments hautement infectés.

Les dépenses attribuables aux infections alimentaires sont estimées à environ 500 millions de $ par année. Dépenses attribuables à la dégradation des aliments (viandes, volailles et poissons) : estimées à $ 200 millions par année. Il est par conséquent important de développer des techniques qui vont permettre d'éliminer et de contrôler les pathogènes alimentaires, afin ainsi de réduire le nombre de cas de contamination alimentaire et de possiblement prolonger la durée de vie des aliments.

I- Les carottes

Les carottes, aussi appelées *Daucus carotta*, sont des légumes de la famille des *Apiacées*. Il existe à ce jour plus de 500 variétés de carottes. Selon les données publiées en 2007 par Statistiques Canada, la production totale de carottes représente 280 043 tonnes par an et la consommation annuelle moyenne de carottes est de 3.77 kg par personne. Ce qui fait que la carote est le 4e légume consommé au Canada après les pommes de terre (28,55 kg), la laitue (5.58 kg) et les tomates (4.54 kg).

La carotte est un des aliments les plus riches en provitamines A (qui seront par la suite transformées en vitamines A) et en caroténoïdes tels que le bêta-carotène, la lutéine et la zéaxanthine, qui sont des éléments importants à la santé (Tableau 1). Les carottes sont aussi reconnues pour être riches en fibres et en vitamines tels que la vitamine B6, K, B2 et bien d'autres.

Avec l'augmentation de la consommation des fruits et légumes prêts à manger est apparue la transformation des carottes comme celle des autres légumes. La consommation de carottes transformées représente 1.4 kg par personne par an sur les 3.77 kg de carottes consommées par an pour chaque personne, ce qui représente plus du tiers de la consommation annuelle de carottes par personne. Les carottes sont reconnues pour leurs effets positifs sur la santé. En effet, elles joueraient un rôle bénéfique dans la prévention des maladies cardiovasculaires et l'apparition de certains cancers. Elles sont aussi reconnues pour leurs effets positifs sur le transit intestinal, notamment, en ce qui concerne la constipation (Nyberg *et al*, 1998 ; Nicolle *et al* 2003).

I-1 Flore microbienne des carottes

Les problèmes de salubrité alimentaire ont presque toujours été associés à la consommation de produits laitiers ou de produits carnés (poulet, bœuf). Mais de plus en plus de problèmes de salubrité alimentaire liés aux fruits et légumes apparaissent (Heaton et Jones, 2008; Berger *et al.*, 2010). On accorde maintenant plus d'importance aux denrées végétales et aux jus comme sources possibles de maladies d'origine alimentaire. Bien que les carottes soient en général considérées comme sans danger, des cas d'intoxications alimentaires liés à la consommation de carottes ont déjà été déclarés. La contamination des carottes se fait en général à deux niveaux, soit au niveau de la production ou encore au niveau de la vente au détail.

Au niveau de la production, on constate une contamination qui peut être due à la contamination par les sols. En effet, des bactéries telles que *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* (Schaub, 2010) sont deux bactéries qui peuvent potentiellement contaminer les carottes. Ces deux bactéries peuvent se retrouver dans le sol et ainsi contaminer les produits qui y poussent. On constate aussi une contamination due au processus de traitement des aliments. En effet, au cours de la transformation, le produit est exposé à diverses sources de contamination possibles. La contamination durant la vente au détail est surtout due au mode et au temps de conservation des aliments. De nombreux autres pathogènes ont aussi été associés à des flambées provoquées par des légumes et des fruits frais. En effet, depuis 1990, *E. coli* a été identifié comme étant le pathogène en cause dans plusieurs cas de maladies d'origine alimentaire suite à la consommation de carottes (Direction de l'inspection des aliments, division de l'industrie alimentaire, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation de l'Ontario, 2001).

Tableau 1 : Valeurs nutritives pour ½ tasse de carottes (Santé Canada, fichier canadien des éléments nutritifs, 2007b)

AQR= apport quotidien recommandé

	Crue	Bouillie	En conserve	Surgelée, bouillie	AQR**
Énergie	26 Cal	29 Cal	19 Cal	29 Cal	
Protéines	0.6 g	0.63 g	0.49 g	0.45 g	
Glucides	6.2 g	6.77 g	4.27 g	5.96 g	
Lipides	0.15 g	0.15 g	0.15 g	0.52 g	
Fibres	1.6 g	2.2 g	1.2 g	1.8 g	25 g
Sodium	45 mg	48 mg	187 mg	46 mg	
Provitamine A***	5538 ug	9979 ug	6228 ug	9151 ug	
Vitamine B9	12.5 µg	12 µg	7 µg	8 ug	220 µg
Lutéine+zéaxanthine	134 µg	566 µg	0 ug	223 ug	

* Fichier canadien des éléments nutritifs (2007b) ** Apport quotidien recommandé – vitamines-minéraux/Norme de référence – fibres, potassium; *** Seules les caroténoïdes ont été considérées.

II- Contaminations alimentaires

Les aliments sont des éléments que nous ingérons quotidiennement afin de nous fournir l'énergie nécessaire à notre survie. Il existe différents types d'aliments, et selon les différents types, les méthodes de conservation varient. La conservation et l'innocuité des aliments sont des problèmes de santé publique qui préoccupent beaucoup les gouvernements. Manger des aliments non sains entraine le développement de maladie dite d'origine alimentaire.

Il existe différents contaminants alimentaires, mais les principaux et les plus préoccupants sont d'origine bactérienne. À ce jour, les contaminants alimentaires bactériens les plus redoutés sont des bactéries telles que *Listeria monocytogenes, E. coli, Salmonella,* et *Campylobacter* (Farkas, 1998).

Il existe différentes manières de contaminer des aliments, mais les deux principales formes de contamination sont la contamination environnementale et la contamination microbienne. La contamination microbienne se subdivise en deux : la contamination croisée et la contamination directe. La contamination directe est une contamination qui peut se faire au cours des différents stades de transformation du produit; par exemple, au cours de l'abatage des volailles et du bétail ou encore par le fait de mal entreposer les aliments ou de les laver avec de l'eau souillée. La contamination croisée quant à elle se produit lorsqu'on transfère les contaminants des aliments contaminés à des aliments sains. Cela se passe en général à travers l'utilisation d'ustensiles souillés ou via contamination lors de la préparation des aliments contaminés comme la viande.

La contamination environnementale quant à elle se passe en général dans les champs ou dans les fermes. Par exemple, dans le cas des fruits et légumes, la contamination

environnementale pourrait provenir du sol qui serait contaminé, ou encore d'insectes qui viendraient déposer sur la plante des micro-organismes pathogènes. Elle peut aussi se faire au cours de l'arrosage avec de l'eau contaminée.

La consommation d'aliments contaminés va entrainer des maladies qui vont se présenter sous deux principales formes, soit des infections ou des intoxications alimentaires. Une infection alimentaire se manifeste à la suite de la consommation d'aliments contaminés par un microorganisme pathogène. Tandis qu'une intoxication est due à la consommation d'aliments contaminés dans lesquels les microorganismes ont produit des toxines.

II-1 Contamination des légumes

Les légumes sont des aliments importants pour une alimentation saine et équilibrée, leur consommation est en général encouragée. Pourtant, les légumes sont de plus en plus reconnus pour leur implication dans la transmission de maladies infectieuses dues à des agents pathogènes alimentaires (Berger *et al.*, 2010). Avec l'augmentation de la demande en légumes et en fruits à travers le monde, on assiste aujourd'hui à une production massive de légumes destinés à la consommation, ce qui a pour conséquence d'augmenter le risque de contaminations. Les produits frais tels que les légumes se consomment en général crus, ce qui représente un risque pour les consommateurs. La contamination des légumes peut se faire à deux niveaux, soit avant la récolte, soit dans la phase après la récolte. Dans les champs, la principale source de contamination provient de l'eau utilisée pour arroser les plantes, elle peut aussi provenir de fumier utilisé par les fermiers pour fertiliser les sols. Tandis que pendant la phase d'après la récolte, le risque vient du fait que les légumes vont subir une série de manipulation visant à les apprêter. C'est le fait de manipuler les légumes qui est source de contamination. Parmi les légumes généralement

contaminés, on peut citer la laitue, les épinards et les tomates (Heaton and Jones, 2008). Mis à part ces légumes, on assiste aujourd'hui à une augmentation de la contamination bactérienne par les carottes. Bien que généralement considérées comme sécuritaires à la consommation, on constate de plus en plus d'épidémies dues à la consommation de carottes contaminées.

En 1990, une épidémie s'est déclarée due à la consommation de carottes contaminées par la bactérie *E. coli* (Ministry of Agriculture, 2001). En 2005 et 2007, deux épidémies de contamination avec la bactérie *Shigella* associées aux carottes contaminées ont été observées (Schaub, 2010).

III. Bactéries utilisées

III.1 Listeria monocytogenes

Il existe plusieurs espèces de Listeria dont : *L. ivanovii, L. innocua, L. seeligeri, L. welshimeri, L. grayi, L. monocytogenes*. Mais une seule est reconnue comme étant l'espèce causant la maladie chez l'humain, cette espèce est l'espèce *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes est une bactérie à Gram positif du genre Listeria, elle doit son nom à un chirurgien britannique du nom de Joseph Lister. C'est un bacille aéroanaérobie facultatif que l'on retrouve à peu près partout (eau, sol, végétaux), elle est catalase positive et mobile à une température de 20°C. *L. monocytogenes* est une bactérie opportuniste pouvant infecter une grande variété d'animaux, y compris les humains. Il existe à ce jour 13 sérotypes différents de *L. monocytogenes* qui peuvent causer la maladie, mais plus de 90 % des bactéries isolées des malades appartiennent à trois

sérotypes : 1/2a, 1/2b et 4b. Le mode de transmission de la maladie se fait par deux principaux modes, la contamination alimentaire, et la contamination nosocomiale. Chez les humains, la transmission se fait en général par voie digestive, soit par contamination alimentaire. La maladie associée à *L. monocytogenes* survient surtout chez les nouveau-nés, ou les personnes âgées. Les personnes se trouvant entre les deux groupes d'âge peuvent être atteintes, mais ce sont en général des personnes ayant le système immunitaire affaibli ou absent. Lorsqu'ingérée, *L. monocytogenes* va causer une maladie appelée listériose, qui se traduit par différentes manifestations cliniques telles que la méningite, la bactériémie et l'endocardite chez les adultes atteints, ou encore par des septicémies et des pneumonies chez les nouveau-nés. Le taux de mortalité de la listériose varie entre 20 et 30 % (Munoz *et al*, 2011).

III.2 Salmonella Typhimurium

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bactéries à Gram négatif anaérobie facultatives qui appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries mobiles qui présentent différentes caractéristiques biochimiques, elles sont notamment nitrate -, réductase +, elles sont capables de fermenter le glucose, mais pas le lactose, elles sont aussi H_2S +, uréase - et lysine décarboxylase +. Le genre *Salmonella* est constitué de cinq principaux sous-groupes, mais le sous-groupe le plus important en santé humaine est le premier sous groupe qui comprend notamment *S. choleraesuis, S. Typhi, S. paratyphi A,* et *S. enteritidis*. La bactérie *S.* Typhimurium est comprise dans le sous-groupe de *S. enteritidis* (bactériologie médicale). Le sous-groupe de *S. enteritidis* est le principal sous-groupe responsable des salmonelloses transmises de l'animal à l'homme.

En général, les humains vont contracter une salmonellose en consommant des aliments contaminés, qui sont en général d'origine animale. Il y a notamment la viande, la volaille, les œufs ou encore le lait, même si d'autres aliments comme les légumes peuvent aussi être impliqués dans la transmission de la salmonellose (Aide-mémoire N°139, OMS).

La salmonellose va en général se manifester par plusieurs symptômes tels que, des poussées aiguës de fièvre, des douleurs abdominales, de la diarrhée, des nausées et parfois même des vomissements. Chez les très jeunes enfants et les personnes âgées, elle peut entrainer une déshydratation qui peut être mortelle. Aux États-Unis, il a été évalué qu'environ 1,4 million de personnes par an sont touchées par une infection aux salmonelles non typhoïdiques, entraînant ainsi 168 000 visites chez le médecin, 15 000 hospitalisations et 580 décès (Aide-mémoire N°139, OMS).

Il est par conséquent important de trouver de nouvelles avenues afin de combattre les contaminations alimentaires.

IV- La conservation des aliments

À ce jour, il existe différentes techniques qui peuvent permettre de conserver un aliment, que ce soit dans le temps ou pour une consommation rapide. Il existe notamment des traitements de congélation, de pasteurisation, d'appertisation et d'irradiation, dont la combinaison permet une efficacité plus prononcée.

IV-1 Traitements par le froid

La congélation

La congélation est une technique de conservation qui va utiliser le changement d'état de l'eau liquide en glace, ainsi que le maintien du produit à une température minimale de -20 °C. La congélation passe donc par une diminution de la température, ce qui va avoir pour conséquence de ralentir la cinétique de certaines réactions biochimiques. La congélation passe aussi par une diminution de l'activité de l'eau. L'activité de l'eau peut se définir comme le rapport entre la pression partielle de vapeur d'eau du produit et la pression partielle de vapeur d'eau pure à la même température. La diminution de l'activité de l'eau va entrainer une cristallisation des molécules d'eau contenues dans l'aliment.

La combinaison de ces deux effets va ainsi permettre de conserver l'aliment sur de longues périodes. La congélation ne va pas permettre une élimination des microorganismes du produit, mais elle va permettre de les inhiber afin de maintenir un niveau acceptable de bactéries, autant que possible proche du niveau de départ.

Bien que la congélation soit une technique qui présente plusieurs avantages quant à la conservation des aliments, elle peut aussi être source de modifications qui peuvent porter atteinte au produit que l'on voudrait conserver. En effet, au cours de la congélation, le produit est exposé à différentes modifications physico-chimiques qui pourraient l'affecter. On peut citer les modifications qui surviennent dans les espaces liquides résiduels. Une des conséquences de la congélation est d'accroitre la concentration des solutés présents dans l'aliment tels que l'augmentation de la concentration en sels ou encore une baisse du pH due à l'augmentation de la force ionique. Ces changements peuvent avoir un impact défavorable sur la qualité de l'aliment. La régulation de la

température d'entreposage peut aussi avoir un effet néfaste sur la qualité de l'aliment. En effet, lorsque congelés, les aliments subissent une variation constante de température. Ceci s'explique par le fait que la production de froid par les congélateurs est un mécanisme cyclique qui passe par des phases de froid d'amplitudes différentes en fonction de l'activité du compresseur. À chaque cycle, l'augmentation de la température entraine une décongélation d'une certaine proportion de l'eau du produit, cette eau va par la suite recongeler au cycle suivant. Ces phases de congélation et de légère décongélation vont entrainer une dégradation de la qualité du produit.

IV-2 Traitements par la chaleur

Le traitement des aliments par des techniques utilisant la chaleur est très répandu dans le domaine alimentaire. La pasteurisation est une de ces techniques, elle peut se définir comme la destruction de microorganismes par une élévation de la température pendant un temps précis qui est immédiatement suivi d'un refroidissement. L'élévation de température est en générale comprise entre 65 et 88 °C. Cette technique a été inventée au 19e siècle par le microbiologiste français Louis Pasteur. Elle est très utilisée pour des aliments qui vont par la suite être conservés à froid. Cette conservation peut aller de quelques jours à quelques semaines. Le fait d'utiliser la chaleur comme technique va entrainer une réduction des activités biologiques comme pour la congélation. Mais cette technique entraine aussi des changements dans la qualité organoleptique et nutritionnelle des aliments. Dépendamment de la température utilisée et du temps pendant lequel l'aliment est soumis à cette température, il peut y avoir un impact sur la qualité nutritionnelle de l'aliment.

Selon la température et le temps utilisés, il existe trois principales formes de pasteurisation : la pasteurisation basse, qui utilise des températures comprises entre 60-65°C pendant 15 à 30 minutes; la pasteurisation haute, utilisant des températures comprises entre 70-75° C pendant 15 à 40 minutes et enfin le flash pasteurisation, utilisant des températures comprises entre 85 et 95 °C pendant 1-2 secondes. Le défi dans la technique de pasteurisation réside dans le fait de trouver une température et un temps d'application suffisamment efficace, mais qui n'aurait pas de conséquence sur la qualité nutritionnelle de l'aliment (Jeant *et al*, 2006)

V Traitement physique

V-1 L'irradiation

V-1-1 Définition

Ce procédé a vu le jour dans les années 1940 et a commencé à être utilisé pendant la seconde guerre mondiale comme traitement antibactérien et fongicide. L'irradiation désigne le fait de soumettre un corps à des rayonnements ionisants. Le rayonnement ionisant est un rayonnement qui a la particularité de créer des charges électriques en contact avec la matière. Les charges électriques créées peuvent être soit positives soit négatives et sont appelées des ions. Ces rayonnements peuvent être soit des rayons alpha, bêta, gamma, ou encore des protons ou des neutrons (Santé Canada, 2008).

Il existe différentes applications à l'irradiation, notamment en ce qui concerne la stérilisation des produits pharmaceutiques (seringues, diachylon, etc.).

Dans l'industrie agroalimentaire, l'irradiation est un procédé utilisé pour la conservation et la décontamination des aliments. Il peut aussi être utilisé comme inhibiteur de la germination de certains végétaux et du murissement des fruits. L'irradiation dans l'industrie agroalimentaire se fait de trois manières précises, soit par faisceaux d'électrons, soit par des rayons-X ou encore par des rayons gamma. De nombreux irradiateurs utilisent comme source de rayonnement le cobalt ^{60}. Tous les aliments ne sont pas nécessairement soumis à l'irradiation, il existe des aliments qui sont plus sujets à l'irradiation que d'autres. La décision d'irradier certains aliments plutôt que d'autres revient à chaque pays. Tous les pays où l'irradiation se pratique n'irradient pas les mêmes aliments. En effet, au Canada, les aliments irradiés sont : l'oignon, les pommes de terre, le blé, la farine, la farine de blé entier, les épices entières ou moulues et les assaisonnements déshydratés (Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2012), (Caillet *et al.*, 2005). Aux États-Unis par contre, il y a plus d'aliments qui sont soumis à l'irradiation, notamment les épices, les viandes et les volailles, le porc, les fruits et légumes et bien d'autres (Tauxe, 2001). Les Pays-Bas irradient à elle seule plus d'une quarantaine de produits alimentaires. Plus d'une cinquantaine de produits alimentaires sont irradiés dans plus d'une quarantaine de pays dans le monde.

V-1-2 But et mode d'action de l'irradiation

L'objectif premier de l'irradiation était de pouvoir répondre au problème de conservation et d'innocuité des aliments distribués au grand public. L'irradiation sert aussi de méthode de stérilisation pour le domaine médical. En effet, beaucoup d'instruments et d'autres matériels médicaux sont stérilisés par irradiation. La technique sert aussi pour l'irradiation des aliments destinés à être consommé dans l'espace. Avec l'augmentation de l'incidence des maladies d'origine alimentaire, et les pertes économiques qui suivent l'éclosion de contamination, de plus en plus de pays se mettent à pratiquer l'irradiation, bien qu'elle demeure encore une technique controversée.

De manière générale, l'irradiation des aliments se fait avec comme source d'énergie ionisante soit le cobalt-60 (^{60}Co), le césium-137 (^{137}Cs) les rayons-X ou encore des faisceaux d'électrons. Mais comme nous l'avons déjà indiqué, la source la plus utilisée est celle du cobalt-60. Un irradiateur au cobalt 60 est composé d'une piscine dans laquelle les crayons de cobalt-60 sont plongés. La piscine est confinée par des murs en ciment d'une épaisseur de 1.5 mètre, ce qui permet d'absorber les rayonnements (Figure 1). Le processus d'irradiation se passe en deux étapes, premièrement les boites contenant les produits à irradier sont acheminées au niveau de l'irradiateur. Une fois acheminés, les crayons de cobalt peuvent être sortis de la piscine. Ainsi les rayonnements émis par le cobalt vont irradier les produits.

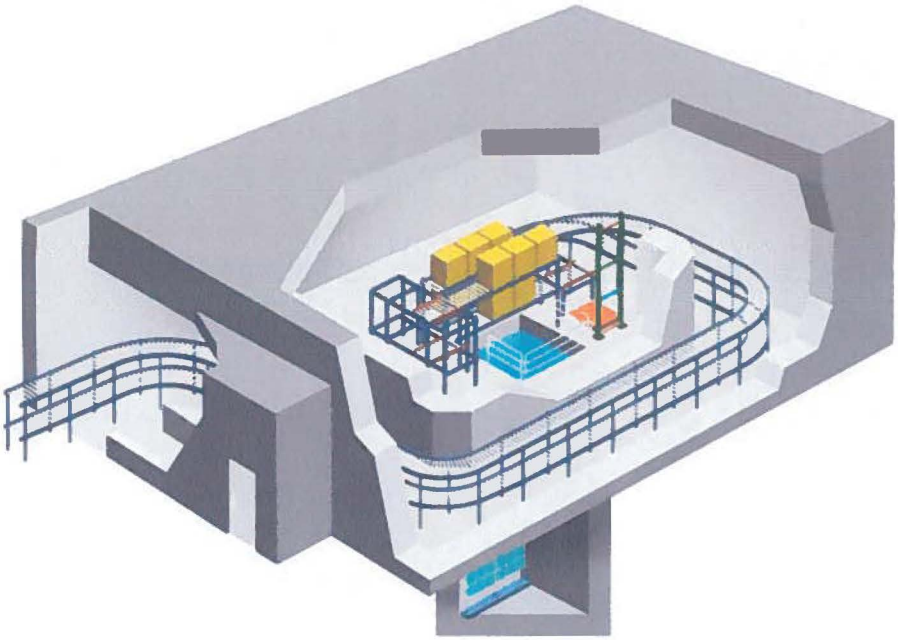

Figure 1 : Exemple d'irradiateur utilisant le cobalt^{60} comme source d'énergie.

(Image prise du site de Nordion, qui est un des principaux fabricants d'irradiateurs dans le monde, http://www.nordion.com/).

Le cobalt-60 émet des rayons gamma qui vont pénétrer les aliments. Ces rayons agissent de deux principales façons sur les cibles à irradier: de manière directe et de manière indirecte.

On parle d'action directe (Figure 2-a) lorsque des particules alpha, bêta ou des rayons-X créent des ions qui séparent physiquement l'un des deux ou les deux squelettes sucre-phosphate ou brisent les paires de bases de l'ADN. Les paires de base adénine, thymine, guanine et cytosine sont maintenues ensemble par des liaisons hydrogène faibles. L'adénine est toujours associée à la thymine (sauf dans l'acide ribonucléique [ARN], où la thymine est remplacée par l'uracile) et la guanine est toujours associée à la cytosine. La liaison de ces paires de bases peut également être touchée par l'action directe du rayonnement ionisant. (Association nucléaire canadienne, 2010)

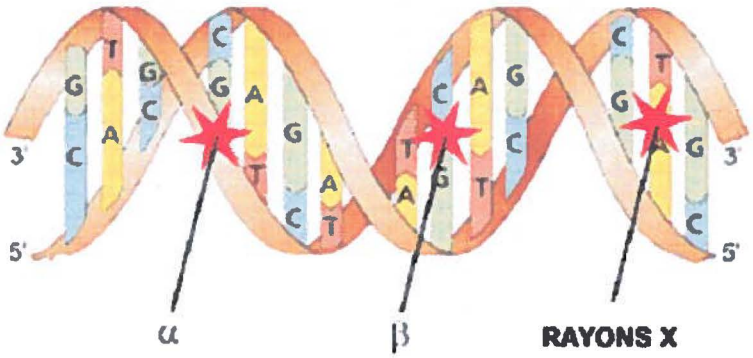

Figure 2-a: Action directe des rayons sur l'ADN

(Tiré du site de l'Association nucléaire canadienne, 2010, http://www.cna.ca/fr/)

Les rayonnements ionisants peuvent aussi causer indirectement des dommages ou des lésions aux cellules en créant des radicaux libres comme on peut le voir dans la Figure 2-b. Les radicaux libres sont des molécules extrêmement réactives en raison de la présence d'électrons libres (ions), créés par la séparation des molécules d'eau. Ils peuvent former des composés comme le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène ou le superoxyde, qui peuvent induire des réactions chimiques nocives au sein des cellules. Par suite de ces changements chimiques, les cellules peuvent subir divers changements structurels qui entraînent leur mort ou transforment leur fonction. (Association nucléaire canadienne, 2010).

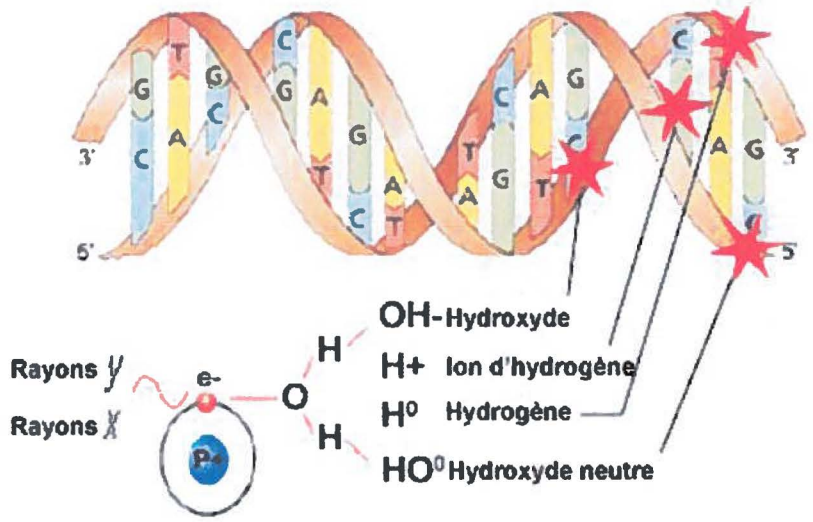

Figure 2-b: Action indirecte des rayons sur l'ADN

(Tiré du site de l'Association nucléaire canadienne, 2010, http://www.cna.ca/fr/)

V-1-3 Effet de l'irradiation

Le traitement par irradiation a été signalé comme étant un excellent processus pour réduire ou éliminer les agents pathogènes d'origine alimentaire telle que *S.* Typhimurium et *L. monocytogenes* (Clavero *et al.*, 1994; Farkas *et al*, 1998; Niemira *et al.*, 2003). Cependant, l'utilisation des rayonnements pour tuer les agents pathogènes est limitée en raison du fait que les rayonnements peuvent induire des effets néfastes sur la qualité sensorielle des produits alimentaires (Lacroix *et al.*,1991). En effet selon la FAO, la IAEA et l'OMS, l'irradiation est un procédé sécuritaire lorsqu'utilisé dans certaines conditions et à des doses d'irradiation dépendantes de l'aliment (Giroux et Lacroix, 1998). En effet, pour des expositions n'excédant pas 10 kGy, l'irradiation n'induirait pas de problèmes nutritionnels sur les produits frais. Certains autres produits tels que les produits congelés peuvent être irradiés à des doses allant jusqu'à 45 kGy.

En effet, comme il peut être observé sur le Tableau 2, l'effet de l'irradiation dépend de la dose appliquée. On voit qu'à 0.7 kGy on a une amélioration de la qualité et de la durée de conservation des fruits, des légumes et des produits carnés. Entre 5 et 10 kGy, on observe une destruction des microorganismes pathogènes. À des doses comprises entre 10 kGy et 45 kGy, on parle de stérilisation (Federighi et Tholozan, 2001).

Procédés	Doses appliquées
Inhibition de la germination **Extension de stockage**	**0-0.15 kGy**
Élimination de parasites et d'insectes	**0.15-0.2 kGy**
Retard de maturation ou sénescence **Amélioration de la qualité des fruits et légumes**	**0.2-0.7 kGy**
Réduction de la population bactérienne, de levures ou de moisissures	**0.7-5.0 kGy**
Destruction des microorganismes pathogènes	**5.0-10.0 kGy**
Stockage à long terme et stérilisation	**10.0-40.0 kGy**

Tableau 2 : Schéma représentant l'effet de l'irradiation par rapport à la dose appliquée. Source : *Traitements ionisants et Hautes pressions des Aliments* de Michel Federighi et Jean-Luc Tholozan (Federighi et Tholozan, 2001)

Parce que la dégradation de la qualité sensorielle par irradiation est dose-dépendante une diminution de la dose de traitement se traduirait par une meilleure qualité sensorielle du produit traité. Une augmentation de la sensibilité aux rayonnements des micro-organismes cibles entrainerait une baisse des doses nécessaires pour la létalité (Bhide *et*

al., 2001). En effet, plusieurs études ont démontré les avantages des traitements combinés afin de réduire les doses nécessaires pour tuer les bactéries (Caillet *et al.*, 2006; Turgis *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2011). L'effet de la radiosensibilisation offre d'importants avantages potentiels techniques et économiques pour le traitement par irradiation des aliments. Les nouvelles technologies de l'irradiation des aliments ont été développées dans lesquels les traitements combinés ont été utilisés pour réduire les doses de rayonnement nécessaires pour tuer les bactéries pathogènes et/ou réduire la charge microbienne globale.

V-1-4 La réglementation de l'irradiation des aliments

Dans le but de protéger les consommateurs, il existe une réglementation en ce qui concerne l'irradiation des aliments. Plusieurs organismes internationaux tels que l'Organisation mondiale de la santé et l'autorité internationale de l'énergie atomique se sont réunis en 1981 et ont décidé des règles applicables à l'irradiation des aliments. Un des standards décidés était de limiter la dose d'irradiation maximale à 10 kGy (Truswell AS, 1987).

Dans les années 80, près de 30 pays ont adopté le système d'irradiation des aliments, mais aujourd'hui ce nombre est monté à presque 50 pays. La gestion de la technique de l'irradiation des aliments ne se fait pas de la même manière dans tous les pays. On peut prendre pour exemple le Canada et les États-Unis. En effet au Canada seuls les épices, les farines et le blé sont irradiés, tandis qu'aux États-Unis, l'irradiation s'applique sur une vaste gamme d'aliments tels que les fruits, les viandes et la volaille. L'irradiation a pris beaucoup de place dans les pays émergents tels que la Chine, le Brésil et bien d'autres du fait de nombreux problèmes d'éclosions de maladies d'origine alimentaire. Ces pays

voulant exporter leurs denrées voient en l'irradiation une solution qui est la bienvenue. D'autres obligations doivent aussi être respectées en ce qui concerne l'irradiation des aliments, notamment l'obligation de souligner sur les emballages que les produits ont été irradiés. Il existe pour ça un logo (Figure 3) internationalement reconnu qui signale que les produits ont été irradiés. Tous les producteurs d'aliments irradiés sont obligés par la loi d'inscrire ce logo sur leurs emballages. Ils ont aussi l'obligation de mettre des notes informant les consommateurs en ce qui concerne les produits qui ne nécessitent pas d'emballage. L'emballage des aliments qui contiennent un ingrédient irradié comptant pour plus de 10 % dans la composition du produit doit comporter une liste d'ingrédients indiquant les ingrédients ayant été irradiés. Par contre, lorsqu'un ingrédient irradié entrant dans la composition d'un produit représente moins de 10% du produit, ce dernier n'est pas soumis à l'exigence d'étiquetage.

Figure 3: Symbole international désignant les aliments irradiés.

Tiré du site de l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2012.

http://www.inspection.gc.ca

Plusieurs aspects du processus d'irradiation sont réglementés par des lois, que ce soit pour le contrôle des risques encourus par les employés ou encore pour le contrôle des doses appliquées. Chaque pays a sa réglementation en ce qui concerne l'irradiation; un effort pour uniformiser les règles est mis en œuvre à travers la mise sur pied du Codex alimentarius par le FAO et l'OMS. Le Codex alimentarius est une commission qui a été créée en 1963 par la FAO et l'OMS afin d'élaborer des normes alimentaires, des lignes directrices et d'autres textes. Au Canada, la réglementation suit les directives du code, la division produits de santé et des aliments de Santé Canada est chargée d'établir les normes relatives à l'irradiation des aliments conformément à la Loi sur les aliments et drogues. C'est l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) qui voit au respect des règles en rapport avec l'étiquetage des aliments irradiés, prévues par la Loi sur les aliments et drogues et la Loi sur les Règlements sur l'emballage et l'étiquetage des produits de consommation.

VI Traitements naturels

VI-1- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) sont des liquides huileux aromatiques odorants, volatils provenant de plantes, soit des racines, des feuilles, des fleurs ou encore des fruits. Elles peuvent être obtenues par distillation, fermentation ou encore par extraction, mais le principal mode utilisé pour les obtenir est le mode de distillation (Burt, 2004). Les huiles essentielles sont utilisées depuis l'antiquité et elles sont connues pour leurs propriétés antimicrobiennes (Guenther, 1948; Boyle, 1955), comme on peut le voir dans le Tableau 3. Au-delà de leurs propriétés antimicrobiennes, les huiles essentielles possèdent aussi

d'autres propriétés telles que les propriétés anti cancers, antivirales et anti-inflammatoires (Buchbauer, 2009).

Tableau 3: Huiles essentielles ayant été reconnues pour avoir des effets antimicrobiens dans les aliments.

Huile essentielle	Produit alimentaire	Bactéries	Références
Sarriette des montagnes	Viande	*E. coli* , *Salmonella*	Turgis *et al.*, 2008
	Légumes	*L. monocytogenes*	Caillet *et al.*, 2005
Origan	Viande	*L. monocytogenes*	Tsigarida *et al.*, 2000, Turgis *et al.*, 2008
	Poisson	*L. monocytogenes*	Koutsoumanis *et al.*, 1999
	Légumes	*L. monocytogenes*	Caillet *et al.*, 2006
Cannelle	Viande	*E. coli*	Turgis *et al.*, 2008
Moutarde	Viande	*E. coli*	Turgis *et al.*, 2008
Thym	Viande	*Salmonella Typhi*	Chiasson *et al.*, 2004
	Poisson	*Pseudomonas putida*	Ouattara *et al.*, 2001
	Légumes	flore naturelle	Harpaz *et al.*, 2003

VI.1.1 Composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles lorsque chimiquement analysées révèlent qu'elles sont constituées de plus d'une centaine de composés dont les principaux sont les composés phénoliques, les terpènes, les esters et les cétones (Burt *et al.* , 2004). Ces principaux composés représentent environ 85 % des éléments du mélange, les autres composés sont en général en très faible concentration (Burt *et al.*, 2004). D'autres études suggèrent que la composition des huiles essentielles est fonction de la méthode par laquelle elles ont été obtenues et aussi d'autres facteurs tels que la variété de la plante dont elles sont extraites,

le climat dans lequel poussent les plantes ou encore de la partie où est extraite l'huile (Salgueiro *et al.*, 1997; Juliano *et al.*, 2000). Une étude suggère que l'effet antimicrobien des huiles essentielles est attribuable à la présence de composés phénoliques tels que le trans-cinnamaldéhyde, le carvacrol, le thymol et le γ-terpinène (Cosentino *et al.*, 1999). Les composés phénoliques seraient capables de dissoudre la membrane des bactéries et donc de pénétrer à l'intérieur de celle-ci, où ils peuvent alors s'attaquer au métabolisme cellulaire. Plusieurs de ces composés seuls ou en combinaison ont déjà été testés, et ont effectivement démontré une capacité antimicrobienne (Turgis *et al.*, 2008). La comparaison de plusieurs types d'huiles essentielles de sauge a permis d'observer des différences d'activité bactéricide, ce qui impliquerait un rôle synergique des composés mineurs des huiles essentielles (Marino *et al.*, 2001)

En effet, il a été constaté dans cette étude que des huiles essentielles telles que la sarriette des montagnes et l'origan espagnol avaient des effets antimicrobiens plus marqués sur *E. coli* O157:H7 que la moutarde, la menthe verte et la cannelle chinoise, tandis que chez *Salmonella* Typhi, l'effet antimicrobien le plus marqué était causé par la cannelle chinoise et l'origan espagnol (Marino *et al.*, 2001).

VI-1.2 Mécanismes d'action des huiles essentielles

Les huiles essentielles agissent principalement sur la membrane cellulaire des bactéries. L'action sur la membrane cellulaire se fait de façon différente dépendamment de la nature du composé agissant. L'action peut se faire par dégradation de la membrane cellulaire, par des dommages aux protéines de la membrane ou encore par formation de pores dans la membrane cellulaire (Burt, 2004). Ceci a pour effet d'entrainer une fuite du

contenu de la cellule, et par conséquent une lyse de la cellule. Plusieurs études ont démontré à travers différentes expériences que les huiles essentielles agissent à travers la membrane de la cellule bactérienne. Selon Oussalah *et al.* (2006), la présence d'origan espagnol, de sarriette des montagnes et de cannelle chinoise permet de diminuer la concentration d'ATP intracellulaire chez les bactéries *E. coli* O157:H7 et *L. monocytogenes*. Une augmentation de la concentration extracellulaire d'ATP a aussi été observée, ce qui démontre un passage à travers la membrane cellulaire.

VI-1.3 Sarriette des montagnes et carvacrol

La sarriette des montagnes, aussi appelée *Satureja montana*, est une plante aromatique qui appartient à la famille des *Lamiaceae*. Retrouvée principalement dans les régions arides et ensoleillées du Portugal, elle se retrouve aussi sur l'île de Madère. C'est une plante qui est reconnue pour ses propriétés antimicrobiennes et antifongiques. Dépendamment du sol sur lequel elle pousse et du climat, il a été déterminé qu'il existe deux principaux types de sarriette des montagnes dépendamment de la présence des composés phénoliques (carvacrol, thymol) ou de celle des composés alcolo-terpénique (α-terpineol, linalool, ρ-cymene) (Serrano *et al.*, 2011).

Le carvacrol est un composé phénolique extrait de différentes huiles essentielles, telles que la sarriette des montagnes, l'origan, le thym et bien d'autres (Turgis *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2011). Les effets antimicrobiens du carvacrol ont déjà été démontrés dans plusieurs études (Pol et Smid, 1999; Xu *et al.*, 2008; Esteban et Palop, 2011).

VI-2 Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides produits principalement par des bactéries lactiques. Ces peptides sont en général synthétisés par voie ribosomale sous forme de pré-peptides non actifs qui subiront une modification post-traductionnelle pour aboutir au peptide actif (Dortu, 2009). Il est connu que la production des bactériocines est majoritairement régulée par le système de Quorum sensing permettant l'expression de certains gènes en fonction de la densité bactérienne (Kleerebezem, 2004). Les bactériocines sont connues pour leur activité antimicrobienne contre des bactéries de même espèce que la bactérie productrice. Elles possèdent un spectre d'action généralement étroit, mais ont aussi une activité contre certaines bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes* (Blanco-Galvez *et al.*, 2007).

Quatre classes de bactériocines ont été décrites à ce jour :

- Les bactériocines de classe I aussi appelées lantibiotiques sont de petits peptides de taille inférieure à 5kDa stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés soufrés. Cette classe comprend entre autres la nisine et la lactocine.
- Les bactériocines de classe II sont de taille intermédiaire (entre 5 et 10 kDa), elles sont thermostables et ne possèdent pas d'acides aminés modifiés.
- Les bactériocines de classe III sont de taille supérieure à 30 kDa, thermosensibles et possèdent une structure différente des autres bactériocines.
- Les bactériocines de classe IV sont des peptides à grands poids moléculaires et qui requièrent des parties lipidiques pour avoir une activité.

Tableau 4 : Tableau de classification des bactériocines

Classes	Sous catégories
Classe I : Lantibiotiques	**Type A : molécules linéaires** **Type B : molécules globulaires**
Classe II : Bactériocines non modifiées, thermostables, séquences consensus	**Classe IIa : anti-*Listeria*** **Classe IIb : bactériocines à deux composantes** **Classe IIc : autres bactériocines**
Classe III : Bactériocines de grandes tailles sensibles à la chaleur	**l'helveticin J, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B**
Classe IV : Peptides requérant une partie lipidique pour avoir une activité	

(Dortu *et al.*, 2009)

VI-2-1 La nisine

La nisine est une bactériocine de 34 acides aminés qui appartient à la classe des lantibiotiques qui sont des peptides contenant des ponts thioesther (Figure 4). Les liens se font en deux étapes : la déshydratation des résidus serine et thréonine conduisant à des

acides aminés déshydratés qui sont la déshydroalanine (Dha) et la déshydrobutyrine (Dhb). Ensuite, les acides aminés déshydratés sont liés au lien thiol des résidus cystéine.

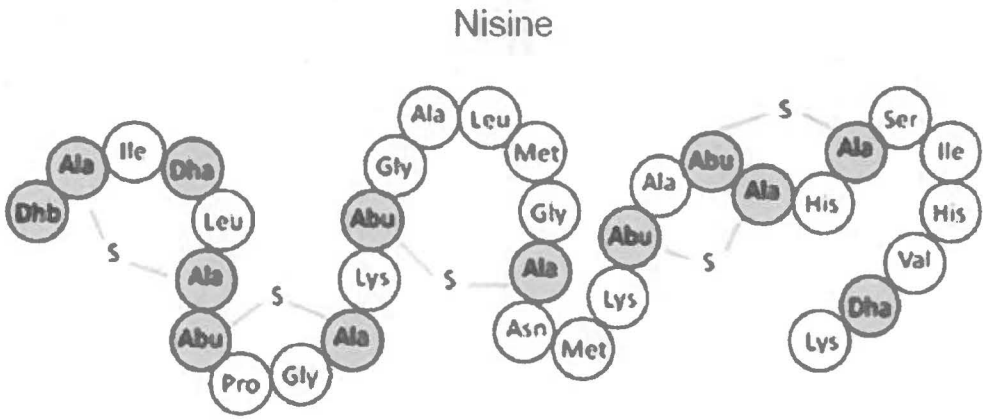

Figure 4: Séquence de la nisine (tiré de: Dortu *et al*, 2009)

Dhb : Déhydrobutyrine

Dha : Déhydroalanine

Abu : acide 2-aminobutyrique

La nisine a été découverte en 1928 et acceptée comme antibiotique clinique dans les années 1940. Son spectre d'action est relativement étroit, elle agit essentiellement sur les bactéries Gram positives. La nisine possède un double mode d'action antimicrobien, notamment en se liant au lipide II puis en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire et en formant des pores au niveau de la membrane cytoplasmique. Les lipides II sont des précurseurs d'ancrage de la paroi cellulaire à la membrane qui sont essentiels à la biosynthèse de la paroi bactérienne.

Il existe six principaux types de nisines, qui sont la nisine A, Z, F, Q, U et U2. Elle est connue pour être la seule bactériocine, utilisée commercialement. La nisine a été officiellement reconnue comme agent de conservation (fromage et aliments en conserve) par la FDA en 1988. Depuis ce temps, plus de 45 pays ont approuvé cette molécule comme agent de conservation. La nisine est produite par la bactérie lactique *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, est généralement utilisée pour lutter contre *Listeria monocytogenes* et est connue pour être utilisée dans les fromages, les saucisses et certaines viandes. Plusieurs caractéristiques font de la nisine un bon conservateur alimentaire, notamment sa capacité à rester stable à des températures réfrigérée, sa facilité de digestion due au fait qu'elle est sensible aux enzymes digestives et n'est pas toxique.

V-I-2-2 Autres bactériocines

En dehors de la nisine, il existe plusieurs autres bactériocines qui ne sont pas encore utilisées de façon commerciale, mais qui font l'objet d'études et qui ont démontré des effets antimicrobiens. On peut ainsi citer :

La pédiocine, une bactériocine de 44 acides aminés produite par la bactérie *Pediococcus acidilactici*. Elle appartient à la classe IIa des bactériocines et est reconnue pour son action anti *Listeria* comme toutes les bactériocines de la classe II. Le spectre d'activité antimicrobien des pédiocines inclut de nombreuses souches de *B. cereus, C. perfringens, C. botulinum, C. laramie, Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp, *Leuconostoc* spp, *Listeria monocytogenes* et *Pediococcus* spp. De nombreuses études ont démontré la capacité des pédiocines seules ou en combinaison avec d'autres traitements à

augmenter la durée de vie d'un grand nombre d'aliments ou de les protéger contre la contamination par des bactéries pathogènes (Drider *et al.*, 2006).

Les entérocines sont des bactériocines produites par des bactéries de la famille des *Enterocoques*. Plusieurs entérocines ont été décrites à ce jour et elles ont été regroupées en quatre grandes classes (Franz *et al.*, 2007).

- Classe I : Entérocine lantibiotique, composé modifié post-traductionnellement;
- Classe II : Composé linéaire, peptide non modifié ayant une masse moléculaire inférieure à 10 kDa
- Classe III : peptide cyclique
- Classe IV : Comprenant de larges protéines, labiles à la chaleur. Ce sont les entérocines des classes II et III, qui ont un intérêt considérable en tant que conservateurs alimentaires naturels et non toxiques, car ils inhibent seulement des espèces étroitement apparentées, mais aussi les pathogènes alimentaires à Gram positif (Cotter *et al.*, 2005).

VI.2.3 Mécanismes d'action des bactériocines

Le mécanisme d'action des bactériocines diffère selon la classe à laquelle elle appartient. Certaines, comme la nisine, vont agir en fonction de leur concentration dans le milieu. En concentration nanomolaire, la nisine va utiliser une molécule d'ancrage à la membrane plasmique de la cellule cible appelée lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes (Dortu *et al*, 2009). Une fois

fixée, on note la formation de pores dans la membrane conduisant à un efflux de protons et à une dissipation de la force motrice, ce qui aura pour effet d'entrainer la mort de la cellule. En ce qui concerne les bactériocines de classe III, elles vont agir sur la paroi en utilisant des enzymes dont le rôle va être d'hydrolyser les peptidoglycanes. Les bactériocines de classe II vont agir en dépolarisant et en perméabilisant la membrane plasmique de la cellule cible (Djamel et Drider, 2009).

Les bactéries lactiques productrices de bactériocines sont reconnues comme sans danger pour la santé humaine. Ces dernières sont, pour la plupart, sensibles aux protéases digestives (Wijaya *et al.*, 2006). Une fois l'aliment prétraité par les bactériocines ingérées, elles seront dégradées et non toxiques pour les cellules humaines. Certaines bactériocines sont d'ailleurs déjà utilisées en tant qu'additif alimentaire.

VII- La combinaison de traitement

Comme la congélation, plusieurs techniques de conservation peuvent entrainer une dégradation partielle de certains constituants de l'aliment, surtout dans le cas d'aliments nécessitant une conservation à long terme. Afin d'assurer la salubrité des aliments et d'améliorer leur qualité nutritionnelle, l'industrie agroalimentaire a cherché à développer de nouvelles techniques. L'objectif premier était de développer de nouveaux procédés moins dénaturants que les traitements par congélation ou par pasteurisation. Plusieurs nouveaux procédés ont ainsi vu le jour, tels que la lumière pulsée, la microfiltration, ou encore la haute pression hydrostatique. Une autre avenue a également fait l'objet de recherche, elle consiste à coupler deux techniques afin d'atteindre des conditions de traitement optimales sans porter atteinte aux qualités nutritionnelles et sensorielles de l'aliment. On peut ainsi prendre l'exemple du lait traité par microfiltration tangentielle

qui consiste à séparer les bactéries de manière physique en faisant passer le lait à travers des microfiltres céramiques ou encore l'exemple des traitements thermiques modérés.

VII-1 Combinaison huiles essentielles-irradiation.

Plusieurs études ont été entreprises sur l'effet positif de combiner les huiles essentielles et l'irradiation. On peut prendre l'exemple de l'équipe du professeur Lacroix, qui a effectué plusieurs études sur la combinaison des huiles essentielles et de l'irradiation. Ils ont en effet démontré que combiner certaines huiles essentielles à l'irradiation avait pour effet de réduire les doses d'irradiation nécessaires pour éliminer certaines bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes, S.* Typhimurium, *E. coli* et bien d'autres (Turgis *et al.*, 2009 ; Caillet *et al.*, 2006). Le fait que chacun des traitements a une action différente sur la cellule entraine une augmentation de la mortalité des bactéries. L'irradiation va agir en portant atteinte à la fonction métabolique de la cellule et à la fonction de réplication de l'ADN, tandis que les huiles essentielles vont principalement agir en bloquant la synthèse des protéines et en brisant la membrane cellulaire. Il en résulte ainsi une action combinée ou synergique des deux composés.

VII-2 Combinaison huiles essentielles et bactériocines

Les huiles essentielles et les bactériocines sont toutes les deux connues pour leurs effets antimicrobiens. La combinaison de bactériocines et d'huiles essentielles a déjà démontré des effets antimicrobiens sur certaines bactéries telles que *L. monocytogenes* et *Bacillus. cereus* (Pol et Smid, 1999; Corbo *et al.*, 2009; Pajohi *et al.*, 2011)Le fait que la nisine et

les huiles essentielles agissent à des endroits différents sur la cellule bactérienne permet une augmentation de l'efficacité des composés. En effet, les huiles essentielles vont agir en formant des pores dans la membrane des bactéries, ce qui va permettre à la bactériocine d'aller agir directement à l'intérieur de la cellule. Cette complémentarité au niveau des actions dans la cellule peut expliquer les effets de combinaisons ou de synergie observés en combinant les huiles essentielles à certaines bactériocines (Estan et Palop, 2011). Le fait de combiner différents composés ayant des effets antimicrobiens reconnus permet une réduction des concentrations nécessaires à éliminer les bactéries pour chacun des composés.

VIII. La D_{10}

La sensibilité d'un organisme à la radiation est généralement exprimée en termes de nombre de Grays (Gy) nécessaire pour éliminer une fraction de la population. La D_{10} est exprimée en Grays et désigne la dose d'irradiation nécessaire pour inactiver 90 % de la population bactérienne irradiée. La formule utilisée pour calculer la D_{10} est la suivante : (Training manual on food irradiation technology and techniques, second edition, 1982)

$$\mathrm{Log}_{10}\ \frac{N}{N0} = -\frac{1}{D10}D$$

Où N est la population après irradiation,

N_0 est la population initiale,

D est la dose d'irradiation,

D_{10} la dose d'irradiation qui éliminerait 90 % de la population,

La détermination de la valeur D_{10} se fait par plusieurs étapes. On commence par la préparation de la culture de bactéries à irradier. On suspend les bactéries dans un milieu approprié, on laisse les bactéries croître 24 heures à 37° C sous agitation. Une fois que la croissance a atteint la concentration voulue, on effectue une série de dilutions pour connaître la concentration de la suspension bactérienne. Une fois la concentration bactérienne connue, nous pouvons soumettre nos échantillons aux différentes doses d'irradiation voulues. Une fois l'irradiation terminée, on refait une série de dilutions afin de compter les bactéries qui ont survécu à l'irradiation. Une fois toutes nos données obtenues, une courbe de survie des bactéries après irradiation est obtenue. Le nombre de bactéries qui ont survécu en fonction des différentes doses appliquées est alors connu (Osaili *et al.*, 2007).

La valeur de la D_{10} est calculée avec la formule montrée plus haut à partir du modèle de régression linéaire. La D_{10} est l'inverse négatif de la pente de la courbe. Grâce à cette technique, on peut déterminer les bactéries résistantes à l'irradiation, les doses nécessaires pour éliminer les bactéries et les doses entrainant un état dit état CVNC. La valeur de D_{10} est différente d'une bactérie à une autre et on observe aussi que la D_{10} va être différente selon le type de nutriments accessibles aux bactéries. On peut observer dans le Tableau 4 des valeurs de D_{10} pour certaines bactéries dans de la viande congelée. La CVNC représente l'état dans lequel les bactéries sont vivantes, mais ne sont pas cultivables sur des milieux de culture. Grâce à la D_{10}, on peut déterminer les doses

d'irradiation nécessaires pour que la bactérie entre dans cet état. On peut aussi savoir si une bactérie est sensible ou résistante à l'irradiation.

Il est connu que les bactéries gram positives sont plus résistantes à l'irradiation, attribuable au fait que les peptidoglycanes sont présents sur les membranes des bactéries, ce qui fait que ces bactéries sont mieux protégées. Les principales bactéries grams positives qui infectent les aliments et qui sont résistantes à l'irradiation sont *Staphylococcus aureus, Deinococcus radioduran* et *Listeria monocytogenes*. Ces bactéries sont en général résistantes à l'irradiation et peuvent nécessiter des doses d'irradiation plus importantes pour les éliminer. Les bactéries gram négatives ne sont en général pas très résistantes à l'irradiation du fait de leur paroi très mince. Il existe toutefois certaines souches qui ont déjà présenté une résistance à l'irradiation. Les principales bactéries gram négatives connues pour causer des maladies d'origine alimentaire résistantes à l'irradiation sont *E. coli, Salmonella sp.* et *Campylobacter jejuni.*

Tableau 5: Résistance typique de certaines bactéries dans les aliments congelés d'origine animale. (Tiré de Farkas et al., 2001b)

Bactéries	**Valeur de D_{10} (kGy)**
Cellules végétatives	
Aeromonas hydrophila	0.14–0.19
Bacillus cereus	0.17
Brucella abortus	0.34
Campylobacter jejuni	0.08–0.20
Clostridium perfringens	0.59–0.83
Escherichia coli (incl. O157:H7)	0.23–0.35
Lactobacillus spp.	0.3–0.9
Listeria monocytogenes	0.27–1.0
Moraxella phenylpyruvica	0.63–0.83
Pseudomonas putida	0.06–0.11
Salmonella spp.	0.3–0.8
Streptococcus faecalis	0.65–1.0
Staphylococcus aureus	0.26–0.6
Vibrio spp.	0.03–0.12
Yersinia enterocolitica	0.04–0.21
Spores bactériennes	
Bacillus cereus	1.6
Clostridium botulinum types A and B	1.0–3.6
Clostridium botulinum type E	1.25–1.40
Clostridium sporogenes	1.5–2.2

IX. Hypothèses, objectif général et objectifs spécifiques, but

IX.1 Hypothèse

Notre hypothèse est la suivante : l'utilisation de l'irradiation en présence de combinaisons d'huiles essentielles et de bactériocines permettra d'augmenter la radiosensibilité bactérienne et de réduire la quantité de chaque composé bioactif nécessaire à l'élimination des pathogènes.

IX.2 Objectifs

Notre projet va s'articuler sur deux axes principaux, qui seront :

1er objectif : Démontrer que la combinaison de la nisine et des huiles essentielles augmente la radiosensibilisation pour éliminer *L. monocytogenes* et *S.* Typhimurium *in vitro*.

2e objectif : Vérifier si les meilleures combinaisons (huile + bactériocine + irradiation) obtenues *in vitro* contre *L. monocytogenes* et *S.* Typhimurium sont fonctionnelles *in situ*.

IX.3 But

Le but que nous voulons atteindre à travers nos objectifs est de mettre au point des traitements naturels qui puissent être efficaces sur la sensibilisation des bactéries à l'irradiation gamma et de tester la possible application de ces combinaisons dans un aliment.

IX. Perspectives.

Nous assistons actuellement à une forte expansion du nombre de cas d'éclosion d'infections humaines dues à des bactéries pathogènes et transmises par les aliments. Les conséquences sociales et économiques sont considérables, tant pour la population en général que pour le secteur agroalimentaire. L'établissement de nouveaux procédés tels que la combinaison de techniques permettra de préserver les aliments des contaminations et aidera à améliorer les techniques déjà existantes afin de lutter contre les contaminations alimentaires.

Chapitre II: Article 1

Effect of combination of essential oils and bacteriocins on the efficacy of gamma radiation against *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*

Aude Ndoti-Nembe[1], Khanh Dang Vu[1], Nicolas Doucet[2] and Monique Lacroix[1*]

[1-]*Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Center (CIC), INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada.*

[2-]*INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada*

* Corresponding Author: Prof. Monique Lacroix, Telephone: +1-450-687-5010; Fax: +1-450-686-5501; E-mail: monique.lacroix@iaf.inrs.ca

Rôle des auteurs : Prof Monique Lacroix est responsable du projet, a participé à l'élaboration des expériences, aux discussions et à la correction de l'article. Prof. Doucet, co-directeur, a participé aux discussions scientifiques et aux corrections de l'article. K.Dang Vu a participé à la planification des expériences et a participé aux corrections des articles

Article soumis au *International journal of Radiation Biology*

Résumé

L'objectif de cette étude était d'utiliser des huiles essentielles seules ou en combinaison avec la nisine afin d'augmenter l'efficacité des rayons gamma contre certains pathogènes alimentaires tels que *Salmonella* Typhimurium *et Listeria monocytogenes*. L'étude a été menée en milieu liquide afin d'évaluer la concentration bactériennes après traitements combinés. Des suspensions bactériennes de *Salmonella* Typhimurium et de *Listeria monocytogenes* (10^6 CFU/ml) ont été traitées par deux principales huiles essentielles et une bactériocine. Les huiles essentielles utilisées dans le cadre de cette étude étaient le carvacrol et la sariette des montagnes, la bactériocine utilisée était la nisine. Les suspensions bactériennes ont été traitées par des concentrations de 0,035% v/v d'huiles essentielles et de 10^3 IU/ml de nisine. Les traitements appliqués étaient les huiles essentielles seules ou en combinaison avec l'irradiation, la nisine seule ou en combinaison avec l'irradiation, et une combinaison des trois traitements, soit nisine, huiles essentielles et irradiation à des doses comprises entre 0 et 2,5 kGy. Les supensions bactériennes traitées sont par la suite mises sur gélose (Tryptic soy agar) afin de dénombrer la population bactérienne. Avec les résultats obtenus, un calcul de D_{10} est effectué afin de déterminer la dose nécessaire pour éliminer 1 log de bactérie.

Les résultats montrent que l'ajout d'huiles essentielles et/ou de nisine avant le traitement à l'irradiation réduit de façon significative la dose d'irradiation nécessaire pour éliminer les bactéries pathogènes alimentaires.

Abstract

The aim of this study was to use essential oils (EOs) alone or in combination with nisin to enhance the lethality of gamma irradiation against food pathogens *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in laboratory media. A cell suspensions (10^6 CFU/ml) of *Listeria monocytogenes* or *Samonella* Typhimurium were treated by carvacrol and mountain savory EOs alone (at the final concentration of 0.035 %, v/v) or treated by the combined EOs and nisin (at final concentration of 10^3 IU/ml), and was then irradiated at different doses (0.1 to 2.5 kGy). Treated bacterial cell suspensions were plated on tryptic soy agar for determination of cell population and D_{10} values (irradiation dose required to reduce 1 log of bacterial viable cell population). The results showed that the addition of EO and/or nisin before irradiation reduced significantly the irradiation dose required to eliminate both food pathogens. A synergistic effect of combined carvacrol or mountain savory with nisin and irradiation against *L. monocytogenes* and *S.* Typhimurium was also demonstrated.

KEY WORDS: Irradiation, essential oil, nisin, food pathogens

Introduction

Food safety is a public health issue which concerns governments, food producers and food consumers. There are various agents such as pathogenic bacteria, viruses, parasites, etc. which can contaminate food, but the most number of foodborne illnesses are caused by foodborne pathogenic bacteria. According to the Health Agency of Canada, each year 11 to 13 million ~~of~~ Canadians suffer from foodborne illnesses. In the U.S., the government estimates the number of illnesses due to consumption of contaminated food is about 76 million cases per year (Tauxe, 2001). As a result of these there are 325,000 hospitalizations and 5,000 deaths (Mead *et al.*, 2000). Among food pathogens, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium are of the most concern due to their serious diseases they cause. *Salmonella* Typhimurium can while *Listeria monocytogenes* can cause listeriosis, which can lead to fatality (Lalande *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2012).

There are different methods such as pasteurization, sanitation, canning and irradiation to prevent food contamination (Tauxe, 2001). Irradiation technology uses high energy rays that are emitted by radioactive compounds such as, ^{60}Co. Three different technologies that can be used for food treatments have been developed by the sterilization industry, which are gamma irradiation, electron beam irradiation and X-ray irradiation (Tauxe, 2001).

Food irradiation is normally performed at doses that are not higher than 10 kGy because higher doses of irradiation will cause adverse effects on the taste, smell and nutritional values of foods (Giroux, 1999; Villavicencio *et al.*, 2000). Some bacteria are resistant to irradiation, such as *Deinococcus radiodurans* (Blasius *et al.*, 2008; Daly, 2009) and

therefore, it is important to find new techniques or methods in order to eliminate the food pathogens at low doses of irradiation. One of the emerging techniques in controlling food pathogens is the combination of treatments. Indeed several studies have demonstrated the benefits of combination treatments to reduce the radiation doses needed to kill bacteria (Turgis *et al.*, 2009). Many kinds of treatments can be combined with irradiation to reduce the doses required to kill bacteria, for example, addition of essentials oils (Reinders, 2003; Oussalah *et al.*, 2007), modified atmosphere packaging (Turgis *et al.*, 2008), bacteriocins (Mohamed *et al.*, 2011), and others.

The essentials oils (EOs) are plant extracts and many EOs have been found to have antimicrobial activity against a wide range of bacteria. The EOs are hydrophobic and mainly constitute phenolic compounds which disrupt the bacterial membrane (Burt et Reinders, 2003). Many studies demonstrated the antibacterial activity of EOs against pathogenic bacteria like *E. coli, Listeria* and *Salmonella* (Oussalah *et al.*, 2007). Some EOs have higher antimicrobial activity than others. Some studies (Friedman *et al.*, 2002; Nevas *et al.*, 2004) showed that oregano, savory and thyme EOs had an important antibacterial activity on *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus*, *C. perfringens* and *C. botulinum.* They also demonstrated that oregano, cinnamon, thyme and clove bud EOs have a strong bactericidal activity against *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *S. enterica.* One study (Smith-Palmer *et al.*, 1998) showed that cinnamon and thyme oils are active against *S. enterica*, *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*. The mountain savory EO and its main constituent, carvacrol, effective in combination with lower irradiation doses to kill bacteria. For example, mountain savory could sensibilize *E.coli* O157: H7 and *Salmonella* typhi to irradiation by 3.18 fold

and 1.76 fold, respectively (Turgis et al. 2008b). Carvacrol has also been shown to be antibacterial against *E. coli* (Xu *et al.*, 2008).

Bacteriocins are small peptides mainly produced by lactic acid bacteria (LAB) which have antibacterial activity. Bacteriocins have attracted attention as potential substitutes for antibiotics to cure and/or prevent bacterial infections and are widely employed in food preservation (Millette *et al.*, 2007). Nisin is a natural heat-resistant polypeptide bacteriocin produced by certain strains of *Lactococcus lactis* (Pajohi, 2011). It has been shown that nisin is effective against *Listeria monocytogenes* and *B. cereus* and other gram positive bacteria (Mohamed *et al.*, 2011). The combination of cavacrol EO and nisin could reduce considerably the bacterial population of certain bacteria such as *B. cereus* and *L. monocytogenes* (Pol and Smid, 1999). A significant decrease of bacterial concentration was observed when bacteria were exposed to different concentrations of nisin (0.13-0.39 μM) and different concentrations of carvcarol EO (0.11-0.66 mM) alone or in combination (Smid, 1999; Esteban and Palop, 2011).

It is not known if the combined application of essential oils with nisin can increase the radiosensitization of food pathogens to gamma irradiation. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the combined effects of nisin and two essentials oils (mountain savory and carvacrol) with irradiation in eliminating *L. monocytogenes* and *S.* Typhimurium in *in vitro* conditions

Materials and methods

Essential oils and Bacteriocin preparation

Two essentials oils consisting of carvacrol and mountain savory oil, were used in this study. The mountain savory oil was purchased from Robert et Fils enterprise (Montreal, Quebec, Canada) and the carvacrol was purchased from Sigma-Aldrich Co., (St. Louis, MO, USA). A stock emulsion containing 0.4% of EO was prepared to permit mixing of the EOs with the bacterial cell suspension. The emulsion was prepared by mixing 0.4% EO (w/w), 6.0 % DMSO (w/w), 0.5 % Tween 80 (w/w) and 93.1 % Tryptic Soy Broth (TSB) for one hour at room temperature.

A commercial nisin powder containing 2.5 % nisin (balance sodium chloride and denatured milk) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA.). The antibacterial potency of this nisin power was 10^6 IU/g. A stock nisin solution containing 10^4 IU/ml was prepared from this powder. The stock solution was prepared by dissolving the nisin powder in 100 mM acetate buffer (pH 5), the obtained solution was sterilized by filtration through a 0.2 μm filter.

Bacterial preparation

L. monocytogenes HPB 2812 serovar 1/2a and *Salmonella* Typhymurium (SL 1344) were used in this study. *Salmonella* Typhimurium was obtained from Prof. Charles Dozois (Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada). *L. monocytogenes* HPB 2812 serovar 1/2a was isolated from homemade salami by the Health Products and Foods Branch of Health Canada (Ottawa, Ontario, Canada). These pathogens were maintained at -80 °C in TSB containing glycerol (10%, v/v).

Before each experiment, the stock cultures of these pathogens were propagated in two successive 24-h growth cycles in TSB at 37 °C. Bacterial cells were washed twice with saline solution (0.85%, w/v), and then the cell suspensions was adjusted to approximately 10^9 CFU/ml (Caillet *et al.*, 2006; Turgis *et al.*, 2009).

Treatment of bacteria by essential oils and nisin

Bacterial cell suspensions of each pathogen were added in 50 ml conical centrifuge tubes (50 ml capacity, Becton-Dickinson). Then, the emulsion of EO was added into the falcon tube to obtain a final bacterial cell concentration of 10^6 CFU/ml and final EO concentration of 0.035 % (v/v). In the case of bacterial treatment by nisin, the stock solution of nisin was added into the falcon tube containing bacterial cell suspension to obtain a final bacterial suspension of 10^6 CFU/ml and final nisin concentration of 10^3 IU/ml. In case of combined treatment of bacteria by EOs and nisin, the emulsion of EOs was first added into the falcon tubes containing bacterial cell suspension and nisin solution was then added into the same falcon tube to obtain a final bacterial cell concentration of 10^6 CFU/ml, final EO concentration of 0.035% (v/v) and final nisin concentration of 10^3 IU/ml. These treated cells were then kept at 4°C for 18 h prior to irradiation treatment.

Irradiation treatment

Each sample was irradiated at the Canadian Irradiation Centre in a ^{60}Co underwater calibrator at the dose rate of 14.5 kGy/h (UC-15A, Nordion, Laval, Qc, Canada). The temperature of samples was kept at 4°C during the treatment. The applied radiation doses

were from 0.1 to 2.5 kGy. Bacterial cell samples were analyzed immediately after irradiation treatment (Caillet *et al.*, 2006; Turgis *et al.*, 2009).

Microbiological analysis

From each treated sample, serial dilutions were prepared and plated onto tryptic soy agar (Difco, Becton Dickinson, USA). The plates were then incubated at 37° C for 24 h for the enumeration of *L. monocytogenes* or *Salmonella* Typhimurium.

Calculation of D_{10} value and relative radiosensitization

The D_{10} value is defined as the radiation dose required eliminating 90% population (reduction by 1 log CFU) of viable initial cell concentration of bacteria. To calculate the D_{10} value, bacterial counts (log CFU/ml) were plotted against radiation doses, and the reciprocal of the slope of the trendline was extracted from the plot.

The relative radiation sensitivity was determined using the following equation:

Relative radiation sensitivity = D_{10} value of the control sample/D_{10} value of sample treated in the presence of antimicrobial compound(s).

Statistical analysis

All experiments were conducted in three replicates. For each replicate and for each dose of irradiation, three samples were analyzed. The data were analyzed using STATISTICA, and the means comparison among treatments was based on Fisher Least Significant Difference (LSD) tests ($P \leq 0.05$).

Results

The radiosensitization of *L. monocytogenes*

D_{10} values of 0.355, 0.227 and 0.327 kGy were observed for *L. monocytogenes* in the control, in the treatments by carvacrol EO and mountain savory EO, respectively (Figure 1-c). A D_{10} value of 0.173 was obtained in case of treatment of *L. monocytogenes* by nisin (10^3 IU/ml). Thus, nisin is very active against *L. monocytogenes* (Gram positive bacterium), as it has been demonstrated in many other studies (Helander and Mattila-Sandholm, 2000). It is interesting to find that treatments of *L. monocytogenes* using combined carvacrol plus nisin or mountain savory plus nisin caused a significant reduction ($P \leq 0.05$) in D_{10} values as compared to the control and other treatments (Figure 1-c). However, there was no significant difference ($P > 0.05$) in D_{10} values between treatments by carvacrol plus nisin (0.085) and by mountain savory plus nisin (0.057). Moreover, based on the D_{10} values for all the treatments, it can be remarked that the combined treatments caused synergistic effects against *L. monocytogenes* as compared to individual treatments (nisin, carvacrol EO and mountain savory EO) (Figure 1-c).

The radiosensitisation of *L. monocytogenes* to irradiation was increased 4.19 and 6.31 fold in the combined treatments using carvacrol plus nisin and mountain savory plus nisin, respectively, as compared to the control (only irradiation treatment) (Figure 2-a). Nisin alone could increase the relative sensitivity of *L. monocytogenes* to irradiation by 2.31 times as compared to the control. Carvacrol and moutain savory EOs did not significantly increase the radiosensitisation of *L. monocytogenes* to irradiation as compared to the control ($P > 0.05$) (Figure 2-a). Thus, the combination of nisin with

mountain savory EO was the most effective mixture in increasing the relative sensitivity of *L. monocytogenes* to irradiation treatment.

The radiosensitization of *Salmonella* Typhimurium

D_{10} values of 0.263, 0.153, and 0.200 were observed for *Salmonella* Typhimurium in the control, in the combined treatments by mountain savory EO plus nisin, and by mountain savory EO alone, respectively (Figure 1-c). When *Salmonella* Typhimurium was treated by only carvacrol EO and by the combination of nisin with carvacrol EO, D_{10} values of 0.190 and 0.143 were observed, respectively (Figure 1-c). Thus, was found that the combined treatment of carvacrol and nisin was the most effective at increasing the radiosensitization of *Salmonella* Typhimurium to gamma irradiation as compared to other treatments. There were no significant differences in D_{10} values among the treatments using carvacrol EO or mountain savory EO alone, or combined carvacrol EO plus nisin and combined mountain savory plus nisin (Figure 1-c). Moreover, nisin did not cause any positive effects in reduction of D_{10} value as compared to the control (treated only by gamma irradiation) (Figure 1-c).

There was no statistically significant difference ($P > 0.05$) in the radiosensitization level of *S.* Typhimurium to gamma irradiation when treated by carvacrol EO alone (1.41 fold) or mountain savory EO alone (1.32 fold) (Figure 2-a). However, the difference in increasing the radiosensitization level treated by mountain savory EO alone (1.32 fold) and by combined mountain savory with nisin (1.73 fold) or the difference in increasing the radiosensitization level treated by carvacrol alone (1.41 fold) and by carvacrol plus

nisin (1.84 fold) were significant ($P \leq 0.05$) (Figure 2-a). Thus, the combined treatments using mountain savory plus nisin or carvacrol plus nisin caused a synergistic effect at reducing (the radiosensitization levels) *S.* Typhimurium.

Discussion

Interestingly the combined treatment of nisin plus the mountain savory EO was more effective than the combined treatment of nisin plus carvacrol EO against *L. monocytogenes* in terms of relative sensitivity to irradiation (Figure 2-a). This could be explained by the fact that carvacrol is only one of the main components of mountain savory EO (Serrano *et al.*, 2011), and therefore, there could be additive effects among different components of mountain savory EO that increase the sensitivity of *L. monocytogenes* to irradiation as compared to treatment by carvacrol alone. According to Carraminana et al., (2008), the phenolic monoterpene carvacrol was the major constituent (70.5%) of mountain savory (*Satureja montana*) EO. Other important compounds were the monoterpenic hydrocarbons *p*-cymene (10%), γ-terpinene (2.2%), and α-pinene (1.2%) and the monoterpene alcohol borneol (1.9%). The mountain savory EO also contained a small amount of the phenolic monoterpene thymol (0.3%) (Carraminana *et al.*, 2008). Some researchers have concluded that complete EOs containing all components have a higher antibacterial activity than mixtures of the major components, which suggests that the minor components are critical to the activity and may contribute to a synergistic effect (Burt, 2004).

The fact that the combination of EOs (carvacrol or mountain savory) and nisin could increase the radiosensitization of *L. monocytogenes* to gamma irradiation can be explained by the mechanism of action of each component. Essential oils can act on the target bacteria by disrupting the cell membrane (Oussalah *et al.*, 2006) while nisin can create pores in the bacterial cell wall (Pol and Smid, 1999). According to Ultee et al. (1999) carvacrol can attack the cell membrane, making it permeable to potassium ions and to protons, thus acidifying the cytoplasm of the bacteria, making the synthesis of ATP impossible and hence decreasing as intracellular levels. According to Pol and Smid, (1999), EOs might improve the antimicrobial activity of nisin by increasing the number of pores created in cell membranes by nisin or by increasing the size of the formed pores which will lead to a larger reduction of viable cells (Pol and Smid, 1999). Therefore, in this way the combination of both EOs (in this case mountain savory and carvacrol) with nisin could provide a synergistic effect on increasing the radiosensitivity of *L. monocytogenes* to gamma irradiation treatment.

In fact, some previous studies have demonstrated that combined treatments using essential oils with irradiation could increase the relative sensitivity of *L. monocytogenes* to irradiation treatments. For example, Caillet et al., (2006) studied the radiosensitization of *L. monocytogenes* in the presence of *trans*-cinnamaldehyde, Spanish oregano, winter savory, and Chinese cinnamon on peeled minicarrots packed under air or under a modified atmosphere (60% O_2, 30% CO_2, and 10% N_2). They found that *L. monocytogenes* was more resistant to irradiation under air in the absence of active compound while the active compounds had a positive effect on increasing radiation

sensitivity of *L. monocytogenes* on carrots (Caillet et *al.*, 2006). The *trans*-cinnamaldehyde increased the relative radiation sensitivity of *L. monocytogenes* 3.8 fold compared to the control (Caillet et *al.*, 2006). In other studies on radiosensetization of *L. monocytogenes* using different antimicrobial coatings such as organic acids plus lactic acid bacteria metabolites; organic acids plus citrus extract; organic acids plus citrus extract plus spice mixture; organic acids plus rosemary extract, Takala et al. (2011) found that all these coatings could increase the relative sensitivity of *L. monocytogenes* to irradiation by 1.31 to 1.45 times in broccoli florets (Millette *et al.*, 2007; Oussalah *et al.*, 2007; Takala *et al.*, 2011). In this study, we found that the radiosensitisation of *L. monocytogenes* to irradiation was increased by 4.19 and 6.31 times in the combined treatments using carvacrol plus nisin and mountain savory plus nisin, respectively, as compared to the control; however, the obtained results were *in vitro* tests. Therefore, in future studies, we will apply combined treatments using carvacrol plus nisin and mountain savory plus nisin in food models (meat or vegetable).

Nisin was less effective against *S.* Typhimurium as compared to *L. monocytogenes* when it was combined with EOs and irradiation. In fact, the outer membrane of Gram negative bacteria (in this study *S.* Typhimurium) covers the cytoplasmic membrane and peptidoglycan layer (Helander and Mattila-Sandholm, 2000). The outer membrane contains glycerophospholipids and lipopolysacharides which form a tight layer and can exclude hydrophobic substances and macromolecules. Nisin is a hydrophobic macromolecule; therefore, it is unable to penetrate the outer membrane of Gram negative bacteria (Helander and Mattila-Sandholm, 2000).

Mountain savory combined with nisin was found to be the best treatment for increasing the radiosensitisation of *S.* Typhimurium to irradiation treatment, this can be explained by the fact that mountain savory is effective against *S.* Typhimurium (Serrano *et al.*, 2011). Nisin alone did not have a good antimicrobial effect against *S.* Typhimurium, but when it was combined with the mountain savory or carvacrol EO, the antimicrobial effects were better as demonstrated by the lower value of D_{10} and the higher relative sensitivity (Figure 1-c and 2-a).

In fact, several reports demonstrated the effect of carvacrol in increasing the radisensitivity of food pathogens to gamma irradiation. For example, Chiasson et al. (2004) found that the addition of thyme essential oil or its principal constituents (carvacrol) to ground beef increased the radiosensitization of *E. coli* and *Salmonella* Typhi to gamma irradiation. *E. coli* was more sensitive under air and *Salmonella* Typhi was more sensitive under modified atmosphere (MA) conditions (60% O_2, 30% CO_2, and 10% N_2). The addition of 1.0% carvacrol or thymol to ground beef resulted in an increase in the radiosensitivity of *E. coli* and *Salmonella* Typhi by 2.2 times to irradiation (Chiasson *et al.*, 2004). However, the effect of combining nisin with EOs to increase the relative sensitivity of food pathogens was not described in this study (Chiasson et al. 2004). Therefore, based on the obtained results of this study, (*in situ* evaluation) of the effect of combined treatments using nisin plus carvacrol or mountain savory on the radiosensitivity of food pathogens will be evaluate *in situ*.

In conclusion, this study demonstrated that the combination of essential oils with nisin prior to irradiation treatment significantly reduced the irradiation dose required to

eliminate *L. monocytogenes* and S. Typhimurium. A synergistic effect of combined carvacrol or mountain savory with nisin and irradiation against *L. monocytogenes* and S. Typhimurium was also demonstrated. Nisin was more effective against *L. monocytogenes* than *S.* Typhimurium. The combination of nisin and irradiation did not increase the radiosensitization of *S.* Typhimurium although it increased the radiosensetization of *L. monocytogenes* by 2.31 fold to gamma irradiation. An *in situ* study on the combined effects of carvacrol and mountain savory with nisin on the sensibility of *L. monocytogenes* and *S.* Typhimurium to irradiation treatment is currently being conducted in carrots.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors sincerely thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada through the discovery program for financial support. Nordion Inc. is acknowledged for irradiation treatments.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

References

1. Blasius M., Hübscher U., Sommer S. 2008. *Deinococcus radiodurans*: What belongs to the survival kit? Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 43: 221-238.
2. Burt S.A., Reinders RD. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157 : H7. Letters in Applied Microbiology 36: 162-167.
3. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253.
4. Caillet S., Millette M., Turgis M., Salmieri S., Lacroix M. 2006. Influence of antimicrobial compounds and modified atmosphere packaging on radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* present in ready-to-use carrots (Daucus carota). Journal of Food Protection 69:1-221-227.
5. Carraminana JJ., Rota C., Burillo J., Herrera A. 2008. Antibacterial efficiency of Spanish Satureja montana essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. Journal of Food Protectection 71: 502-508.
6. Chiasson F., Borsa J., Ouattara B., Lacroix M. 2004. Radiosensitization of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhi in ground beef. Journal of Food Protection 67:1157-1162.
7. Daly MJ. 2009. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. Nature Reviews Microbiology 7: 237-245.
8. Esteban MD., Palop A. 2011. Nisin, carvacrol and their combinations against the growth of heat-treated *Listeria monocytogenes* cells. Food Technology and Biotechnology 49: 89-95.

9. Friedman M., Henika P.R., Mandrell RE. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection 65: 1545-1560.

10. Helander IM., Mattila-Sandholm T. 2000. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. International Journal of Food Microbiology 60: 153-161.

11. Lalande M., Guyon G., Morin C., Rodière M., Astruc J. 2005. Les infections à salmonelles chez l'enfant : étude retrospective sur quatre ans. Archives de Pédiatrie 12 : 23-27.

12. Giroux M., Lacroix M. 1999. Nutritional adequacy of irradiated Meat. Food Research International 31: 257-264.

13. Mead PS., Slutsker L., Dietz V., McCaig LF., Bresee JS., Shapiro C., Griffin PM., Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States (Reprinted from Emerging Infectious Diseases). Journal of Environmental Health 62: 9-18.

14. Millette M., Dupont C., Archambault D., Lacroix M. 2007. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococccus acidilactici* isolates. Journal of Applied Microbiology 102: 274-282.

15. Mohamed HMH., Elnawawi FA., Yousef AE. 2011. Nisin Treatment To Enhance the Efficacy of Gamma Radiation against *Listeria monocytogenes* on Meat. Journal of Food Protection 74: 193-199.

16. Muñoz P., Rojas L., Bunsow E., Saez E., Sánchez-Cambronero L., Alcalá L., Rodríguez-Creixems M., Bouza E. 2012. Listeriosis: An emerging public health problem especially among the elderly. Journal of Infection 64: 19-33.

17. Nevas M., Korhonen AR., Lindström M., Turkki P., Korkeala H. 1999. Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. Journal of Food Protection 67: 199-202.

18. Oussalah M., Caillet S., Lacroix M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 69: 1046-1055.

19. Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control 18: 414-420.

20. Pajohi MR., Tajik H., Farshid AA., Hadian M. 2011. Synergistic antibacterial activity of the essentia oil of cuminum cyminum L. seed and nisin in a food model. Journal of Applied Microbiology: 110: 943-951.

21. Pol IE., Smi, EJ. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 29: 166-170.

22. Serrano C., Matos O., Teixeira B., Ramos C., Neng N., Nogueira J., Nunes ML., Marques, A. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. Journal of the Science of Food and Agriculture 91: 1554-1560.

23. Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology 26: 118-122.

24. Takala PN., Vu KD., Salmiéri S., Lacroix M., 2011. Effect of Antimicrobial coatings on the radiosensitization of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in fresh broccoli. Journal of Food Protection 74 : 1065-1069.

25. Tauxe RV. 2001. Food safety and irradiation: Protecting the public from foodborne infections. Emerging Infectious Disease 7 : 516-521.

26. Turgis M., Han J., Borsa J., Lacroix M., 2008a. Combined effect of natural essential oils, modified atmosphere packaging, and gamma radiation on the microbial growth on ground beef. Journal of Food Protection 71: 1237-1243.

27. Turgis M, Borsa J, Millette M, Salmieri S, Lacroix M. 2008b. Effect of selected plant essential oils or their constituents and modified atmosphere packaging on the radiosensitivity of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella* Typhi in ground beef. Journal of Food Protection 71: 516-521.

28. Turgis M., Han J., Millette M., Salmieri S., Borsa J., Lacroix M. 2009. Effect of selected antimicrobial compounds on the radiosensitization of *Salmonella*Typhi in ground beef. Letters in Applied Microbiology 48: 657-662.

29. Ultee A, Kets EPW., Smid EJ. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus.* Applied and Environmental Microbiology 65: 4606-4610.

30. Villavicencio ALCH., Mancini-Filho J., Delincée H., Bognar A. 2000. Effect of gamma irradiation on the thiamine, riboflavin and vitamin B_6 content in two varieties of brazilian beans. Radiation Physics and Chemistry 57: 299-303.

31. Xu J., Zhou F., Ji BP., Pei RS., Xu N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology 47: 174-179.

List of Figures

Figure 1-c. D_{10} values of different treatments against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium.

Figure 2-a. Relative radiosensitization of different treatments against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium.

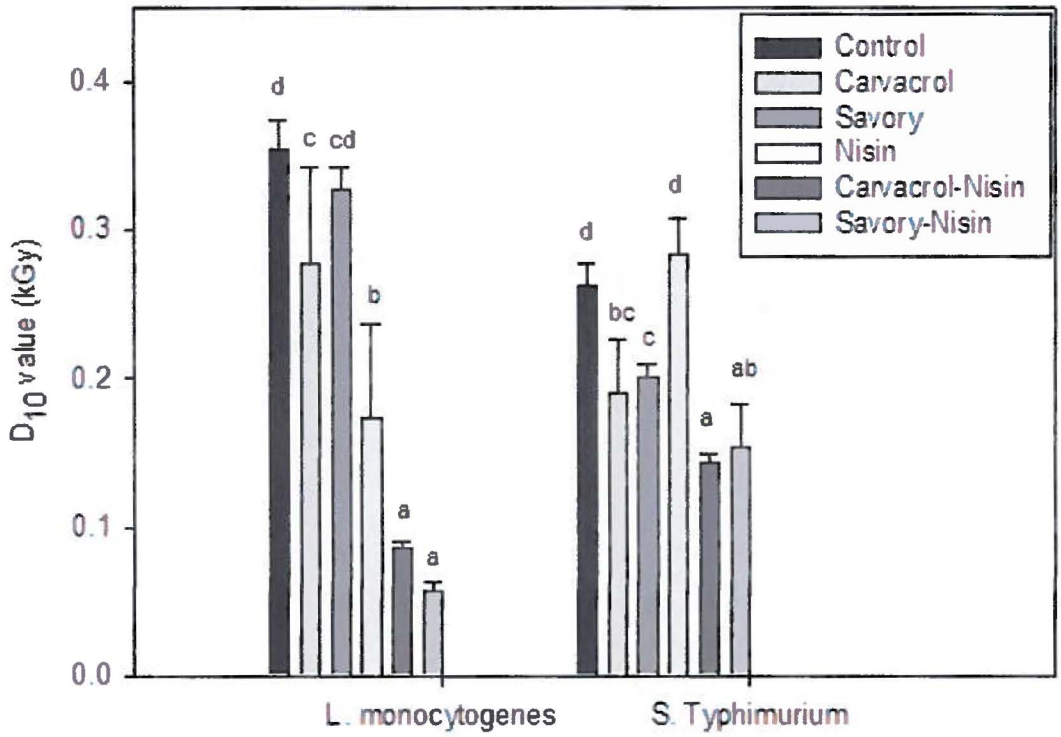

Figure 1-c. D_{10} values of different treatments against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium

For each bacterium, different letters show significant differences among treatments ($P \leq 0.05$)

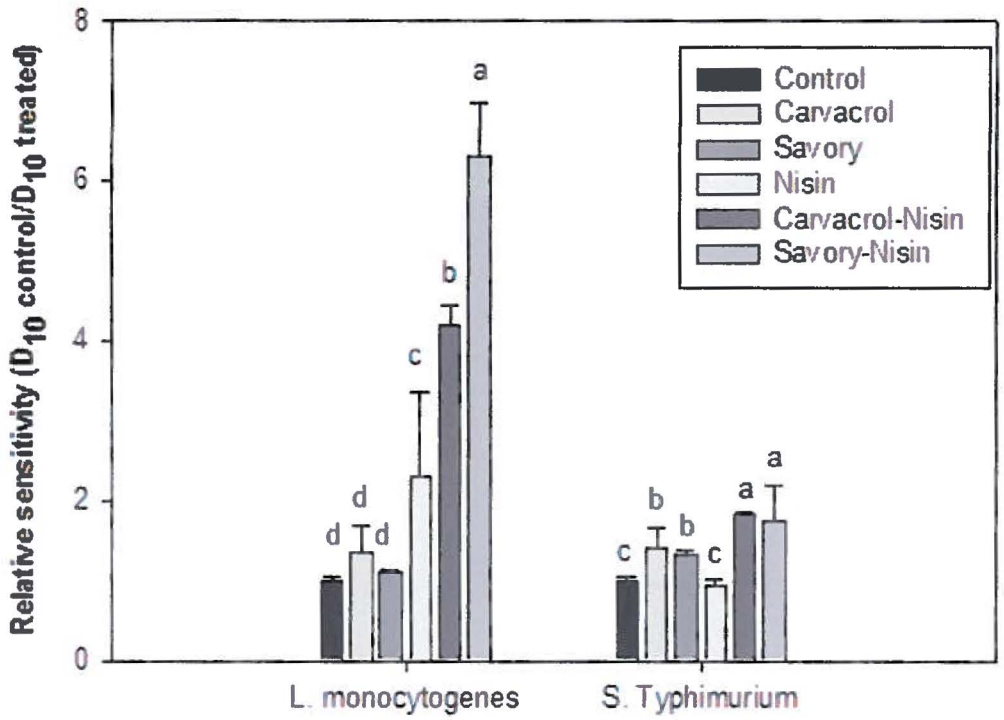

Figure 2-a. Relative radiosensitization of different treatments against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium

For each bacterium, different letters show significant differences among treatments ($P \leq 0.05$)

Chapitre III: Article 2

Effect of Combination of Essentials Oils, Nisin and Irradiation on Radiation Sensitivity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on Ready to Eat Carrots

Aude Ndoti-Nembe[1], Khanh Dang Vu[1], Nicolas Doucet[2] and Monique Lacroix[1*]

[1-] *Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Center (CIC), INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada*

[2-] *INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada*

* Corresponding Author: Prof. Monique Lacroix, Telephone: +1-450-687-5010; Fax: +1-450-686-5501; E-mail: monique.lacroix@iaf.inrs.ca

Rôle des auteurs : Prof Monique Lacroix est responsable du projet, a participé à l'élaboration des expériences, aux discussions et à la correction de l'article. Prof. Doucet, co-directeur, a participé aux discussions scientifiques et aux corrections de l'article. K.Dang Vu a participé à la planification des expériences et a participé aux corrections des articles.

Résumé

L'élimination des bactéries pathogènes alimentaires à l'aide d'agents antimicrobiens naturels ou à travers l'utilisation de traitements combinés est une approche importante pour assurer la sécurité alimentaire et réduire la résistance bactérienne aux méthodes individuelles. Dans cette étude, les mini-carottes ont été inoculés avec la bactérie *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella* Typhimurium pour obtenir une concentration finale d'environ 7 log UFC / g. Les échantillons inoculés sont ensuite enrobées par la nisine (concentration finale de 10^3 UI / g) ou les huiles essentielles (le carvacrol et la sarriette des montagnes à une concentration finale de 0,035%, p / p) ou la nisine ainsi que les huiles essentielles. Les échantillons ont ensuite été traitées par des traitements d'irradiation à des doses différentes pour déterminer la valeur de D_{10} (dose nécessaire pour réduire un log UFC / g de produit). La combinaison de nisine et de carvacrol a provoqué une augmentation de la sensibilité relative de *L. monocytogenes* à l'irradiation de 2,74 fois. La sensibilité relative de *S.* Typhimurium à l'irradiation a été augmentée de 2,46 et 2,52 dans le cas de la nisine et du mélange nisine- carvacrol, respectivement. Un test sur la durée de vie des carottes a aussi été effectué, il a démontré que les traitements avec carvacrol et nisine ou avec sarriette des montagnes et nisine combinés à une irradiation à 1.0 kGy entrainent une élimination de *S.* Typhimurium à un niveau indétectable pendant la période d'entreposage ainsi qu'une réduction de *L. monocytogenes* de plus de 3 log au jour 1. Les concentrations bactériennes dans ces traitements étaient encore diminuées en dessous du seuil de détection au jour 6. On peut en conclure que la nisine combinée au carvacrol ou la nisine combiné à la sarriette des

montagnes et à un traitement d'irradiation à 1,0 kGy pourrait être utilisé comme une méthode efficace pour contrôler *L. monocytogenes* et *S.* Typhimurium sur les carottes.

Abstract

Elimination of food pathogens from food products using natural antimicrobial agents or using combined treatments is an important approach to ensure food safety and reduce bacterial resistance to individual methods of treatment. In this study, minicarrots were inoculated with *Listeria monocytogenes* or *Salmonella* Typhimurium at of approximately 7 log CFU/g. Inoculated samples were then coated by nisin (final concentration of 10^3 IU/g) or individual essential oil (carvacrol and mountain savory at final concentration of 0.035%, w/w) or nisin plus essential oils. The samples were then treated by irradiation at different doses to determine the D_{10} value (dose required to reduce one log CFU/g product). Carrots coated by nisin plus carvacrol increased relative sensitivity of *L. monocytogenes* to irradiation 2.74 fold. The relative sensitivity of *S.* Typhimurium to irradiation was increased 2.46 and 2.52 fold when nisin or nisin plus carvacrol coating was used, respectively. The coating of carrots by carvacrol plus nisin or by mountain savory plus nisin and then irradiation of these coated carrots at 1 kGy reduced *S.* Typhimurium to undetectable levels during the storage (period) and reduced *L. monocytogenes* by more than 3 log at day 1 and the bacterial number after ~~in~~ these treatments were further decreased to undetectable levels from day 6. It can be concluded that the combined nisin plus carvacrol or nisin plus mountain savory and irradiation at 1.0 kGy could be used as an effective method for controlling *L. monocytogenes* and *S.* Typhimurium in carrots.

KEY WORDS: Irradiation, essential oil, nisin, food pathogens

Introduction

In the last decade, food contamination has been one of the public safety priority of governments and different international organisations such as the WHO (Kaferstein and Abdussalam, 1999). Bacteria such as *Listeria monocytognes*, *Salmonella* Typhimurium and *E. coli* have been implicated in different outbreaks (Allerberger et Wagner, 2010; Krtinić *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012). Different kinds of food, especially ready-to-eat foods, can be contaminated with pathogenic bacteria. For example, salad vegetables such as cabbage, celery, lettuce, cucumber, radish, and tomatoes are often contaminated with *L. monocytogenes,* and some of these products have been implicated in outbreaks of food-borne listeriosis (Francis *et al.*, 1999; Kornacki, 2005). Therefore, it is important to find new approaches to control food contamination.

Gamma irradiation is a process that has been used to eliminate bacteria from food. This technique is also used for extending shelf life and delaying the germination of seeds (Farkas and Mohácsi-Farkas, 2011). However, the application of radiation to eliminate food pathogens such as *L. monocytogenes* and *S.* Typhimurium is limited because the dose required may cause adverse effects on the sensorial quality of food (Lacroix *et al*, 1991). Therefore, application of ionizing radiation combined with other treatments such as essential oils or modified atmospheric packaging to reduce the required doses to kill bacteria in food products has been investigated (Turgis *et al.*, 2008). Many studies have also found that the addition of natural or synthetic antimicrobial compounds to food products before applying gamma radiation could lead to an increase in the sensitivity of foodborne pathogens to irradiation (Borsa *et al.*, 2004; Turgis *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2011).

Essential oils (EOs) are aromatic oils extracted from plants and they are known to have antimicrobial effects (Burt *et al*, 2003). Some EOs are widely used to control foods spoilage and foodborne pathogenic bacteria. For example, it has been demonstrated that thyme and oregano EOs inhibit the growth of *E. coli* O157: H7 effectively (Burt *et al*, 2003). In study by Oussalah et al., (2007), different EOs were used to evaluate their antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *E.coli* O157:H7. In this study the authors found that the most active EOs against four pathogenic bacteria were *Corydothymus capitatus*, *Cinnamomum cassia*, *C. verum* from bark, *Satureja montana* and *Origanum heracleoticum* (Oussalah *et al.*, 2007; Turgis *et al.*, 2009).

Bacteriocins are small peptides produced by lactic acid bacteria when they have been shown to have antimicrobial effects (Mohamed *et al*, 2011; Delves-Broughton, 2005). Nisin is one of the most widely used bacteriocins in food industries and it is the only bacteriocin that is legally recognised as a food preservative (Delves-Broughton, 2005). Nisin is produced by *Lactococcus lactis*, and it has been demonstrated that nisin is effective against *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, and other gram positive bacteria (Mohamed *et al.*, 2011)

Another important topic in the food industry is finding ~~the~~ methods to enhance the shelf life and the microbial safety of food products. There are different factors that can influence the shelf life and safety of a food product, these include the production process, the chemical composition of the product and the manipulation of the products by consumers (Corbo *et al.*, 2009) as well as food contamination by food pathogens.

Therefore, controlling the growth of food pathogens during storage can increase the shelf life and microbial safety of food products.

The objectives of this study were to evaluate the effects of combined treatments using two essential oils (mountain savory and carvacrol), nisin, and gamma irradiation on the radiosensitivity of two important food pathogens *L. monocytogenes* and *S.* Typhimurium inoculated on carrots (*in situ* model). Moreover, the effects of these combined treatments on the shelf-life of carrots during storage at 4° C for 12 days were also conducted.

Materials and Methods

Essential oils and Bacteriocin preparation

Two essential oils (EOs), carvacrol and mountain savory oil, were used in this study. The carvacrol was purchased from Sigma-Aldrich Co., (St. Louis, MO) and the mountain savory oil was obtained from Robert et Fils enterprise (Montreal, Quebec, Canada). The EOs was (were) prepared as an emulsion by mixing EOs, DMSO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), tween-20 and Tryptic Soy Broth for one hour at room temperature. In this study, the final concentration of each tested EO was of 0.35 % (v/v).

A commercial nisin powder containing 2.5 % nisin (balance sodium chloride and denatured milk) was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). The antibacterial potency of this nisin power was 10^6 IU/g. A stock nisin solution containing 10^4 IU/ml was prepared from this powder. The stock solution was prepared by dissolving the nisin powder in acetate buffer at 100 mM pH 5, the obtained solution was sterilized by filtration through a 0.2μm filter. The final nisin concentration used in the coating solution was 1000 IU/ml.

Bacterial preparation

L. monocytogenes HPB 2812 serovar 1/2a and *Salmonella* Typhymurium (SL 1344). *Salmonella* Typhimurium was obtained from Prof. Charles Dozois (Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada). *L. monocytogenes* HPB 2812 serovar 1/2a was isolated from home made salami by the Health Products and Foods Branch of Health Canada (Ottawa, Ontario, Canada). These pathogens were maintained at -80 ^{o} C in tryptic soy broth (TSB; Difco, BD, Sparks, MD, USA) containing glycerol (10%, v/v). Before each experiment, the stock cultures of these pathogens were propagated by two successive 24-h growth cycles in TSB at 37 ^{o}C. Bacterial cells were washed twice with saline solution (0.85%, w/v), and the cell of the suspension was adjusted to approximately 10^9 CFU/ml (Turgis *et al*, 2008; Takala *et al*, 2011).

Carrot preparation

Carrots were purchased from a local store (MAXI and companies, Laval, Quebec, Canada). Carrots were put in Winpak bags (Winpak Division Ltd., Montreal, Quebec, Canada) and were sterilized by gamma irradiation at a dose of 10 kGy at the Canadian Irradiation Center using a UC-15 A (SS canister) underwater calibrator (Nordion Inc., Kanata, Ontario, Canada) equipped with a ^{60}Co source. The packages of sterilized carrots were kept at -80° C until use.

Inoculation of pathogenic bacteria onto carrots

An inoculation bath of 2 liters of sterile (0.85% NaCl) was prepared. The bath was mixed with tested bacteria to reach a bacterial suspension of approximately 10^8 CFU/ml. The bags containing sterilized carrots were defrosted and opened under sterile conditions. Each carrot was dipped into the inoculation bath and mixed for 5 minutes to obtain a final concentration of approximately 10^7 CFU/g of carrots. Carrots were left to dry for 30 minutes before coating with antimicrobial compounds.

Antimicrobial coating of carrots

The inoculated carrots were dipped into a bath containing the prepared antimicrobial compounds. When the treatment process was finished, the samples were allowed to dry for 30 minutes, packaged into sterile bags which were then sealed and kept at 4 °C overnight prior to irradiation treatment.

Irradiation treatment

Each sample was irradiated at the Canadian Irradiation Centre, in a ^{60}Co underwater calibrator having a dose rate of 14.5 kGy/h (UC-15A, Nordion, Laval, Qc). The temperature of samples was kept at 4°C during the treatment. The applied radiation doses were from 0.1 to 3.0 kGy. Samples were analyzed immediately after irradiation treatment (Turgis *et al*, 2008; Takala *et al*, 2011).

Shelf life of carrots treated by combined treatments

Effects of antimicrobial coatings on the shelf-life of carrots treated by different combined treatments were also evaluated. Samples of carrots were inoculated with tested bacteria to reach a final concentration of approximately 10^7CFU/g carrots. The samples were coated by different antimicrobial compounds. Then, the samples were submitted to an irradiation treatment with three different doses of 0; 0.5 and 1 kGy. After the irradiation treatment, the samples were kept at 4 °C for 12 days. Samples were taken for microbiological analysis (Takala *et al.*, 2011) every 3 days.

Microbiologic analysis

Each carrot sample was weighed (ca. 10 ± 0.3 g) and homogenized for 2 min in 90 ml of sterile peptone water (0.1% wt/vol) using a Lab-blender 400 stomacher (Laboratory Equipment, London, UK). From this mixture, serial dilutions were prepared and plated onto tryptic soy agar (Difco, Becton Dickinson). The plates were then incubated at 37° C for 24 h for the enumeration of *Listeria monocytogenes* or *Salmonella* Typhimurium. The cell concentrations were expressed as log CFU/ml.

Calculation of D_{10} values and relative radiosensitization

The D_{10} value is defined as the radiation dose required to eliminate 90% (reduction by 1 log CFU) of the viable initial cell concentration of bacteria. To calculate the D_{10} value, bacterial counts (log CFU/ml) were plotted against radiation doses, and the reciprocal of the slope of the trendline was extracted from the plot.

The relative radiation sensitivity was determined using the following equation:

Relative radiation sensitivity = D_{10} value of the control sample/D_{10} value of sample treated in the presence of antimicrobial compound(s).

Statistical analysis

All experiments were conducted in three replicates. For each replicate and for each dose of irradiation, three samples were analyzed. The data were analyzed using SPSS program, and the means comparison among treatments was based on Duncan's test ($P \leq 0.05$).

Results and discussion

Radiosensitivity of inoculated *Listeria monocytogenes* on carrots

Two essential oils (mountain savory and carvacrol) and one bacteriocin (nisin) were used in combination with irradiation treatment to evaluate their capacity in reducing the required doses to eliminate *Listeria monocytogenes* from carrots. The D_{10} value obtained for the control was 0.41 kGy. The D_{10} values obtained for irradiation combined with carvacrol, mountain savory, nisin, nisin plus carvacrol, and nisin plus mountain savory were 0.34, 0.26, 0.19, 0.15 and 0.17, respectively (Figure 1-d). Based on the D_{10} values, the relative sensitivity of combined treatments as compared to the control (only irradiation treatment) was calculated and presented in Figure 2-b. The relative sensitivity of *L. monocytogenes* to irradiation was increased by 1.20, 1.58, 2.15, 2.74 and 2.36 times for the treatments by carvacrol, mountain savory, nisin, nisin plus mountain savory, and nisin plus carvacrol, respectively. Thus, the combination of nisin and mountain savory caused the highest increase in the sensitivity of *L. monocytogenes* to irradiation. The combination of carvacrol plus nisin also provided an effective increase in sentitivity of *L. monocytogenes* to irradiation.

These results can be explained by the fact that nisin has a good antimicrobial effect on the Gram positive bacteria (Helander et Mattila-Sandholm, 2000). Many studies have already reported that nisin has a high antimicrobial effect against *L. monocytogenes* (Pol et Smid, 1999; Mohamed *et al.*, 2011). Several essential oils such as thyme, cavacrol and mountain savory have also been demonstrated to be antimicrobial against *L. monocytogenes* (Ghalfi *et al.*, 2007; Esteban et Palop, 2011). The synergistic effect observed between nisin and EOs (carvacrol and mountain savory) against *L. monocytogenes* could be due to the combined mechanisms of action of the two antimicrobial agents. The EOs act against target bacteria by causing a disruption of membrane function while nisin acts on target bacteria by making pores in the bacterial membrane (Carine Dortu, 2009; Serrano *et al.*, 2011). The two antimicrobial agents therefore might act in concert against the tested bacteria.

In fact, some research has demonstrated that the combination of irradiation with EOs can reduce the dose required to eliminate food pathogens from meats or vegetables. For example, Borsa et al, showed that the use of thymol and trans-cinnamaldehyde in combination with gamma-irradiation increased the relative sensitivity of *S. typhi* and *E. coli* in ground beef to irradiation treatment, respectively. Thyme at the concentration of 0.1% and 1.6 % (w/w) caused the increase in the relative sensitivity of *S. typhi* to radiation by 1.45 and 2.50 times, respectively. Similarly, they also showed that the use of trans-cinnamaldehyde at the concentrations of 0.025% and 1.5% enhanced the relative sensitivity of *E.coli* on ground beef by 1.10 and 3.41 times, respectively (Borsa *et al*, 2004).

In another study (Caillet *et al*, 2006), Caillet et al. evaluated the relative radiosensitivity of *L. monocytogenes* inoculated in minicarrots pretreated with *trans*-cinnamaldehyde, Spanish oregano, winter savory, or Chinese cinnamon EOs and packed under air or under a modified atmosphere (60% O_2, 30% CO_2, and 10% N_2). The final concentration of the EOs in this study was 0.5 % (w/w). The authors found that trans-cinnamaldehyde was the most active EO can increased the relative radiosensitivity of *L. monocytogenes* by 3.8 times in both atmosphere conditions as compared to the control.

Radiosensitivity of inoculated *Salmonella* Typhimurium on carrots

Salmonella Typhimurium was inoculated on carrots and treated with the same essential oils (carvacrol and mountain savory) and with nisin in combination with irradiation. The D_{10} values were 0.39, 0.27, 0.12, 0.12 and 0.16 for the treatments by carvacrol, mountain savory, nisin, nisin plus carvacrol, and nisin plus mountain savory, respectively, as compare to the D_{10} value of the control which was 0.29 (Figure 1-d). No significant difference was found ($P > 0.05$) in D_{10} values in the treatments using nisin alone or nisin in combination with carvacrol (Figure 1-d). The relative sensitivity of *S.* Typhimurium to radiation was increased by 2.46, 2.52 and 1.84 times using treatments of nisin, nisin plus carvacrol, or nisin plus mountain savory. However, there was no increase in radiosensitivity using treatment with carvacrol or mountain savory alone (Figure 2-b). The results showed that nisin alone or nisin in combination with two essential oils (carvacrol and mountain savory) could reduce the required dose of irradiation (low value of D_{10}) to kill *Salmonella* Typhimurium in minicarrots. It also showed that depending on the type of EOs tested, the antimicrobial effects against target bacteria can be different. In this study, the combination of nisin with carvacrol caused a significantly higher

antimicrobial effect ($P < 0.05$) against *S.* Typhimurium than that of the combination of nisin with mountain savory. In fact, it is known that nisin is less effective at inhibiting the growth of gram-negative bacteria (in this case *S.* Typhimurium) (Helander *et al*, 2000), however, it is interesting that in combination with irradiation, the sensitivity of *S.* Typhimurium was increased by 2.46 times as compared to the control.

Turgis *et al.* reported that some EOs (trans-cinnamaldehyde, clove, Chinese cinnamon) at a final concentration of 0.5 % (w/w) could increase the radiosensitivity of *Samonella* Typhi in ground beef to irradiation by more than 4 times. In that study, mountain savory (or winter savory) was also found to increase the relative radiosensitivity of *S.* Typhi by 2.58 times. However, in our study, mountain savory at the final concentration of 0.35 % (w/w) did not increase the radiosensitivity of *S.* Typhimurium as compared to the control. The possible reasons for such difference include serovar of *Salmonella* (Typhi and Typhimurium), different food matrix (ground beef and carrots), and different final concentrations of EO (0.35 and 0.50 %) that were used in these two studies.

Effects of combined treatments on the shelf-life of carrots

The effects of combined treatments using essential oils, nisin and gamma irradiation on the shelf life of inoculated carrots with *S.* Typhimurium and *L. monocytogenes* are presented in Table 1 and 2, respectively.

For *S.* Typhimurium, in the control (uncoated carrots without irradiation treatment), there was no reduction in bacterial number during 9 days of storage. In the uncoated carrots treated by irradiation at 0.5 kGy, there was a reduction of 1.52 log at day 1 as compared to the control ($P \leq 0.05$), and at day 6, there was also more than 1 log reduction as

compared to day 1 of this treatment. In the uncoated carrots treated by irradiation of 1.0 kGy, there was a reduction of 1.76 log at day 1 as compared to the control, and the bacterial number were reduced by 2.91 log at day 3 as compared to day 1 of this treatment. Bacterial number then increased at day 6 and maintained about 3 log until the end of storage of this treatment. Thus, irradiation treatment alone (especially at 1.0 kGy) was effective at reduction of inoculated *S.* Typhimurium in carrots as compared to the control.

Combined treatment with irradiation at 0.5 or 1 kGy with essentials oils (carvacrol and mountain savory) and nisin was shown to reduce bacterial concentration. In carrots coated with nisin and without irradiation, treatment reduced bacteria by 1 log at day 1 as compared to the control. This treatment also caused a reduction of more than 1 log at day 9 as compared to day 1. The combined treatment by nisin and irradiation at 1 kGy was very efficient in reducing *S.* Typhimurium since only 1.77 log of *S.* Typhimurium was detected at day 1 and *S.* Typhimurium was undetectable from day 3 of storage.

There was no significant difference ($P > 0.05$) in bacterial number in the control and in carrots coated with carvacrol and without irradiation treatment at day 1; however, there was more than 2 logs of reduction in the microbial load at day 9 of this treatment. Carrots coated with carvacrol and treated by irradiation at 0.5 kGy significantly reduced of *S.* Typhimurium levels, especially, from day 3 of the treatment. Further, irradiation of carvacrol-coated carrots at 1 kGy reduce levels of *S.* Typhimurium by almost 4 log at day 1 as compared to the control. Bacterial numbers in this sample were decreased below the limit of detection at day 9.

There was also no significant difference ($P > 0.05$) in bacterial numbers at day 1 in the control and in carrots coated with mountain savory without irradiation treatment; however, there was more than a 2 log of reduction in microbial load at day 9 of this treatment. Irradiation of mountain savory-coated carrots at 0.5 kGy, at day 1 there was a half reduction in the microbial load as compared to the mountain savory-coated carrots that were not irradiated. This treatment reduced bacterial number further at day 3 and was under detection the limit at day 9. Irradiation of mountain savory-coated carrots at 1.0 kGy caused a reduction of almost 5 log at day 1 as compared to this coating formulation without irradiation treatment. This treatment further decreased bacterial number at day 3 that were further decreased to below the detection limit by day.

At day 1, bacterial numbers in carrots coated by carvacrol and nisin and without irradiation (0 kGy) were reduced by more than one log as compared to the control. This treatment also caused further decreased in bacterial numbers at day 3 until the end of storage. Bacterial numbers in carrots coated by mixed carvacrol plus nisin and irradiated at 0.5 kGy were reduced by 2.76 log as compared to this coating formulation but without irradiation. This treatment did not increase bacterial numbers from day 3 to the end of storage. It is interesting that this coating formulation in combination with irradiation at 1 kGy caused the reduction in cell concentration that was lower than the detection limit during storage.

In carrots coated by mountain savory plus nisin and without irradiation (0 kGy), bacterial numbers were reduced by more than 1 log as compared to the control at day 1. The bacterial levels in this treatment were further decreased from day 3 to day 9. Coating carrots with mountain savory plus nisin combined with irradiation treatment at 0.5 kGy

caused a decrease of nearly 2 log of *S.* Typhimurium at day 1 compared to carrots coated by mountain savory plus nisin without irradiation. This treatment decreased bacterial numbers to undetectable level at day 9. Coating carrots with mountain savory plus nisin combined with irradiation treatment at 1 kGy reduced *S.* Typhimurium numbers to undetectable levels from day 1 of treatment.

Coating of carrots with carvacrol plus nisin or by mountain savory plus nisin and then irradiating these coated carrots at 1 kGy could eliminate *S.* Typhimurium to undetectable levels during the storage period. Moreover, it coating carrots with mountain savory alone (without nisin) followed by the irradiation of the coated carrots at 1 kGy could also eliminate *S.* Typhimurium to undetectable levels from day 6 of storage. Thus, it can be concluded that nisin contributed to the antimicrobial effects against *S.* Typhimurium in combination with essential oils (either carvacrol or mountain savory). Moreover, carrots coated with mountain savory were found to be more effective in the elimination of *S.* Typhimurium than carrots by carvacrol followed by irradiation treatment at 1 kGy (Table 1). These results could be explained by the fact that carvacrol is only one of the main components of mountain savory EO (Serrano *et al*, 2011), and therefore, there might be additive effects the among different components of mountain savory EO in increasing the sensitivity of *S.* Typhimurium to irradiation as compared to treatment by carvacrol alone. Some researchers have concluded that complete EOs have a higher antibacterial activity than does a mixture of the major components, which suggests that the minor components are critical to the activity and may contribute to a synergistic effect (Burt *et al*, 2004).

For *L. monocytogenes* (Table 2), in the control (uncoated carrots and no irradiation treatment), there was no reduction in bacterial numbers during 6 days of storage, and

there was about 0.5 log reduction at day 9 of storage. In the uncoated carrots treated by irradiation of 0.5 kGy, there was a reduction of 1.64 log at day 1 and a reduction of 2.7 log at day 3 as compared to the control ($P \leq 0.05$) at the same day of treatment of the control, respectively; however, in this treatment, there was an increase in bacterial numbers from day 3 to day 6 as compared to day 1 of this treatment. In the uncoated carrots treated by irradiation of 1.0 kGy, there was a reduction of about 2 log at day 1 as compared to the control, and the bacterial levels were reduced by 2.56 log at day 3 as compared to day 1 of this treatment. Bacterial counts then increased at day 6 and maintained about 5 log until the end of storage. Thus, irradiation treatment alone (especially at 1.0 kGy) was effective at reduction of inoculated *L. monocytogenes* in carrots as compared to the control; however, it was less effective against *L. monocytogenes* as compared to that of *S.* Typhimurium.

Bacterial counts in carrots coated with nisin and without irradiation treatment were reduced by less than 1 log as compared to the control at day 1. This treatment also caused a reduction of 3.56 log at day 6 and a reduction to undetectable levels at day 9. The combined treatment with nisin and irradiation at 1 kGy was efficient in reducing *L. monocytogenes*, since only 4.13 and 2.91 log of *L. monocytogenes* was detected at day 1 and day 3, respectively, of the treatment and moreover, *L. monocytogenes* was undetectable from day 6 of storage.

There was no significant difference ($P > 0.05$) in bacterial counts in the control and in carrots coated with carvacrol and without irradiation treatment at day 1. Moreover, in this treatment, bacterial counts were not reduced at day 3 or day 6 ($P > 0.05$), but decreased on day 9 with about 0.8 log reduction ($P \leq 0.05$). Carrots coated by carvacrol and

irradiated at 0.5 kGy were reduced about 1.53 log compared to the same treatment without irradiation at day 1. The bacterial levels following this treatment was increased less than 1 log during the storage. In carrots coated by carvacrol and irradiated at 1 kGy, there was a reduction of 2 log in bacterial counts at day 1 and the bacterial concentration was unchanged ($P > 0.05$) during storage.

There was also no significant difference ($P > 0.05$) in bacterial numbers at day 1 in the control and in carrots coated by mountain savory and without irradiation treatment. Moreover, this treatment did not reduce the bacterial counts during storage. There was a reduction of 0.76 and 2.15 log in bacterial numbers at day 1 in the samples coated by mountain savory and then irradiated at 0.5 and 1.0 kGy, respectively. These combined treatments (mountain savory plus irradiation at 0.5 kGy or mountain savory plus irradiation at 1.0 kGy) did not cause any further bacterial reduction during the storage.

At day 1, bacterial counts in carrots coated by carvacrol plus nisin and without irradiation (0 kGy) were reduced by more than one log as compared to the control. This treatment also caused a further decrease in bacterial numbers at day 3 until the end of storage. Bacterial counts in carrots coated by carvacrol plus nisin and irradiated at 0.5 kGy were reduced by 1.95 log as compared to those coated with nisin without irradiation. Bacterial counts following this treatment were further reduced by 2 log at day 6 and were undetectable at day 9. It is interesting that this coating formulation in combination with irradiation at 1 kGy caused a reduction by more than 3 log at day 1 as compared to this formulation without irradiation. Bacterial numbers following this treatment were further reduced at day 3 by 0.6 log and were undetectable at day 6 and 9 of storage.

In carrots coated by mountain savory plus nisin and without irradiation (0 kGy), bacterial counts were reduced by more than 1 log as compared to the control at day 1. Bacterial counts in this treatment were further decreased during storage and had 3.72 log at day 9. Coating carrots with mountain savory plus nisin combined with irradiation treatment at 0.5 kGy caused a decrease of more than 1 log of *L. monocytogenes* at day 1 compared to carrots coated by mountain savory plus nisin without irradiation. Bacterial counts after this treatment was further decreased at day 3 and day 6 and decreased to undetectable levels at day 9. The coating of carrots with mountain savory plus nisin combined with irradiation treatment at 1 kGy reduced *L. monocytogenes* numbers by more than 3 log at day 1 as compared to this formulation of coating without irradiation. The bacterial numbers after this treatment were further decreased at day 3, and day 6 and decreased to undetectable levels at day 9 of treatment.

Coating of carrots with carvacrol plus nisin or with mountain savory plus nisin followed by irradiation of these coated carrots at 1 kGy reduced *L. monocytogenes* by more than 3 log at day 1 and the bacterial levels in these treatments were further decreased to undetectable levels at day 6. Thus, it can be concluded that nisin contributed to the antimicrobial effects against *L. monocytogenes* in combination with essential oils (either carvacrol or mountain savory) and irradiation treatment at low dose (1 kGy).

It was also found that the combined treatments of carrots using a coating formulation containing carvacrol plus nisin or mountain savory plus nisin followed by irradiation at 1 kGy had better antimicrobial effects against *S.* Typhimurium than *L. monocytogenes* during the storage of carrots for 9 days. These results can be explained by the fact that *L. monocytogenes* are more resistant to environmental conditions than *S.* Typhimurium

(Farker *et al*, 1991). *L. monocytogenes* can grow over a wide range of temperatures (between 1 and 45^{0}C) (Farker *et al*, 1991).

Conclusion

This study demonstrated that combinations of nisin and essentials oils (carvacrol or mountain savory) have the capacity to significantly reduce the required irradiation dose to eliminate *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium from ready to eat carrots. Carrots coated with nisin plus carvacrol caused an increase in relative sensitivity of *L. monocytogenes* to irradiation by 2.74 times. The relative sensitivity of *S.* Typhimurium to irradiation was increased by 2.46 and 2.52 when of nisin and nisin plus carvacrol were used as coatings, respectively. For the shelf-life of carrots, the coating of carrots by carvacrol plus nisin or by mountain savory plus nisin followed by the irradiation of these coated carrots at 1 kGy could eliminate *S.* Typhimurium to undetectable levels the during storage and could reduce *L. monocytogenes* by more than 3 log at day 1 and the bacterial levels in these treatments were further decreased to undetectable levels from day 6. The combination of nisin plus carvacrol or nisin plus mountain savory and irradiation at 1.0 kGy could be used as an effective method for controlling *L. monocytogenes* and *S.* Typhimurium in carrots.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors sincerely thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada through the discovery program for financial support. Nordion Inc. is acknowledged for irradiation treatments.

REFERENCES

1. Kaferstein, F. and M. Abdussalam, *Food safety in the 21st century.* Bulletin of the World Health Organization, 1999. **77**(4): p. 347-351.
2. Allerberger, F. and M. Wagner, *Listeriosis: a resurgent foodborne infection.* Clinical Microbiology and Infection, 2010. **16**(1): p. 16-23.
3. Muñoz, P., et al., *Listeriosis: An emerging public health problem especially among the elderly.* Journal of Infection, 2012. **64**(1): p. 19-33.
4. Krtinić, G., P. Đurić, and S. Ilić, *Salmonellae in food stuffs of plant origin and their implications on human health.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2010. **29**(11): p. 1321-1325.
5. Kornacki, J.L., *Controlling Listeria in the food processing environment.* Food Technology, 2005. **59**(11): p. 36-38.
6. Francis, G.A., C. Thomas, and D. O'Beirne, *The microbiological safety of minimally processed vegetables.* International Journal of Food Science and Technology, 1999. **34**(1): p. 1-22.
7. Farkas, J. and C. Mohácsi-Farkas, *History and future of food irradiation.* Trends in Food Science & Technology, 2011. **22**(2-3): p. 121-126.
8. Lacroix, M., M. Jobin, S. Hamel, V. Stahl, M. Gagnon, and C. De Couvercelle. 1991. *Effects of 3 kGy and 7 kGy gamma radiation doses on odour and flavour of fresh chicken breast.* Microbiologie Aliments Nutrition **9**: 375–379.
9. Turgis, M., et al., *Effect of selected plant essential oils or their constituents and modified atmosphere packaging on the radiosensitivity of Escherichia coli O157 :*

H7 and Salmonella Typhi in ground beef. Journal of Food Protection, 2008. **71**(3): p. 516-521.

10. Mohamed, H.M.H., F.A. Elnawawi, and A.E. Yousef, *Nisin Treatment To Enhance the Efficacy of Gamma Radiation against Listeria monocytogenes on Meat.* Journal of Food Protection, 2011. **74**(2): p. 193-199.
11. Turgis, M., et al., *Effect of selected antimicrobial compounds on the radiosensitization of Salmonella Typhi in ground beef.* Letters in Applied Microbiology, 2009. **48**(6): p. 657-662.
12. Borsa, J., et al., *Radiosensitization: enhancing the radiation inactivation of foodborne bacteria.* Radiation Physics and Chemistry, 2004. **71**(1-2): p. 137-141.
13. Burt S.A., Reinders RD. 2003. *Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli* O157 : H7. Letters in Applied Microbiology **36**: 162-167.
14. Oussalah, M., et al., *Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes.* Food Control, 2007. **18**(5): p. 414-420.
15. Delves-Broughton, J., *Nisin as a food preservative.* Food Australia, 2005. **57**(12): p. 525-527.
16. Corbo, M.R., et al., *Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches - a review.* International Journal of Food Science & Technology, 2009. **44**(2): p. 223-241.

17. Takala, P.N., et al., *Effect of antimicrobial coatings on the radiosensitization of Escherichia coli, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes in fresh broccoli.* J Food Prot, 2011. **74**(7): p. 1065-9.

18. Helander, I.M. and T. Mattila-Sandholm, *Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin.* International Journal of Food Microbiology, 2000. **60**(2-3): p. 153-161.

19. Pol, I.E. and E.J. Smid, *Combined action of nisin and carvacrol on Bacillus cereus and Listeria monocytogenes.* Letters in Applied Microbiology, 1999. **29**(3): p. 166-170.

20. Esteban, M.D. and A. Palop, *Nisin, Carvacrol and Their Combinations Against the Growth of Heat-Treated Listeria monocytogenes Cells.* Food Technology and Biotechnology, 2011. **49**(1): p. 89-95.

21. Ghalfi, H., et al., *Effectiveness of cell-adsorbed bacteriocin produced by Lactobacillus curvatus CWBI-B28 and selected essential oils to control Listeria monocytogenes in pork meat during cold storage.* Letters in Applied Microbiology, 2007. **44**(3): p. 268-273.

22. Serrano, C., et al., *Antioxidant and antimicrobial activity of Satureja montana L. extracts.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011. **91**(9): p. 1554-1560.

23. Carine Dortu, P.T., *Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires.* Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 2009. **13**(1): p. 143-154.

24. Caillet S., Millette M., Turgis M., Salmieri S., Lacroix M., *Influence of antimicrobial compounds and modified atmosphere packaging on radiation sensitivity of Listeria monocytogenes present in ready-to-use carrots (Daucus carota)*. Journal of Food Protection, 2006. **69**(1): 221-227.

25. Farber K.R., Peterkin P.I., *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiological. Reviews, 1991. **55**:476-511.

26. Burt S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods* - a review. International Journal of Food Microbiology, 2004. **94**: 223-253.

List of Figures

Figure 1-d. D_{10} values of different treatments against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on ready to eat carots.

Figure 2-b. Relative radiosensitization of different treatments against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on ready to eat carots.

List of Tables

Table 1: Effect of combination of essentials oils, nisin, and irradiation on populations of *Salmonella* Typhimurium on peeled minicarrots during storage at 4 ° C

Table 2. Effect of combination of essentials oils, nisin, and irradiation on populations of *Listeria monocytogenes* HPB 2812 serovar 1/2a on peeled minicarrots during storage at 4 ° C

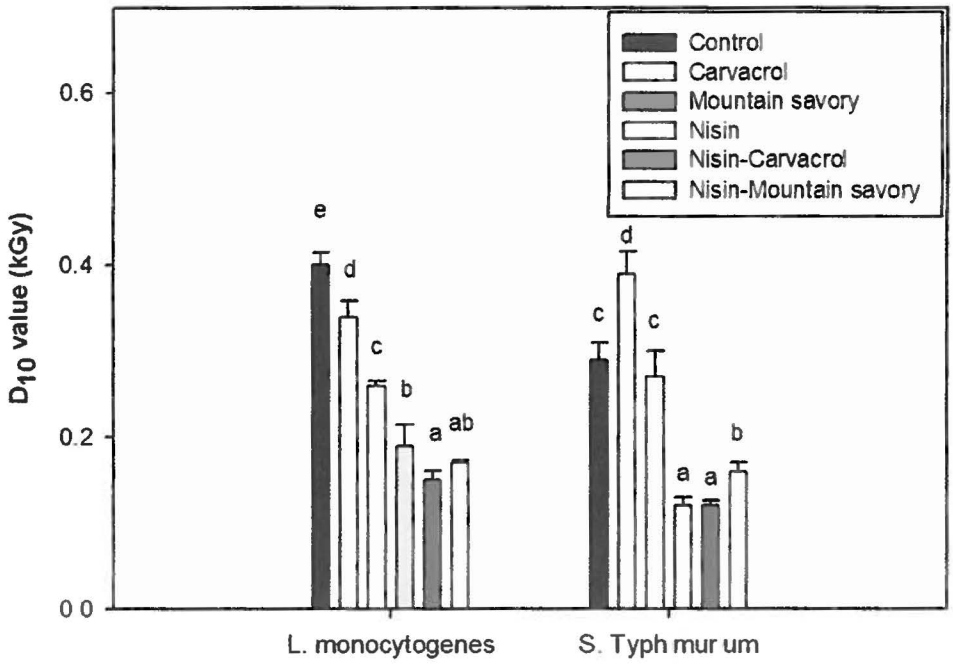

Figure 1-d. D_{10} values of different treatments against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on ready to eat carrots.

For each bacterium, different letters above the bars of the histogram show significant differences among treatments ($P \leq 0.05$)

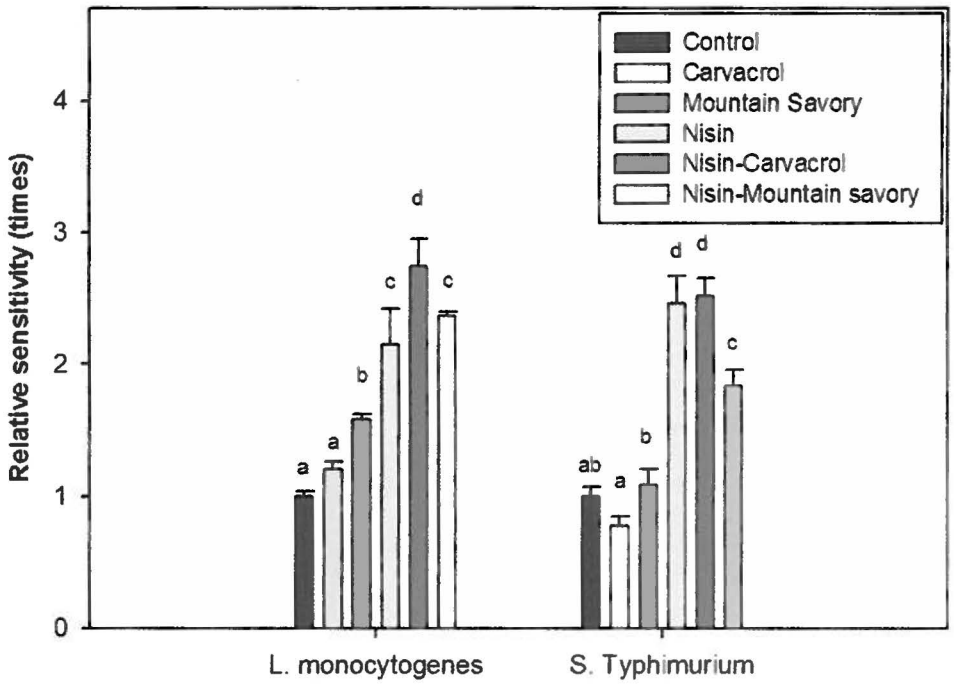

Figure 2-b. Relative radiosensitization of different treatments against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on ready to eat carotts.

For each bacterium, different letters above the bars of the histogram show significant differences among treatments ($P \leq 0.05$)

TABLE 1: Effect of combination of essentials oils, nisin, and irradiation on populations of *Salmonella* Typhimurium on peeled minicarrots during storage at 4 ° C

Treatments	*Day 1*	*Day 3*	*Day 6*	*Day 9*
Uncoated carrots				
Irradiated 0 kGy	*6.93 ± 0.10 b A**	*6.95± 0.14 a A*	*7.14 ± 0.13 a A*	*6.89 ± 0.41 a A*
Irradiated 0.5 kGy	*5.41 ± 0.06 de B*	*5.13 ±0.98 cd B*	*4.73 ± 0.37 cd C*	*4.26 ± 0.32 cd D*
Irradiated 1 kGy	*5.17 ± 0.10 e B*	*2.19 ± 0.14 g G*	*3.59 ± 0.06 e E*	*3.04 ± 0.24 f F*
Nisin coated				
Irradiated 0 kGy	*5.82 ± 0.070 c A*	*4.92 ± 0.21 d B*	*4.92 ± 0.226 c B*	*4.44 ± 0.14 cd C*
Irradiated 0.5 kGy	*3.52 ± 0.39 g D*	*3.33 ± 0.21 f D*	*3.23 ± 0.111 e D*	*2.67 ± 0.15 f E*
Irradiated 1 kGy	*1.77 ± 0.185 j F*	*ND*	*ND*	*ND*
Carvacrol coated				
Irradiated 0 kGy	*7.00 ± 0.16 b A*	*6.52 ±0.42 b B*	*6.26 ± 0.05 b B*	*4.56 ± 0.32 c C*
Irradiated 0.5 kGy	*4.16 ±0.06 f D*	*2.32 ± 0.12 g F*	*2.31 ± 0.22 g F*	*2.42 ± 0.19 gh F*
Irradiated 1 kGy	*2.96 ±0.11 h E*	*1.86 ± 0.16 g G*	*1.76 ± 0.40 hi G*	*ND*
Mountain savory coated				
Irradiated 0 kGy	*7.48 ± 0.20 a A*	*6.81 ± 0.29 ab B*	*6.40 ± 0.11 b C*	*5.17 ± 0.09 b D*
Irradiated 0.5 kGy	*3.74 ± 0.19 g E*	*2.41 ± 0.13 g G*	*2.69 ± 0.10 f F*	*1.34 ±0.12 1 H*
Irradiated 1 kGy	*2.54 ± 0.02 iG*	*1.52 ± 0.06 h H*	*ND*	*ND*
Cavacrol-Nisin coated				
Irradiated 0 kGy	*5.70 ± 0.39 cd A*	*5.35 ±0.22 c A*	*4.53 ± 0.11 cd B*	*3.76 ± 0.60 e C*
Irradiated 0.5 kGy	*2.94 ± 0.24 hD*	*2.26 ± 0.10 g E*	*1.92 ± 0.64 h E*	*2.19 ±0.07 h E*
Irradiated 1 kGy	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*
Mountain savory – Nisin coated				
Irradiated 0 kGy	*5.53 ± 0.23 cd A*	*4.30 ± 0.24 e BC*	*4.41 ± 0.16 d B*	*4.04 ± 0.15 de C*
Irradiated 0.5 kGy	*3.57 ± 0.13 g D*	*2.47 ± 0.21 g E*	*1.51 ± 0.18 i F*	*1.40 ±0.35 i F*
Irradiated 1 kGy	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*

* Values are means ± standard deviations. Means with different lowercase letters within the same row are significantly different from other means of different analysis day as determined by Duncan's test ($P \leq 0.05$). Means with different uppercase letters within each column are significantly different from other means of other treatments as determined by Duncan's test ($P \leq 0.05$).

** ND, no colony detected (detection limit of 50 colonies per gram minicarrots).

TABLE 2. Effect of combination of essentials oils, nisin, and irradiation on populations of *Listeria monocytogenes* HPB 2812 serovar 1/2a on peeled minicarrots during storage at 4 ° C

Treatment	Day 1	Day 3	Day 6	Day 9
Uncoated carrots				
Irradiated 0 kGy	7.74 ± 0.08 a *AB*	7.64 ± 0.14 a *B*	7.91 ± 0.15 a *A*	7.31 ± 0.17 a *C*
Irradiated 0.5 kGy	6.10 ± 0.09 cd *E*	4.94 ± 0.09 *ef G*	6.91 ±0.12 b *D*	6.25 ± 0.66 c *E*
Irradiated 1 kGy	5.72 ± 0.09 cde *F*	3.16 ± 0.26 g *H*	5.75 ± 0.07 c *F*	5.05 ± 0.072 e *G*
Nisin coated				
Irradiated 0 kGy	7.71 ± 0.11 a *A*	6.45 ± 0.67 b *B*	5.18 ± 0.39 d *C*	3.08 ± 0.14 g *F*
Irradiated 0.5 kGy	6.09 ± 0.31 cd *B*	4.55 ± 0.36 f *D*	2.53 ± 0.25 h *E*	*ND*
Irradiated 1 kGy	4.13 ± 0.32 g *D*	2.91 ± 0.11 g *F*	*ND*	*ND*
Carvacrol coated				
Irradiated 0 kGy	7.68 ± 0.15 a *A*	7.64 ± 0.16 a *A*	7.77 ±0.18 a *A*	6.88 ± 0.85 b *B*
Irradiated 0.5 kGy	6.15 ± 0.05 cd *D*	6.40 ± 0.35 bc *CD*	6.87 ± 0.08 b *B*	6.75 ± 0.24 b *BC*
Irradiated 1 kGy	5.39 ± 0.13 de *E*	5.50 ± 045 de *E*	5.46± 0.14 cd *E*	5.39 ± 0.17 d *E*
Mountain-savory coated				
Irradiated 0 kGy	7.33 ± 0.16 ab *B*	7.64 ± 0.12 a *A*	7.91 ± 0.19 a *A*	7.00 ± 0.12 b *C*
Irradiated 0.5 kGy	6.57± 0.41bc *D*	6.27 ± 0.10 bcd *E*	6.83 ± 0.17 b *D*	6.94 ± 0.07 b *C*
Irradiated 1 kGy	5.18 ± 0.13 *ef G*	5.07 ± 0.13 *ef G*	5.56 ± 0.07 c *F*	5.21 ±0.11 de *G*
Cavacrol-Nisin coated				
Irradiated 0 kGy	6.50 ± 0.06 c *A*	5.58 ± 0.21 cde *AB*	3.87 ± 0.10 f *D*	2.71 ± 0.10 h *D*
Irradiated 0.5 kGy	4.55 ± 0.18 *fg BC*	4.74 ± 1.12 *ef BC*	2.55 ± 0.18 *hD*	*ND*
Irradiated 1 kGy	3.19 ± 0.15 h *D*	2.59 ± 1.15 g *D*	*ND*	*ND*
Mountain savory – Nisin coated				
Irradiated 0 kGy	6.43 ± 0.23 c *A*	5.26 ± 0.16 *ef B*	4.27 ± 0.36 *eD*	3.72 ±0.76 f *E*
Irradiated 0.5 kGy	5.03 ± 0.18 *ef BC*	4.77 ± 0.50 *ef C*	3.48 ± 0.12 *gEF*	1.38 ± 0.49 i *H*
Irradiated 1 kGy	3.22 ± 0.04 h *F*	2.34 ± 0.28 g *G*	1.54 ±0.23 1 *H*	*ND*

* Values are means ± standard deviations. Means with different uppercase letters within the same group of coated at three different irradiation doses (0, 0.5 and 1 kGy) are significantly different from other means as determined by Duncan's test ($P \leq 0.05$). Means with different lowercase letters within each column are significantly different from other means of other treatments as determined by Duncan's test ($P \leq 0.05$).

** ND, no colony detected (detection limit of 50 colonies per gram minicarrots).

Chapitre IV

Discussion

L'irradiation est une technique de conservation alimentaire utilisée pour éliminer les bactéries pathogènes des aliments. L'objectif de notre travail était de trouver des composés naturels qui aideraient à réduire les doses d'irradiation nécessaires à éliminer certaines bactéries pathogènes. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec deux principaux pathogènes alimentaires, qui sont *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium. Ces deux bactéries sont reconnues pour leurs implications dans des maladies d'origine alimentaire (Mead *et al.*, 2000; Farkas, 2001). L'irradiation des aliments est une technique qui se doit de respecter certaines normes. En effet, les doses utilisées pour irradier les aliments ne doivent pas dépasser un certain seuil afin d'éviter l'apparition de certains effets secondaires (Helander and Mattila-Sandholm, 2000). Plusieurs études ont démontré l'effet positif de l'ajout de composés naturels dans la réduction des doses pour éliminer les bactéries (Borsa *et al.*, 2004; Esteban et Palop, 2011). Parmi ces composés, les huiles essentielles et les bactériocines représentent un intérêt certain. En effet, il a déjà été démontré que l'ajout d'huiles essentielles aux aliments avant irradiation entraine une diminution de la dose nécessaire à éliminer certaines bactéries telles que *S.* Typhimurium, *E. coli* ou encore *L. monocytogenes*.

Dans notre étude, nous nous sommes attardés sur l'effet de la combinaison d'huiles essentielles et de nisine sur la réduction des doses d'irradiation pour éliminer *L. monocytogenes* et *S.* Typhimurium. Deux huiles essentielles et une bactériocine ont été choisies pour les expériences, soit le carvacrol, la sarriette des montagnes et la nisine. Chacun de ces composés a déjà démontré un effet antimicrobien en combinaison avec l'irradiation. Deux expérimentations ont été menées afin de démontrer leurs effets sur la

radiosensibilisation bactérienne. Un test *in vitro* a été effectué dans un milieu nutritif, et par la suite, un test *in situ* a été effectué sur des carottes afin de vérifier si l'effet observé *in vitro* pouvait aussi être observé sur un aliment. Les résultats obtenus nous démontrent que le fait d'appliquer une combinaison d'huile essentielle et de bactériocine en prétraitement a pour effet de rendre les bactéries *L. monocytogenes* et *S.* Typhimurium plus sensibles au traitement à l'irradiation. Cet effet est observé dans le cas des tests *in vitro*, et dans le cas des tests *in situ*.

Effet des traitements combinés d'huiles essentielles, de nisine et d'irradiation *in vitro*.

Les résultats de notre étude nous démontrent que la combinaison des huiles essentielles et de la nisine a un effet bénéfique sur la sensibilisation de *L. monocytogenes* et *S.*Typhimuriun *in vitro*. Les deux bactéries ont été soumises à 5 traitements: les traitements de nisine, carvacrol et sarriette des montagnes, chacun combinés à l'irradiation. Des mélanges carvacrol-nisine et sarriette des montagnes-nisine combinés à l'irradiation ont également été effectués.

Les résultats que nous avons obtenus nous amènent à constater que le traitement combiné de nisine et de sarriette des montagnes est plus efficace que le traitement combiné de nisine et de carvacrol contre *L. monocytogenes* en termes de sensibilité relative à l'irradiation (Figure 2). Cela pourrait s'expliquer par le fait que le carvacrol est une des principales composantes de la sarriette des montagnes (Serrano, Matos *et* al. 2011). Par conséquent, il pourrait y avoir des effets additifs entre les différents composants de la sarriette des montagnes en augmentant la sensibilité de *L. monocytogenes* à l'irradiation par rapport au traitement par le carvacrol seul. Selon Carraminana *et* al. (2008), le

carvacrol qui est un monoterpène phénolique est le constituant majeur (70,5%) de la sarriette des montagnes (*Satureja montana*). D'autres composés importants tels que les hydrocarbures monoterpéniques p-cymène (10%), les γ-terpinènes (2,2%), l'α-pinène (1,2%) et le monoterpène alcool bornéol (1,9%). Il a déjà été démontré qu'utiliser une huile essentielle complète entraine une activité antibactérienne plus forte que le fait d'utiliser juste un des composants de l'huile. Ceci suggère que les composants mineurs sont importants pour l'activité antimicrobienne et peuvent contribuer à un effet de synergie (Burt, 2004).

Le fait que la combinaison d'huiles essentielles (carvacrol ou sarriette des montagnes) et de la nisine augmente la radiosensibilisation de *L. monocytogenes* aux rayonnements gamma peut être expliqué à travers le mécanisme d'action de chaque composant. En effet, les huiles essentielles agissent sur les bactéries en perturbant les membranes cellulaires (Oussalah *et al.*, 2006) tandis que les bactériocines vont agir en créant des pores sur membrane et la paroi cellulaire bactérienne (Pol et Smid, 1999). Les huiles essentielles peuvent ainsi améliorer l'activité antimicrobienne de la nisine en augmentant le nombre de pores dans les membranes cellulaires créées par la nisine ou en augmentant la taille des pores formés, ce qui conduira à une réduction plus importante de cellules viables (Pol et Smid, 1999). Par conséquent, il est raisonnable que la combinaison des deux huiles essentielles (dans ce cas la sarriette de montagne et le carvacrol) avec la nisine puisse provoquer un effet synergique sur l'augmentation de la sensibilité de *L. monocytogenes* à un traitement par irradiation gamma.

Les résultats obtenus sur *S.* Typhimurium démontrent que la nisine est moins efficace contre *S.* Typhimurium par rapport à *L. monocytogenes* lorsque combinée avec les huiles

essentielles et l'irradiation. Ceci est plutôt logique étant donné qu'il a déjà été démontré que les bactéries gram négatives ne sont pas sensibles à la nisine. En effet, la membrane externe des bactéries Gram négative (dans cette étude *S.* Typhimurium) est recouverte par une couche de peptidoglycane (Helander et Mattila-Sandholm, 2000). La membrane externe contient des glycérophospholipides et lipopolysacharides qui forment une couche étanche et peut exclure des substances hydrophobes et des macromolécules. La nisine est une macromolécule hydrophobe. Par conséquent, elle ne peut pas pénétrer la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Helander et Mattila-Sandholm, 2000).

Nous avons aussi constaté que de tous les traitements effectués, la combinaison de la sarriette des montagnes avec la nisine était le meilleur traitement pour augmenter la sensibilisation de *S.* Typhimurium au traitement par irradiation. La sarriette des montagnes a déjà démontré des effets antimicrobiens sur *S.* Typhimurium (Serrano et al. 2011), tout comme le carvacrol, qui a déjà été utilisé dans certaines études pour augmenter la radiosensibilité des bactéries pathogènes d'origine alimentaire à l'irradiation gamma. Par exemple, Chiasson *et* al. (2004) a constaté que l'ajout d'huiles essentielles de thym ou de ses principaux constituants (carvacrol) sur du bœuf haché a pour effet d'augmenter la sensibilisation de *E. coli* et *Salmonella* Typhi aux rayonnements gamma.

Il peut aussi être constaté que la nisine utilisée seule n'a pas démontré d'effet de sensibilisation au traitement par irradiation de la bactérie *S.* Typhimurium. Or, lorsqu'elle est combinée avec la sarriette de montagne ou le carvacrol, les effets antimicrobiens étaient améliorés, ce qui est indiqué par une valeur de D_{10} inférieure à la valeur de D_{10} du contrôle (Figures 1 et 2).

En conclusion, l'étude a démontré que la combinaison d'huiles essentielles avec la nisine

avant d'appliquer un traitement par irradiation a réduit de manière significative la dose d'irradiation nécessaire pour éliminer *L. monocytogenes* et *S.* Typhimurium *in vitro*. Un effet synergique est observé en combinant le carvacrol ou la sarriette des montagnes avec la nisine et l'irradiation contre *L. monocytogenes* et *S.* Typhimurium. La nisine était plus efficace contre *L. monocytogenes* que *S.* Typhimurium. La combinaison de la nisine et de l'irradiation n'a pas augmenté la radiosensibilisation de *S.* Typhimurium, tandis que l'augmentation de la radiosensibilisation de *L. monocytogenes* est de 2,31 fois supérieure.

Effet des traitements combinés d'huiles essentielles, de nisine et d'irradiation *in situ*.

Plusieurs huiles essentielles et bactériocines sont connues pour avoir des effets antimicrobiens. Or, avant de les utiliser en tant qu'agents antimicrobiens sur des aliments, il convient de vérifier les résultats obtenus de façon expérimentale sur un aliment afin ainsi de vérifier si les effets sont les mêmes. Les résultats expérimentaux obtenus *in vitro* sont confirmés par les résultats obtenus sur les carottes. En effet, on constate que comme dans l'expérimentation *in vivo*, le fait de combiner les traitements entraine une augmentation de la sensibilisation des bactéries *L. monocytogenes* et *S.* Typhimurium.

La sarriette des montagnes et le carvacrol ainsi que la nisine ont été utilisés en combinaison avec un traitement par irradiation afin d'évaluer leur capacité à réduire les doses requises pour éliminer *L. monocytogenes*. La valeur D_{10} obtenue pour le témoin était de 0,41 kGy. Les valeurs de D_{10} obtenues étaient de 0,34, 0,26, 0,19, 0,15 et 0,17 kGy respectivement pour le carvacrol, la sarriette des montagnes, la nisine, la nisine et le carvacrol, et la nisine et la sarriette des montagnes (Figure 1). Sur la base des valeurs de D_{10}, la sensibilité relative des traitements combinés par rapport au témoin (traitement par

irradiation seulement) a été calculée et présentée dans la Figure 2. La sensibilité relative *de L. monocytogenes* à l'irradiation a été augmentée de 1,20, 1,58, 2,15, 2,74 et 2,36 fois pour les traitements par le carvacrol, la sarriette des montagnes, la nisine, la nisine et la sarriette des montagnes, et de la nisine et le carvacrol respectivement.

Ainsi, la combinaison de la nisine et de la sarriette des montagnes a causé la plus forte augmentation de la sensibilité de *L. monocytogenes* à l'irradiation. La combinaison carvacrol et nisine a également causé une augmentation significative de la sensibilité de *L. monocytogenes* à l'irradiation.

Les résultats obtenus peuvent être expliqués par le fait que la nisine est connue pour avoir un bon effet antimicrobien contre les bactéries à Gram positif (Takala *et* al, 2011). De nombreuses études ont déjà prouvé que la nisine a un puissant effet antimicrobien contre *L. monocytogenes* (Mohamed *et* al, 2011 ; Helander *et* al, 2000). Plusieurs huiles essentielles telles que le thym, la sarriette des montagnes et le carvacrol ont également démontré des effets antimicrobiens contre *L. monocytogenes* (Pol *et* al, 1999 ; Esteban *et* al, 2011). L'effet synergique observé entre la nisine et les huiles essentielles (carvacrol et sarriettes de montagnes) contre *L. monocytogenes* peut être dû à des mécanismes combinés de l'action des deux agents antimicrobiens.

S. Typhimurium a été inoculée sur les carottes et traitée avec les mêmes huiles essentielles (carvacrol et sarriettes de montagnes) et avec la nisine en combinaison avec l'irradiation. Les valeurs de D_{10} obtenues étaient de 0,39, 0,27, 0,12, 0,12 et 0,16 kGy pour les traitements par le carvacrol, la sarriette des montagnes, la nisine, la nisine et le carvacrol, et le traitement de nisine combiné avec la sarriette des montagnes,

respectivement, comparativement à la valeur D_{10} du contrôle, qui était de 0,29 kGy (Figure 1). On peut observer qu'il n'y avait pas de différence significative (P> 0,05) de la valeur de D_{10} dans les traitements à base de nisine seule ou en combinaison avec le carvacrol (Figure 1).

La sensibilité relative de *S.* Typhimurium aux rayonnements a été augmentée de 2,46, 2,52 et 1,84 fois pour les traitements par la nisine, la nisine combinée au carvacrol et de la nisine combinée à la sarriette des montagnes, respectivement. Cependant, il n'a pas été constaté que l'augmentation de la radiosensibilité aux traitements de carvacrol ou de la sarriette des montagnes seules (Figure 2). Les résultats ont montré que la nisine seule ou en combinaison avec les deux huiles essentielles (carvacrol ou sarriette des montagnes) pourrait réduire la dose requise (faible valeur de D_{10}) pour tuer *S.* Typhimurium sur les mini-carottes.

Il a également été montré que, selon la nature de l'huile essentielle utilisée, les effets antimicrobiens contre les bactéries cibles peuvent être différents. Dans cette étude, la combinaison de la nisine avec du carvacrol a provoqué un important effet antimicrobien (P <0,05) contre *S.* Typhimurium que la combinaison de la nisine avec la sarriette des montagnes. Il est connu que la nisine est moins efficace pour inhiber la croissance des bactéries Gram négatives (Helander et al., 2000). Cependant, il est intéressant de noter qu'en combinant des la nisine avec l'irradiation, la sensibilité de *S.* Typhimurium est augmentée de 2,46 fois par rapport au contrôle.
Dans une autre étude (Turgis *et* al., 2009), Turgis *et* al. ont constaté que certaines huiles essentielles (trans-cinnamaldéhyde, de girofle, de cannelle de Chine), à une concentration finale de 0,5% (p / p) peuvent augmenter la sensibilité de *S.* Typhi à l'irradiation de 4 fois

dans le bœuf haché. Dans cette étude, la sarriette des montagnes (ou sarriette) a également été trouvée pour augmenter la radiosensibilité relative de *S.* Typhi de 2,58 fois. Cependant, dans notre étude, la sarriette des montagnes à une concentration finale de 0,35% (p / p) ne pouvait pas augmenter la radiosensibilité de *S.* Typhimurium par rapport au contrôle.

Cette différence dans les résultats obtenus peut être expliquée par la différence de sérotypes entre *S.* Typhi et *S.* Typhimurium, ou encore par le fait que les matrices alimentaires utilisées dans ces deux études sont différentes (viande hachée et carottes). Cette différence peut aussi s'expliquer quant à la différence entre les concentrations utilisées dans les deux études (0,35 et 0,50%).

Effet des traitements combinés sur la durée de vie des carottes.

À la suite des traitements *in vitro* et *in situ*, il était important de vérifier si l'effet antimicrobien observé dans les deux précédentes expérimentations pouvait se maintenir dans le temps. Les effets des traitements combinés à base d'huiles essentielles, de nisine et d'irradiation gamma sur la durée de conservation des carottes inoculées avec *S.* Typhimurium et *L. monocytogenes* sont présentés dans le Tableau 1 et 2, respectivement.

Aucune réduction de *S.* Typhimurium n'a été observée au cours des 9 jours de traitement sur les carottes non traitées (contrôle), tandis que dans le cas des carottes traitées avec l'irradiation à 0,5 kGy, il y a eu une réduction de 1,52 log au jour 1 par rapport au témoin ($P \leq 0,05$), et ensuite une réduction de plus de 1 log a été observée au jour 6 du traitement. Les carottes traitées par irradiation à 1,0 kGy ont montré une réduction de 1,76 log au jour 1 par rapport au contrôle, et une réduction de 2,91 log au jour 3 par

rapport au jour 1 de ce traitement. La concentration cellulaire a ensuite été augmentée au jour 6 et maintenue à environ 3 log jusqu'à la fin de la période d'entreposage. Ainsi, le traitement par irradiation seule (surtout à 1,0 kGy) a été efficace pour la réduction de *S.* Typhimurium dans les carottes par rapport au témoin.

La combinaison de l'irradiation à 0,5 et à 1 kGy aux huiles essentielles (carvacrol et sarriette des montagnes) et à la nisine était capable de réduire la concentration bactérienne de *S.* Typhimurium. Le traitement avec la nisine seule a permis une réduction de 1 log au jour 1 par rapport au contrôle. Ce traitement a également entraîné une réduction de plus de 1 log au jour 9 par rapport au jour 1. Tandis que le traitement combiné de nisine et d'irradiation à 1 kGy a été très efficace dans la réduction de *S.* Typhimurium. Seulement 1,77 log de *S.* Typhimurium a été détecté au jour 1 et la quantité *S.* Typhimurium était indétectable à partir du 3e jour d'entreposage.

Aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée pour le contrôle par rapport au traitement avec seulement du carvacrol au jour 2 mais on constate plus de 2 log de réduction de la charge microbienne au jour 9 de ce traitement.

Le traitement au carvacrol et par irradiation à 0,5 kGy a augmenté de manière significative la réduction de *S.* Typhimurium, en particulier à partir du 3e jour du traitement. En outre, il peut être observé que les carottes traitées avec la combinaison de carvacrol et d'irradiation à 1 kGy a entraîné une réduction de *S.* Typhimurium de près de 4 log au jour 1 par rapport au contrôle. La concentration cellulaire de ce traitement a été encore diminuée au jour 9, la concentration bactérienne étant sous la limite de détection.

Il n'y avait pas de différence significative ($P > 0,05$) dans la concentration bactérienne au jour 1 dans le traitement contrôle par rapport au traitement de sarriette des montagnes sans irradiation, mais une réduction de plus de 2 log au 9e jour de traitement a été constaté. Le traitement à la sarriette des montagnes combiné à une irradiation 0,5 kGy a entrainé une réduction de moitié de la charge microbienne au jour 1 par rapport au traitement à la sarriette des montagnes sans irradiation. La concentration cellulaire de ce traitement a été encore réduite au 3e jour et était sous la limite de détection au 9e jour.

Le traitement combinant la sarriette des montagnes et l'irradiation à 1,0 kGy a entraîné une réduction de près de 5 log au jour 1, comparativement traitement avec la sarriette des montagnes seulement. La concentration cellulaire de ce traitement a été encore diminuée au 3e jour, puis encore diminuée en dessous de la limite de détection.

Il peut être observé qu'au jour 1, la concentration bactérienne sur les carottes enrobées avec le traitement au carvacrol et à la nisine sans irradiation (0 kGy) a été réduite de plus d'un log par rapport au contrôle. Ce traitement a également provoqué une réduction bactérienne du jour 3 jusqu'à la fin de l'entreposage.

Le traitement combiné de carvacrol, de nisine et d'irradiation à 0,5 kGy a réduit de 2,76 log la concentration bactérienne par rapport au traitement combiné de carvacrol et de nisine sans irradiation. La concentration cellulaire de ce traitement n'a pas augmenté du jour 3 jusqu'à la fin de l'entreposage. Il est intéressant de noter que cette formulation en combinaison avec une irradiation à 1 kGy a causé une diminution de la concentration cellulaire qui était inférieure à la limite de détection pendant le stockage

Le traitement par la sarriette des montagnes et la nisine sans irradiation (0 kGy) a entrainé une réduction de plus de 1 log par rapport au contrôle au jour 1. La concentration a encore diminué du jour 3 au jour 9 avec ce traitement.

Le mélange de nisine et de sarriette des montagnes combiné avec un traitement par irradiation à 0,5 kGy a entraîné une diminution de près de 2 log de *S.* Typhimurium au jour 1 par rapport au même traitement sans irradiation. La concentration cellulaire a par la suite été réduite à un niveau indétectable au jour 9. L'application de la sarriette des montagnes et de nisine combiné avec un traitement par irradiation à 1 kGy a entraîné une réduction de *S.* Typhimurium à un niveau indétectable depuis le jour 1 du traitement.

En comparant tous les traitements utilisés contre *S.* Typhimurium, il peut être constaté que les traitements de carvacrol et de nisine ou de sarriette des montagnes et de nisine combinés à l'irradiation à 1 kGy entrainent une diminution de *S.* Typhimurium à un niveau indétectable pendant la période d'entreposage. Par ailleurs, il est aussi intéressant de constater que le fait d'enrober les carottes par la sarriette des montagnes seule et ensuite de les irradier à 1 kGy peut aussi entrainer une diminution de *S.* Typhimurium jusqu'à un niveau indétectable à partir du 6e jour d'entreposage.

Ainsi, on peut en conclure que la nisine contribue aux effets antimicrobiens contre *S.* Typhimurium en combinaison avec des huiles essentielles (soit carvacrol ou sarriette des montagnes) dans les traitements. En outre, la sarriette des montagnes s'est avérée plus efficace dans l'élimination de *S.* Typhimurium que le carvacrol lorsqu'ils ont été combinés au (avec le) traitement par irradiation à 1 kGy (Tableau 1).

Le résultat pourrait être expliqué par le fait que le carvacrol est seulement une des principales composantes de la sarriette des montagnes (Serrano et al., 2011), et par conséquent il pourrait y avoir des effets additifs entre les différents composants de la sarriette des montagnes, augmentant la sensibilité de *S.* Typhimurium à l'irradiation par rapport au traitement par le carvacrol seul.

Pour *L. monocytogenes* (Tableau 2), dans le contrôle (les carottes non enrobées et sans traitement par irradiation), il n'y avait pas de réduction des comptes bactériens pendant les 6 premiers jours d'entreposage, tandis qu'une réduction d'environ 0,5 log est observée au 9e jour de traitement. Pour les carottes non enrobées et traitées par irradiation à 0,5 kGy, on constate une réduction de 1,64 log au jour 1 et une réduction de 2,7 log au jour 3 par rapport au témoin ($P \leq 0,05$).

Dans le cas des carottes non enrobées et traitées par irradiation à 1,0 kGy, on observe une réduction d'environ 2 log au jour 1 par rapport au contrôle, la quantité bactérienne a été réduite de 2,56 log au jour 3 par rapport au jour 1. La quantité bactérienne a ensuite été augmentée au jour 6 et maintenue à environ 5 log jusqu'à la fin de la période d'entreposage. Ainsi, le traitement par irradiation seule (surtout à 1,0 kGy) a été efficace pour la réduction de *L. monocytogenes* dans les carottes enrobées par rapport aux carottes non enrobées. Ce même traitement est moins efficace contre *L. monocytogenes*. La concentration cellulaire sur les carottes enrobées de nisine et sans traitement par irradiation a été réduite de moins de 1 log par rapport au contrôle au jour 1. Ce traitement a également entraîné une réduction de 3,56 log au jour 6 et une réduction en dessous du seuil de détection au jour 9 par rapport au jour 1 du même traitement.

Le traitement combiné de nisine et d'irradiation à 1 kGy a été efficace dans la réduction de *L. monocytogenes* de 4,13 à 2,91 log du jour 1 au jour 3, respectivement. De plus, les quantités de *L. monocytogenes* ont été à un niveau indétectable au jour 6. Il n'y avait pas de différence significative ($P > 0,05$) de la concentration cellulaire dans le contrôle et dans les carottes recouvertes avec du carvacrol et sans traitement par irradiation au jour 1. D'ailleurs, dans ce traitement, les comptes bactériens n'ont pas été réduits au jour 3, jour 6 ($P > 0,05$), sauf au jour 9 de l'ordre de 0,8 log de réduction ($P \leq 0,05$).

On peut observer que les carottes recouvertes par le carvacrol et irradiées à 0,5 kGy montrent une réduction d'environ 1,53 log en comparaison au même traitement sans irradiation au jour 1. La concentration cellulaire de ce traitement a été augmentée de moins de 1 log au cours de l'entreposage. Dans le cas du traitement au carvacrol et irradié à 1 kGy, il y a eu une réduction de 2 log de la numération bactérienne au jour 1 et la concentration bactérienne est restée inchangée ($P > 0,05$) jusqu'à la fin de l'entreposage.

Il n'y avait pas de différence significative ($P > 0,05$) de la concentration bactérienne au jour 1 dans le contrôle par rapport au traitement par la sarriette des montagnes sans traitement par irradiation. De plus, ce traitement n'a pas réduit le nombre de bactéries au cours de l'entreposage. Il y avait une réduction de 0,76 et de 2,15 log au jour 1 dans les échantillons enrobés avec de la sarriette des montagnes et irradiés à 0,5 et 1,0 kGy, respectivement. Ces traitements combinés (sarriette des montagnes et irradiation à 0,5 kGy ou sarriette des montagnes et irradiation à 1,0 kGy) n'ont pas entraîné de réduction bactérienne pendant l'entreposage.

Dans le cas du traitement au carvacrol et à la nisine sans irradiation, on constate une réduction de 1 log par rapport au contrôle (carottes non enrobées et non irradiées). On peut également constater une diminution de la concentration du jour 3 au jour 9.

En revanche, le traitement au carvacrol et à la nisine irradié à 0,5 kGy montre une réduction de 1,95 log par rapport aux carottes traitées avec le mélange carvacrol-nisine. À partir du 6e jour, on voit une réduction de 2 logs, tandis qu'au 9e jour la concentration descend en dessous de la limite détectable.

Il est intéressant de noter que cette formulation (carvacrol-nisine), lorsque combinée avec l'irradiation à 1 kGy, cause une diminution de la concentration cellulaire de plus de 3 log au jour 1 par rapport au traitement non irradié. Avec ce traitement, la concentration cellulaire été réduite de 0.6 log au jour 3, tandis qu'au jour 9 la concentration descend en dessous de la limite de détection. Dans le cas des carottes traitées par la formulation sarriette des montagnes-nisine et non irradiées (0 kGy), la concentration bactérienne a été réduite de plus de 1 log au jour 1 par rapport au contrôle (non enrobé et non irradié). Lorsque les carottes enrobées avec une formulation sarriette des montagnes plus nisine est irradié à 0,5 kGy, on peut observer une diminution de plus de 1 log de *L. monocytogenes* au jour 1 par rapport au traitement avec la sarriette des montagnes et la nisine sans irradiation. Les carottes enrobées avec une formulation de sarriette des montagnes plus nisine irradiées à 1 kGy entraîne une réduction de *L. monocytogenes* de plus de 3 log au jour 1 par rapport au traitement avec la sarriette des montagnes et la nisine sans irradiation, la diminution continue au jour 3 et jour 6 et descend en dessous du niveau détectable au jour 9.

En comparant tous les traitements utilisés contre *L. monocytogenes* inoculés sur carottes, il peut être constaté que le traitement de carottes par le mélange carvacrol-nisine ou par le mélange sarriette des montagnes-nisine, suivis par une irradiation à 1 kGy réduit *L. monocytogenes* de plus de 3 log au jour 1. On constate aussi que les concentrations bactériennes dans ces traitements étaient encore diminuées jusqu'à un niveau indétectable au jour 6. Ainsi, on peut en conclure que la nisine contribue aux effets antimicrobiens contre *L. monocytogenes* en combinaison avec des huiles essentielles (soit carvacrol ou sarriette de montagne) et un traitement d'irradiation à faible dose (1 kGy). Il peut être également observé que la combinaison de formulations contenant du carvacrol et de la nisine ou de la sarriette des montagnes et de la nisine avec l'irradiation à 1 kGy a de meilleurs effets antimicrobiens contre *S.* Typhimurium que *L. monocytogenes* durant un entreposage de pour 9 jours sur des mini-carottes. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que *L. monocytogenes* est plus résistant aux conditions environnementales que *S.* Typhimurium (Farber et al., 1991). *L. monocytogenes* peut se développer sur une large plage de température (entre 1 et 45° C).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les huiles essentielles et la nisine sont des composés naturels avec des demi-vies assez courtes. En effet, au bout d'un certain temps, ces composés peuvent se dégrader ou se dénaturer et ainsi perdre leur capacité antimicrobienne. Le fait d'exposer ces composés à d'autres produits entrant dans la composition de l'aliment à tester peut aussi entrer en ligne de compte. Le fait que les bactéries sont dans un milieu riche en nutriment les rend plus résistantes à l'effet des huiles essentielles et de la bactériocine. Il a été démontré que plusieurs facteurs tels que le pH, le taux d'oxygène ou encore la température de stockage peuvent avoir des

conséquences sur la résistance des bactéries aux traitements aux huiles essentielles et aux bactériocines. Plusieurs autres études ont déjà démontré que l'effet des huiles essentielles testées *in vitro* est meilleur en comparaison à l'effet *in situ*. Ce fait dépend de la nature de l'aliment testé et aussi de la résistance des bactéries à tester. En effet, il est connu que les bactéries Gram positives sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram négatives (Burt, 2004; Barbosa *et al.*, 2009). La bactériocine quant à elle peut être influencée par la composition de la flore résidente et de la concentration. En effet, la présence de microorganismes pouvant produire des protéases représente une menace pour les bactériocines, qui pourraient être dégradées par les protéases.

Conclusion

La contamination alimentaire représente un problème de plus en plus grandissant. À ce jour, les contaminants alimentaires bactériens les plus redoutés sont des bactéries telles que *Listeria monocytogenes, E. coli, Salmonella, Campylobacter jejuni.* Plusieurs techniques sont utilisées pour lutter contre la contamination des aliments par les bactéries. Une des techniques utilisées pour éliminer les bactéries des aliments est l'irradiation.

L'irradiation est une méthode de décontamination et de conservation des aliments qui consiste à soumettre un corps à des rayonnements ionisants, ce qui a pour conséquence de stopper le métabolisme de la bactérie et par la suite d'entrainer sa mort. Combiner l'irradiation avec d'autres traitements est une bonne alternative permettant d'utiliser de faibles doses d'irradiation et d'éviter ainsi tous les problèmes. Les huiles essentielles (HEs) contiennent de nombreux composés biologiquement actifs et sont connues pour

posséder des activités antimicrobiennes. Les bactériocines sont aussi très attrayantes pour l'industrie alimentaire. Il a été démontré que l'utilisation de bactériocines telles que la nisine et la pédiocine peut entrainer une élimination de *Listeria monocytogenes* de divers aliments.

Ce travail a consisté à utiliser des composés naturels tels que les huiles essentielles et la nisine dans le but de réduire les doses nécessaires à éliminer deux bactéries pathogènes. Les bactéries pathogènes qui ont été utilisées dans cette étude sont *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium. Les huiles essentielles qui ont été choisies pour cette étude sont la sarriette des montagnes et le carvacrol. Plusieurs études ont déjà démontré l'effet de la radiosesnsibilisation de certaines huiles essentielles et de la nisine. Étant donné l'efficacité de chacun de ces produits dans la radiosensibilisation, il était important de vérifier quel pourrait être l'effet de la combinaison de ces composés naturels sur la sensibilisation aux rayonnements gamma de certaines bactéries. Il a été déterminé que le fait d'appliquer une combinaison d'huile essentielle et de nisine en prétraitement au traitement d'irradiation avait pour effet de diminuer la sensibilité des bactéries *L. monocytogenes* et *S.* Typhimurium à l'irradiation. Les expériences ont été effectuées en milieu liquide (*in vitro*) et sur un aliment (*in situ*) dans le temps. Les résultats nous démontrent que la combinaison d'huiles essentielles et de nisine a un effet de radiosensibilisation. En effet, le fait d'exposer les bactéries aux mélanges huiles essentielles et nisine entrainait une rendiosensibilisation des bactéries.

Bibliographie

Association nucléaire canadienne. Canada. (2010).

Agence canadienne d'inspection des aliments, 2012

Allerberger, F. and M. Wagner, Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clinical Microbiology and Infection, 2010. 16(1): p. 16-23.

Barbosa, L. N., V. L. Rall, et al. (2009). "Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat." Foodborne Pathog Dis 6(6): 725-728.

Berger, C. N., S. V. Sodha, et al. (2010). "Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens." Environmental Microbiology 12(9): 2385-2397.

Bhide, M. R., A. M. Paturkar, et al. (2001). "Presensitization of microorganisms by acid treatments to low dose gamma irradiation with special reference to *Bacillus cereus*." Meat Science 58(3): 253-258.

Blanco-Galvez, J., P. Fernandez-Ibanez, et al. (2007). "Solar photocatalytic detoxification and disinfection of water: Recent overview." Journal of Solar Energy Engineering-Transactions of the Asme 129(1): 4-15.

Borsa, J., M. Lacroix, et al. (2004). "Radiosensitization: enhancing the radiation inactivation of foodborne bacteria." Radiation Physics and Chemistry 71(1-2): 137-141.

Boyle, W. (1955). "Spices and essential oils as preservatives." The American Perfumer and Essential Oil 66: 25-28.

Buchbauer, G. (2009). Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Taylor & Francis.

Burt, S. A. and R. D. Reinders (2003). "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157 : H7." Letters in Applied Microbiology 36(3): 162-167.

Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review." International Journal of Food Microbiology 94(3): 223-253.

Caillet, S., M. Millette, et al. (2008). "Effect of gamma radiation on heat shock protein expression of four foodborne pathogens." Journal of Applied Microbiology 105(5): 1384-1391.

Caillet, S., M. Millette, et al. (2006). "Influence of antimicrobial compounds and modified atmosphere packaging on radiation sensitivity of Listeria monocytogenes present in ready-to-use carrots (Daucus carota)." Journal of Food Protection 69(1): 221-227.

Caillet, S., F. Shareck, et al. (2005). "Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157 : H7." Journal of Food Protection 68(12): 2571-2579.

Carraminana, J. J., C. Rota, et al. (2008). "Antibacterial efficiency of Spanish Satureja montana essential oil against Listeria monocytogenes among natural flora in minced pork." Journal of Food Protection 71(3): 502-508.

Chiasson, F., J. Borsa, et al. (2004). "Radiosensitization of Escherichia coli and *Salmonella* Typhi in ground beef." Journal of Food Protection 67(6): 1157-1162.

Clavero, M. R., J. D. Monk, et al. (1994). "Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonellae*, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation." Appl Environ Microbiol 60(6): 2069-2075.

Corbo, M. R., A. Bevilacqua, et al. (2009). "Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches - a review." International Journal of Food Science & Technology 44(2): 223-241.

Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, et al. (1999). "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils." Letters in Applied Microbiology 29(2): 130-135.

Cotter, P. D., C. Hill, et al. (2005). "Bacteriocins: developing innate immunity for food." Nat Rev Microbiol 3(10): 777-788.

Delves-Broughton, J., Nisin as a food preservative. Food Australia, 2005. 57(12): p. 525-527.

Dion, P., R. Charbonneau, et al. (1994). "Effect of ionizing dose rate on the radioresistance of some food pathogenic bacteria." Canadian Journal of Microbiology 40(5): 369-374.

Djamel Drider, H. P., Ed. (2009). Bactéries Lactiques physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. Paris.

Dortu, C., Thonart, P. (2009). "Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires." Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 13(1): 143-154.

Drider, D., G. Fimland, et al. (2006). "The continuing story of class IIa bacteriocins." Microbiol Mol Biol Rev 70(2): 564-582.

Esteban, M. D. and A. Palop (2011). "Nisin, Carvacrol and Their Combinations Against the Growth of Heat-Treated *Listeria monocytogenes* Cells." Food Technology and Biotechnology 49(1): 89-95.

Farkas, J. (1998). "Irradiation as a method for decontaminating food - A review." International Journal of Food Microbiology 44(3): 189-204.

Farkas, J. (2001). "Food microbiology and its prospects at the turn of the millennium." Acta Alimentaria 30(2): 123-126.

Farkas, J. and C. Mohácsi-Farkas, History and future of food irradiation. Trends in Food Science & Technology, 2011. 22(2-3): p. 121-126.

Federighi, M. and J. L. Tholozan (2001). Traitements ionisants et hautes pressions des aliments, Polytechnica.

Francis, G.A., C. Thomas, and D. O'Beirne, The microbiological safety of minimally processed vegetables. International Journal of Food Science and Technology, 1999. 34(1): p. 1-22.

Franz, C. M., M. J. van Belkum, et al. (2007). "Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme." FEMS Microbiol Rev 31(3): 293-310.

Friedman, M., P. R. Henika, et al. (2002). "Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*." Journal of Food Protection 65(10): 1545-1560.

Ghalfi, H., et al., Effectiveness of cell-adsorbed bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and selected essential oils to control *Listeria monocytogenes* in pork meat during cold storage. Letters in Applied Microbiology, 2007. 44(3): p. 268-273.

Giroux, M. and M. Lacroix (1998). "Nutritional adequacy of irradiated meat - a review." Food Research International 31(4): 257-264.

Guenther, E. (1948). "The essential oil." Van Nostrand Conpany Inc 1.

Heaton, J. C. and K. Jones (2008). "Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review." Journal of Applied Microbiology 104(3): 613-626.

Helander, I. M. and T. Mattila-Sandholm (2000). "Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin." International Journal of Food Microbiology 60(2-3): 153-161.

Jeantet, R. (2006). Science des aliments: biochimie, microbiologie, procédés, produits, Ed. Tec & Doc.

Juliano, C., A. Mattana, et al. (2000). "Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of Thymus herba-barona Loisel growing wild in Sardinia." Journal of Essential Oil Research 12(4): 516-522.

Kaferstein, F. and M. Abdussalam, Food safety in the 21st century. Bulletin of the World Health Organization, 1999. 77(4): p. 347-351.

Kimberly Schaub. *Carrots and food poisoning.* http://www.livestrong.com . 2010;

Kleerebezem, M. (2004). "Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis." Peptides 25(9): 1405-1414.

Krtinić, G., P. Đurić, and S. Ilić, *Salmonellae* in food stuffs of plant origin and their implications on human health. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2010. 29(11): p. 1321-1325.

Kornacki, J.L., Controlling *Listeria* in the food processing environment. Food Technology, 2005. 59(11): p. 36-+.

Lalande, M., G. Guyon, et al. (2005). "Les infections à salmonelles chez l'enfant : étude retrospective sur quatre ans." Archives de Pédiatrie 12(1): 23-27.

Marino, M., C. Bersani, et al. (2001). "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*." International Journal of Food Microbiology 67(3): 187-195.

Mead, P. S., L. Slutsker, et al. (2000). "Food-related illness and death in the United States (Reprinted from Emerging Infectious Diseases)." Journal of Environmental Health 62(7): 9-18.

Millette, M., C. Dupont, et al. (2007). "Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococccus acidilactici* isolates." Journal of Applied Microbiology 102(1): 274-282.

Millette, M., F. M. Luquet, et al. (2007). "In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk." Letters in Applied Microbiology 44(3): 314-319.

Ministry of agriculture, f. a. r. a. (2001). Carrot Risk Assessment Introduction and Summary. O. F. I. Branch.

Mohamed, H. M. H., F. A. Elnawawi, et al. (2011). "Nisin Treatment To Enhance the Efficacy of Gamma Radiation against *Listeria monocytogenes* on Meat." Journal of Food Protection 74(2): 193-199.

M.R. Pajohi, H. T. (2011). "synergistic antibacterial activity of the essentia oil of cuminum cyminum L. seed and nisin in a food model." Journal of Applied Microbiology.

Muñoz, P., L. Rojas, et al. (2012). "Listeriosis: An emerging public health problem especially among the elderly." Journal of Infection 64(1): 19-33.

Nevas, M., A. R. Korhonen, et al. (2004). "Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria." Journal of Food Protection 67(1): 199-202.

Nicolle C, Cardinault N, Aprikian O *et al.* Effect of carrot intake on cholesterol metabolism and on antioxidant status in cholesterol-fed rat. Eur J Nutr. 2003;42:254-261.

Niemira, B. A., X. Fan, et al. (2003). "Ionizing radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* ATCC 49594 and *Listeria innocua* ATCC 51742 inoculated on endive (Cichorium endiva)." J Food Prot 66(6): 993-998.

Nyberg F, Agrenius V, Svartengren K *et al*. Dietary factors and risk of lung cancer in never-smokers. Int J Cancer. 1998;78:430-436

Osaili, T. M., R. R. Shaker, et al. (2007). "Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula by gamma irradiation: Determination of D(10)-value." Journal of Food Science 72(3): M85-M88.

Oussalah, M., S. Caillet, et al. (2006). "Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes*." Journal of Food Protection 69(5): 1046-1055.

Oussalah, M., S. Caillet, et al. (2007). "Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*." Food Control 18(5): 414-420.

Pajohi, M. R., H. Tajik, et al. (2011). "Synergistic antibacterial activity of the essential oil of Cuminum cyminum L. seed and nisin in a food model." Journal of Applied Microbiology: no-no.

Pol, I. E. and E. J. Smid (1999). "Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*." Letters in Applied Microbiology 29(3): 166-170.

Salgueiro, L. R., R. Vila, et al. (1997). "Variability of essential oils of Thymus caespititius from Portugal." Phytochemistry 45(2): 307-311.

Santé Canada. *Fichier canadien sur les éléments nutritifs* 2010. www.hc-sc.gc.ca.

Serrano, C., O. Matos, et al. (2011). "Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts." Journal of the Science of Food and Agriculture 91(9): 1554-1560.

Smid, I. E. P. a. E. J. (1999). "combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*." Letters in Applied Microbiology.

Smith-Palmer, A., J. Stewart, et al. (1998). "Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens." Letters in Applied Microbiology 26(2): 118-122.

Takala, P. N., K. D. Vu, et al. (2011). "Effect of Antimicrobial Coatings on the Radiosensitization of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in Fresh Broccoli." Journal of Food Protection 74(7): 1065-1069.

Tauxe, R. V. (2001). "Food safety and irradiation: Protecting the public from foodborne infections." Emerging Infectious Diseases 7(3): 516-521.

Turgis, M., J. Borsa, et al. (2008). "Effect of selected plant essential oils or their constituents and modified atmosphere packaging on the radiosensitivity of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella* Typhi in ground beef." Journal of Food Protection 71(3): 516-521.

Turgis, M., J. Han, et al. (2008). "Combined effect of natural essential oils, modified atmosphere packaging, and gamma radiation on the microbial growth on ground beef." Journal of Food Protection 71(6): 1237-1243.

Turgis, M., J. Han, et al. (2009). "Effect of selected antimicrobial compounds on the radiosensitization of *SalmonellaTyphi* in ground beef." Letters in Applied Microbiology.

Turgis, M., et al., Effect of selected antimicrobial compounds on the radiosensitization of *Salmonella* Typhi in ground beef. Letters in Applied Microbiology, 2009. 48(6): p. 657-662

Wijaya, A., C. Neudeker, et al. (2006). "Influence of bacteriocin-producing Enterococcus faecalis BFE 1071 on *Lactobacillus spp.* in the rat gastrointestinal tract." Proceedings of Food Micro 124.

Xu, J., F. Zhou, et al. (2008). "The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*." Letters in Applied Microbiology 47(3): 174-179.