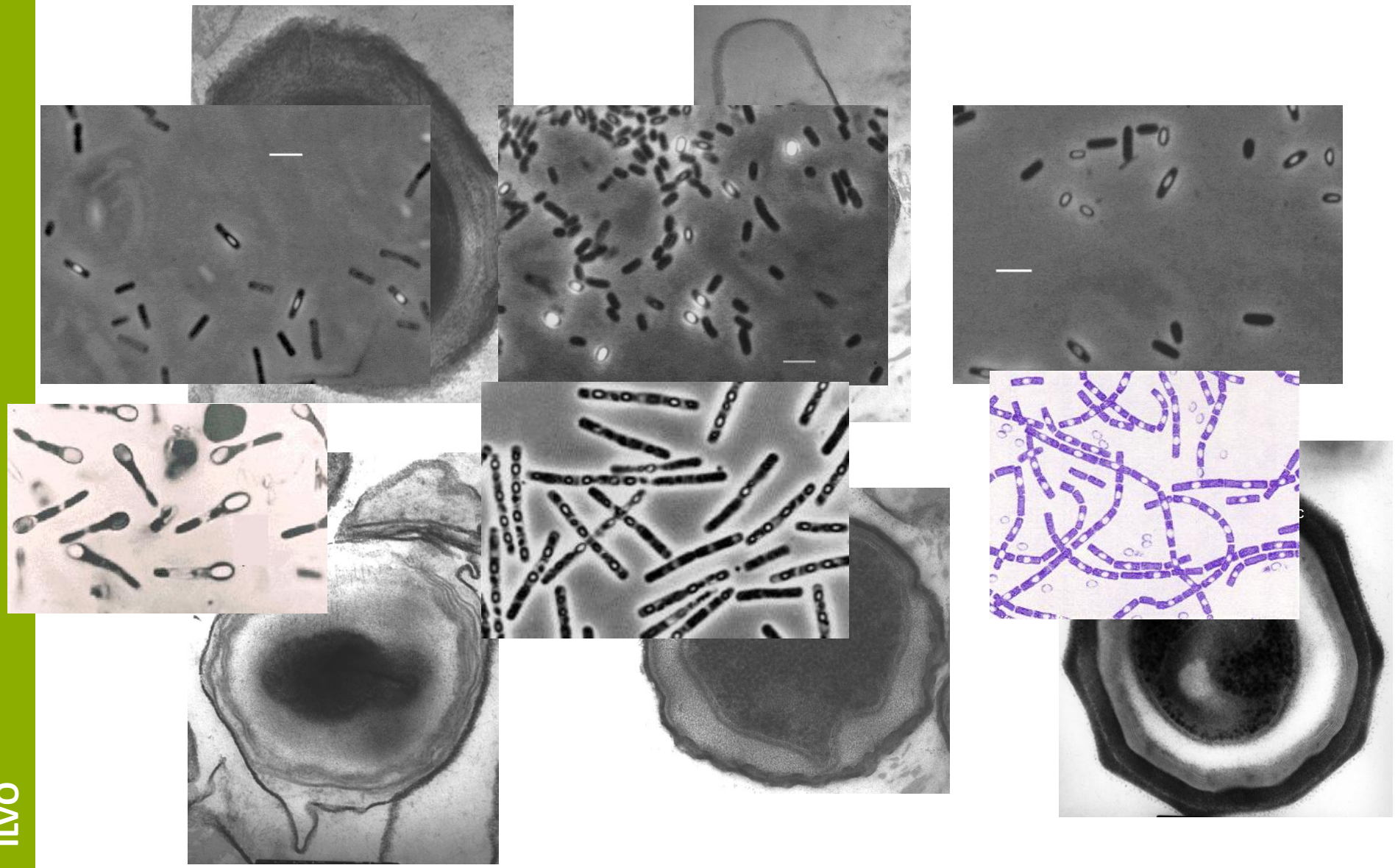
Sporen: wanneer ontkiemt het slapende gevaar?

Marc Heyndrickx

STUDIEREEKS MICRO-ORGANISMEN: PART 2 - THE BAD
16 mei 2017
Antwerpen

ILVO
Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek

Sporen en sporenvormers



ILVO

Flanders' Food projecten

- **'Verlenging van de microbiologische houdbaarheid':** partim Psychrotrofe pathogene sporenvormers; 2006-2009
- Invloed van de combinatie van milde verhitting en andere levensmiddeleigen conserveringsparameters op het gedrag van psychrotrofe, sporenvormende bederfveroorzakende bacteriën in levensmiddelen (**Mildheat):** 2009-2011
- **UGent-**Laboratorium voor Levensmiddelenmicrobiologie en –conservering (Prof. Frank Devlieghere) & **ILVO**-Technologie & Voeding (Prof. Marc Heyndrickx)
  - **Dr. Simbarashe Samapundo en Rhamize Xhaferi**

ILVO

Theorie & mechanismen

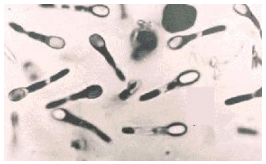
ILVO

Sporenvormers

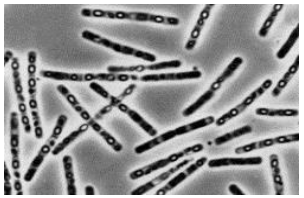
- Grampositieve bacteriën:
  - Bacillen en verwanten: aeroob of facultatief anaeroob
  - Clostridia: strikt anaeroob

  } sporen = overlevings-structuur

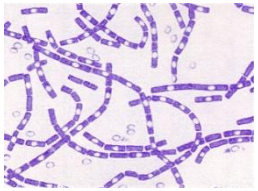
Vegetatieve cellen en sporen



Clostridium difficile

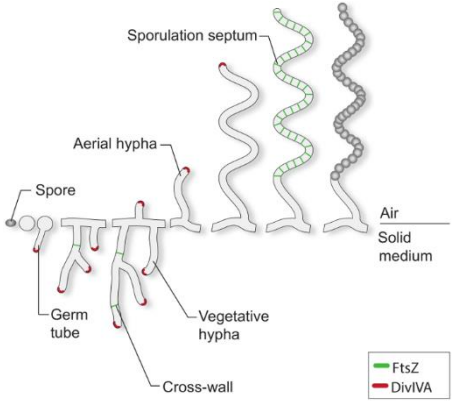


Bacillus thuringiensis (1000x)



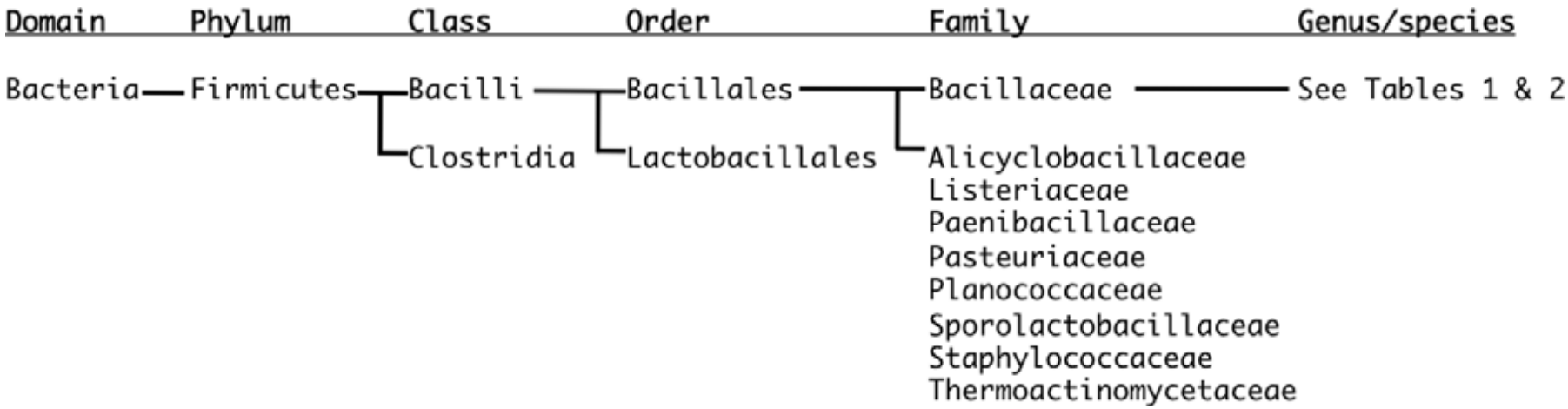
Bacillus anthracis (1500x)

  - Streptomyceten: sporen = voortplantingsstructuur



- Schimmels: sporen = voortplantingsstructuur

ILVO



Bacillaceae:

- zeer oude familie, wrschl. 2 miljard jaar oud
- Enorme fenotypische diversiteit
- Aanwezig in nagenoeg elk ecosysteem op Aarde
  - Menselijke darm: gedomineerd door Firmicutes waaronder sporenvormers (bacilli en clostridia)
- Meeste *Bacillus* species in grond aan te treffen

Fajardo-Cavazos P, Maughan H, Nicholson WL. 2014. Evolution in the Bacillaceae. Microbiol Spectrum 2(5):TBS-0020-2014.

ILVO

Taxonomie bacteriële sporenvormers (tot 2014)

- Oude genus ***Bacillus*** (Cohn, 1872) opgesplitst sinds 1990
  - *Bacillus* + 13 nieuwe afgesplitste genera beschreven
  - > 400 species
    - ± 215 *Bacillus* species
- 42 nieuwe genera beschreven voor aerobe sporenvormende species die nooit tot *Bacillus* hebben behoord
  - *Sporosarcina* (1936)
  - *Sporolactobacillus* (1963)
  - Sinds 1990: 41 nieuwe genera met 174 species

↓

Totaal: 56 genera aerobe sporenvormers met > 574 species geklasseerd in 7 families

- ***Clostridium*** = Grampositieve anaerobe sporenvomers
  - In 1994: opsplitsing in 5 nieuwe genera + *Clostridium*
    - *Oxobacter, Oxalophagus, Caloramator, Filifactor, Moorella*
    - *Thermoanaerobacterium*
  - *Clostridium*: >200 species

ILVO

Nieuw species uit Antarctica

International Journal of Systematic and Evolutionary

Applied and Environmental Microbiology, June 2004, p. 3664–3672 Vol. 70, No. 6
0099-2240/04/$08.00+0 DOI: 10.1128/AEM.70.6.3664–3672.2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Aerobic enc geothermal Land, Antar Sandwich a *Bacillus fun*

N. A. Logan,[1] L. Lebbe. B. Hoste. J. Goris. G. Forsyth. M. Heyndrickx.
B. L. Murray,[1]

Character	1
Growth temperature (°C)	
Maximum	55
Optimum	50
Minimum	25–30
pH range	4·0–6·5
Optimum pH	5·5
Motility	+
Spore shape	E/C
Spore position	C/ST
Sporangia swollen	–
Anaerobic growth	–
Nitrate reduction	–
Gelatin hydrolysis	+
Casein hydrolysis	–
G+C mol% of type strain	40·7

Isolation, Characterization, and Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts

E. De Clerck,* T. Vanhoutte, T. Hebb, J. Geerinck, J. Devos, and P. De Vos

Laboratory of Microbiology, Department of Biochemistry, Physiology and Microbiology, Ghent University, Ghent, Belgium

Strain no. (other designation)[b]	Sequence length (bp)	Accession no.	Best match	Similarity (%)
R-13433	454	AJ586379	*Staphylococcus epidermidis* (AE016751)	100
R-13435	474	AJ586336	*Bacillus pumilus* (AF288735)	100
R-13476[a]	1,508	AJ586337	*Bacillus gelatini*	100
R-13500	477	AJ586338	*Bacillus cereus* (AF176322)	100
			Bacillus thuringiensis (AF155955)	100
			Bacillus anthracis (AF176321)	100
R-13574	489	AJ586339	*Bacillus cereus* (AF176322)	99.8
			Bacillus athracis (AF176321)	99.8
			Bacillus thuringiensis (AF155955)	99.8
R-13577	1,511	AJ586340	*Bacillus licheniformis* (AB039328)	99.9
R-13585	1,512	AJ586341	*Bacillus licheniformis* (AB039328)	99.9
R-13589	1,492	AJ586380	*Brevibacillus agri* (AB039334)	99.9
R-13591[a]	450	AJ586342	*Bacillus gelatini*	100
R-13595	1,515	AJ581124	*Bacillus fumarioli* (AJ250059)	99.9
R-13605	482	AJ586343	*Bacillus cereus* (AF176322)	99.8
			Bacillus anthracis (AF176321)	99.8
			Bacillus thuringiensis (AF155955)	99.8
R-13614	482	AJ586344	*Bacillus cereus* (AF176322)	99.8
			Bacillus anthracis (AF176321)	99.8
			Bacillus thuringiensis (AF155955)	99.8
R-13623	480	AJ586345	*Bacillus fumarioli* (AJ250058)	99.8
R-13624	1,513	AJ587725	*Bacillus fumarioli* (AJ250058)	99.8
R-13646	1,505	AJ586346	*Bacillus licheniformis* (AF276309)	100
R-13822[a]	1,508	AJ586347	*Bacillus gelatini*	100
R-13975[a]	467	AJ586348	*Bacillus gelatini*	100
R-14705	1,514	AJ581126	*Bacillus fumarioli* (AJ250059)	99.9
R-14711	451	AJ586349	*Bacillus fumarioli* (AJ250058)	99.8
R-16112	486	AJ586350	*Bacillus fumarioli* (AJ250058)	99.6
R-16116	475	AJ586351	*Enterobacter sakazakii* (AB004746)	99.9
R-16197	322	AJ586352	*Bacillus licheniformis* (AB055006)	99.7
R-16222[a] (LMG 21881[T])	1,541	AJ551330	*Anoxybacillus contaminans*	100
R-16223[a]	480	AJ586381	*Anoxybacillus contaminans*	100
R-16228	476	AJ586353	*Staphylococcus hominis* (AY030318)	100
R-16362 (LMG 21801)	484	AJ563374	*Bacillus coagulans* (D16267)	99.6
R-16402	1,499	AJ586382	*Brevibacillus borstelensis* (AF378230)	100
R-16404	484	AJ586354	*Bacillus fumarioli* (AJ250058)	99.6
R-16427	438	AJ586355	*Bacillus fumarioli* (AJ250058)	100

ILVO

Bacteriële sporenvormers

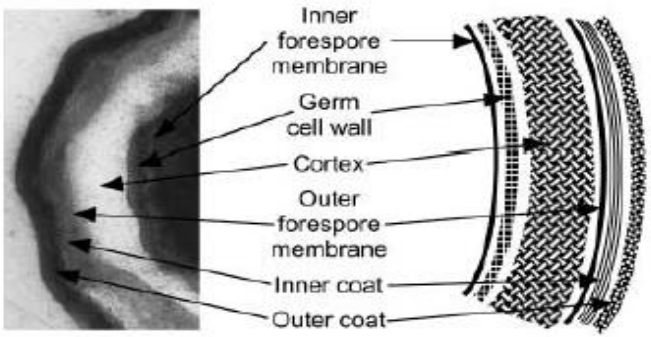
- **Endospore** wordt gevormd in de vegetatieve cel gedurende sporulatieproces
- Start gewoonlijk bij kiemaantal >10^6 cfu/ml
- Rijpe spore wordt vrijgesteld uit vegetatieve moedercel (celdood)
- Overlevingsstrategie voor ongunstige omgevingsomstandigheden
  - Resistent voor pasteurisatie = **thermotolerante of hitteresistente sporen**:
    - Hitteresistentie uitgedrukt als **decimale reductietijd D** bij bepaalde temperatuur
  - Resistent tegen bestraling, chemische solventen, detergenten, dessicatie, extreme pH

- Ontkieming tot vegetatieve cel wanneer terug “gunstige” omgevingsomstandigheden:

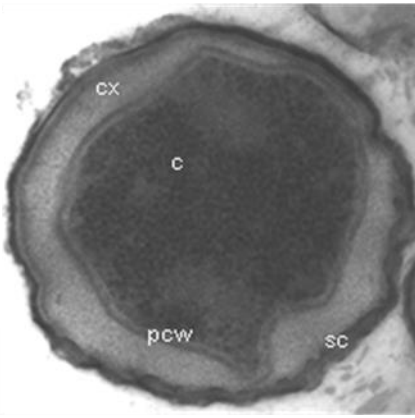
ILVO

Structuur van een bacteriële spore

- kern
  - DNA + SASPs
  - laag watergehalte
  - Hoge mineralisatie
- cortex
  - peptidoglycaan
  - spore specifieke structuur
  - Lage cross-linking
- mantel
  - twee lagen
  - complexe samenstelling, vooral polypeptiden
  - barrière
- Soms exosporium en aanhangsels

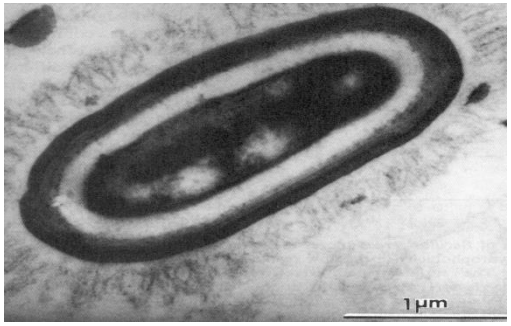


source: Popham (2002) Cell Mol Life Sci 59, 426-433

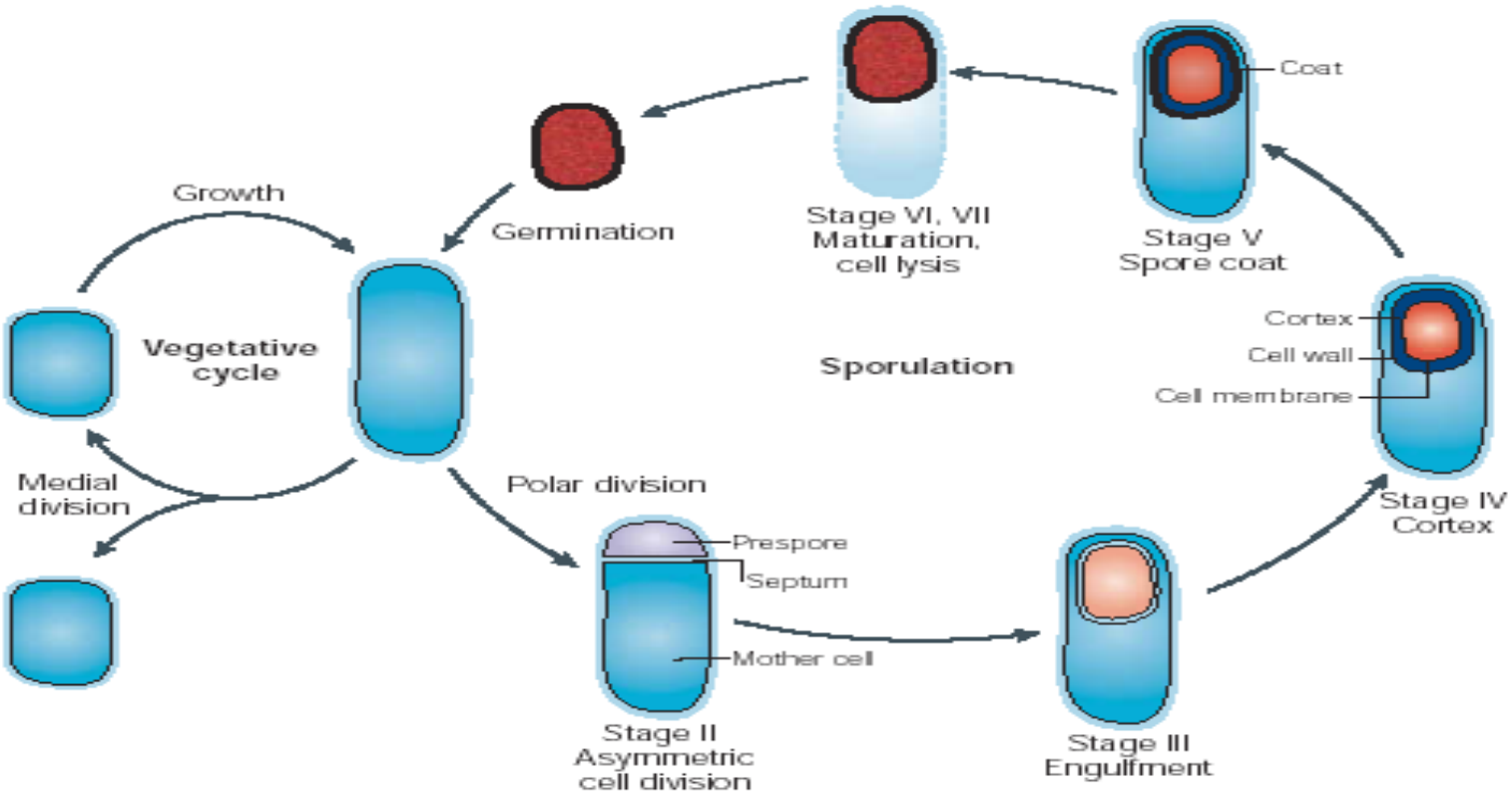


Electron microscopic image of a *B. cereus* spore (146 000 x) C, spore core; cx, spore cortex; pcw, primordial cell wall; sc, spore coat (Scheldeman et al. 2006)

B. licheniformis

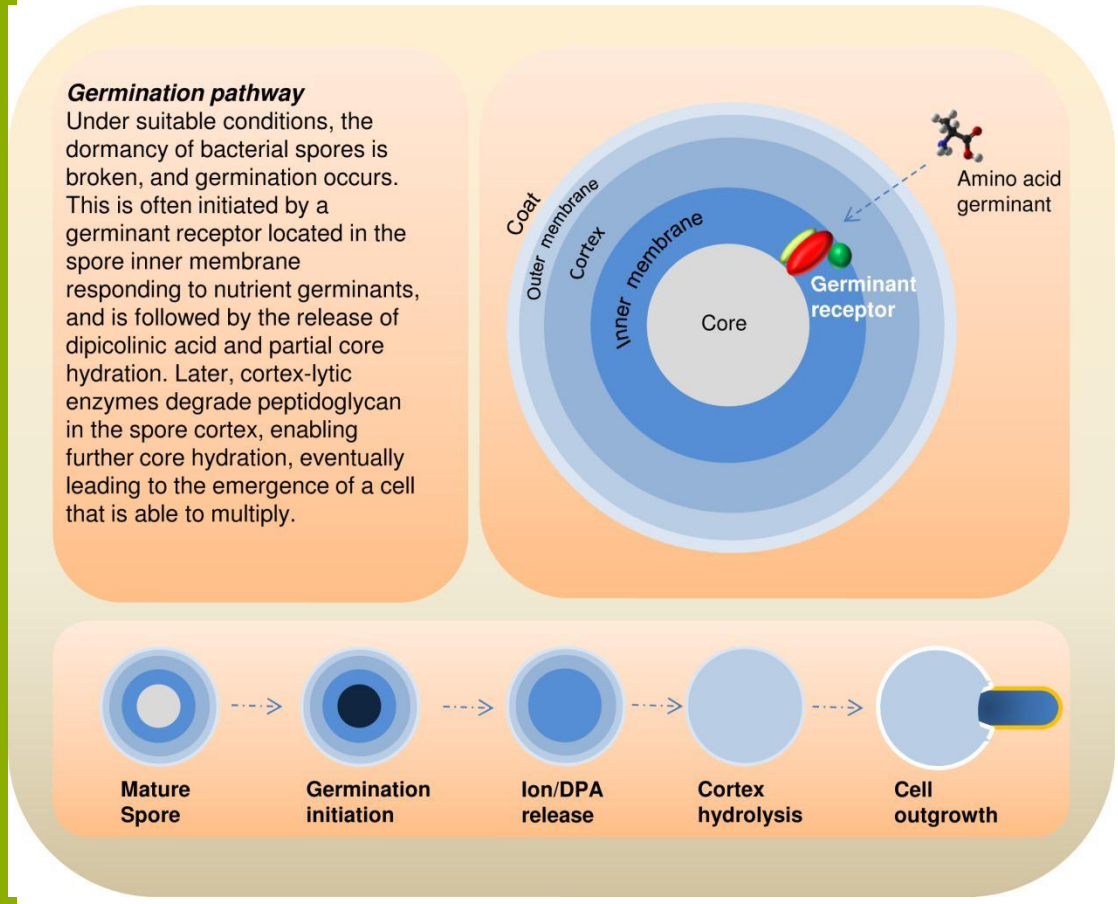


Levenscyclus bacteriële sporenvormers



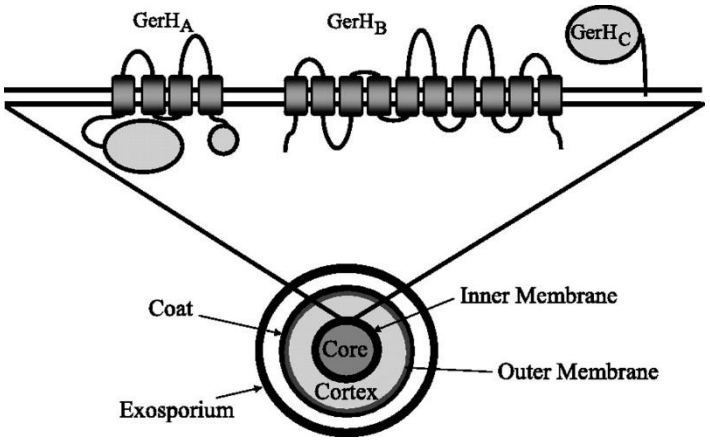
source: Errington (2003) Nature Rev Microbiol 1,117-126

Ontkiemingsapparaat: Germinosoom



Brunt J. et al (2014) PLOS Pathogens

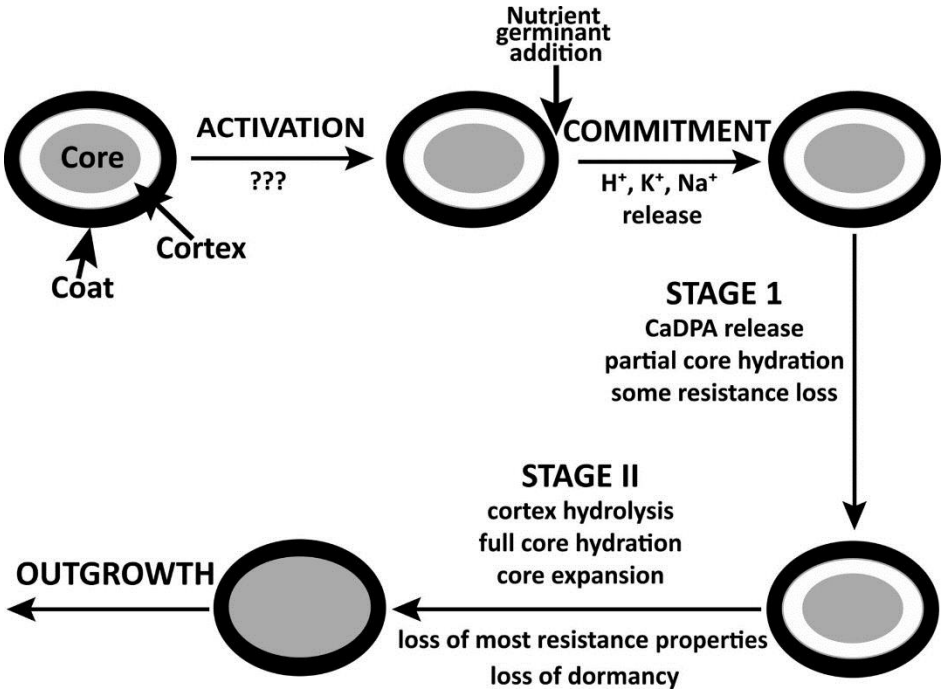
"Germinant receptors"
ontkiemingsreceptoren



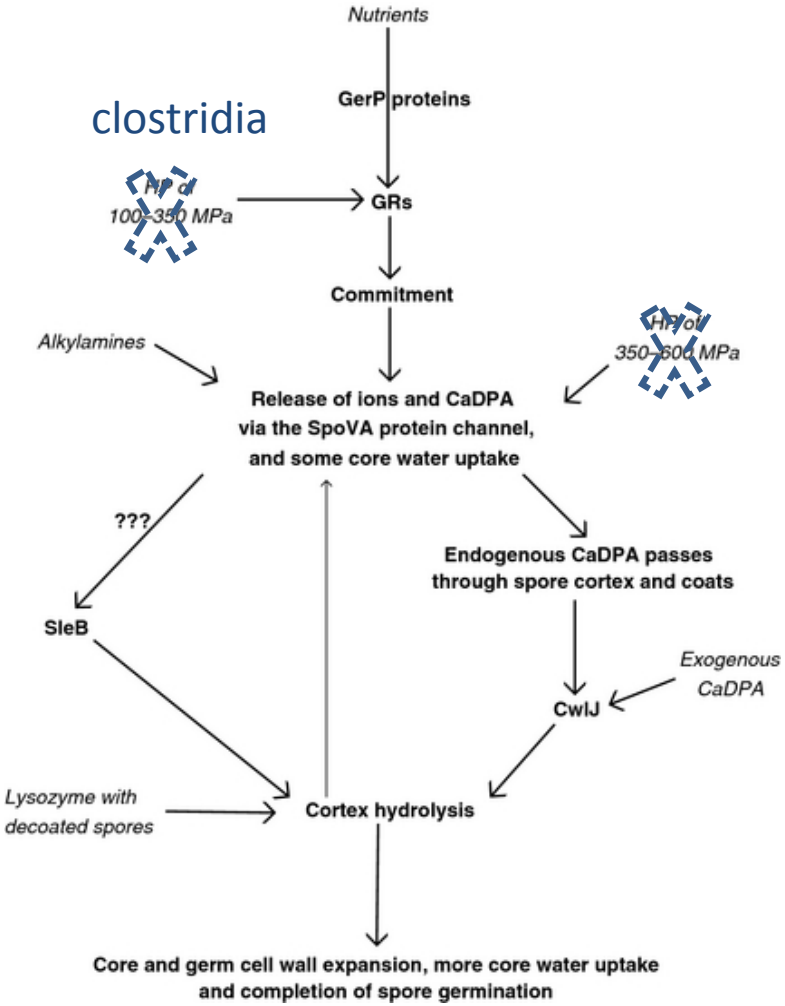
Mary J. Wilson et al. J. Bacteriol. 2012;194:1369-1377

ILVO

Ontkieming van *Bacillus* sporen door nutriënten en niet-nutriënten



Peter Setlow J. Bacteriol. 2014;196:1297-1305



Setlow P. Journal of Applied Microbiology
Volume 115, Issue 6, pages 1251-1268

ILVO

TRIGGERS ONTKIEMING EN UITGROEI BACTERIËLE SPOREN

- Nutriënten (L-aminozuren, nucleotiden, ….)
  - "Germinants": species en stamafhankelijk
    - L-Ala, inosine
    - combinatie L-Asparagine, fructose, glucose en KCl (AGFK)
    - KCl en Na-fosfaat (food poisoning *C. perfringens*)
  - "Co-germinants": bv. glycine, galzouten, aromatische en andere AZ
- Niet-nutriënt "germinants":
  - kationische surfactact dodecylamine, lysozyme, Ca-DPA, muropeptiden
  - Hoge druk behandeling (processing factor)

- Sublethale hittebehandeling (bv. pasteurisatie) = activatie
- interactie met gastheercellen (macrofagen, Caco-2 cellijn)

- Intrinsieke en extrinsieke factoren levensmiddel: pH, a_w, t°, atmosfeer
- Impliciete eigenschappen micro-organisme
  - gekoelde omstandigheden: **psychrotoleranten (= psychrotrofen) en psychrofielen**
  - warme omstandigheden **thermotoleranten (= thermotrofen) en thermofielen**
  - onder zure of alkalische omstandigheden: **acidofielen vs. alcalofielen**
  - onder zoute omstandigheden: **halotoleranten en halofielen**

Bederf van fruitsappen door alicyclobacillen

Condities van overleving, ontkieming en groei
Alicyclobacillus acidoterrestris

hot-fill & hold
2 min 88-96°C

D_{85} 65.6 min
D_{91} 11.9 min

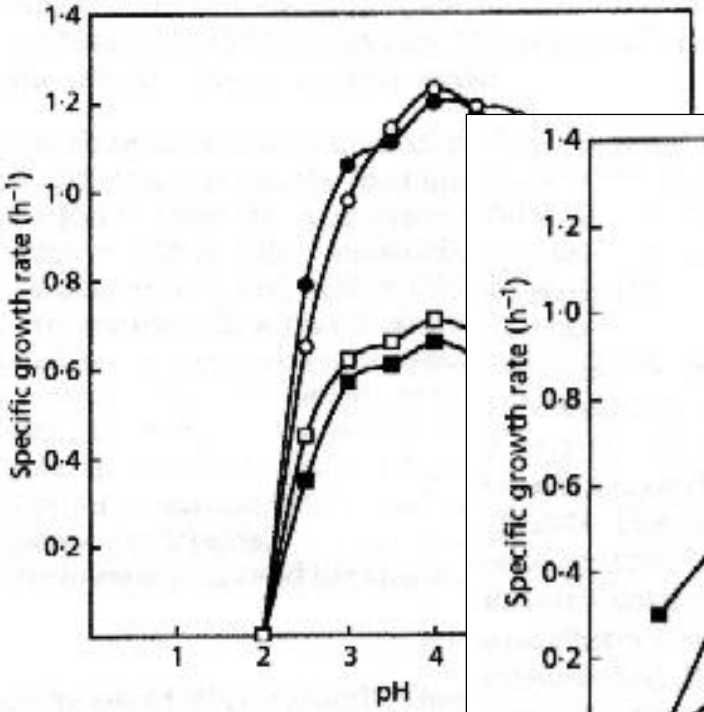


Fig. 2. Effect of pH on the growth rate
A. acidocaldarius (●), strain FR-6^T (○
A. acidoterrestris (■) and strain FR-11^T (□

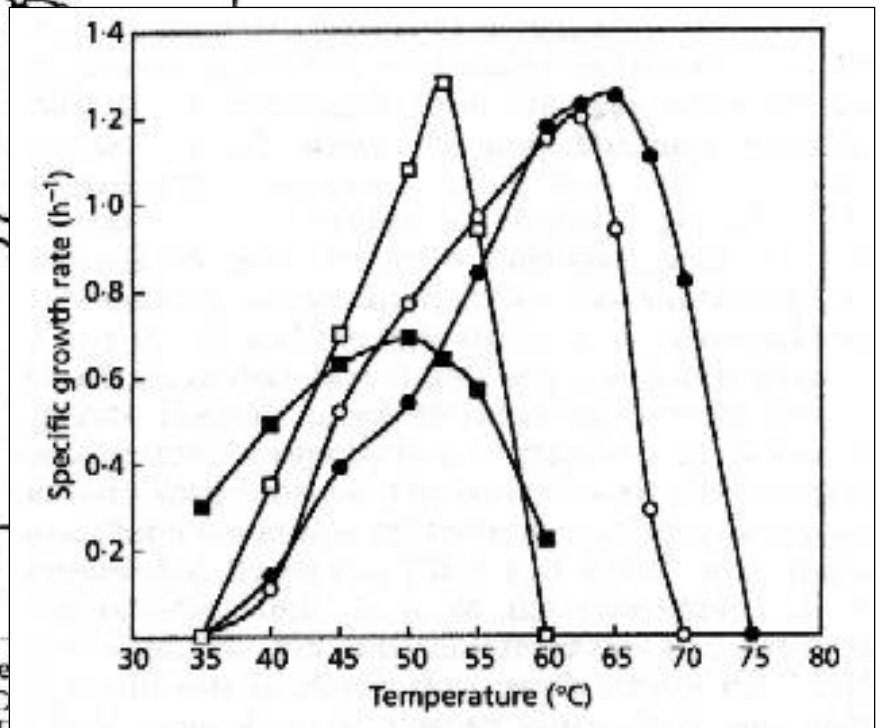


Fig. 1. Effect of temperature on the growth rates of the type strain of *A. acidocaldarius* (●), strain FR-6^T (○), the type strain of *A. acidoterrestris* (■) and strain FR-11^T (□).

(Albuquerque et al. 2000)

ILVO

Verhinderen van ontkieming en/of uitgroei van bacteriële sporen

- Analogen aan nutriënten bv. D-Ala, 6-thioguanosine
- Essentiële oliën
  - O.a. oregano olie (carvacrol): concentratieafhankelijke inhibitie of stimulatie van nutriënt-ontkieming van *B. cereus* sporen
- Nitriet/nitraat:
  - bevordering of verhindering ontkieming bij clostridia en bacillen afhankelijk van concentratie, t° en pH
  - Verhindert verdere uitgroei van ontkiemde sporen
- Bewaarmiddelen: sorbaat, organische zuren, zout
- Nisine en andere bacteriocinen:
  - Inhibitie in post-ontkiemings/uitgroeifase van sporen
  - Nisine niet actief bij hogere pH
  - Review: Egan et al. 2016. Frontiers in Microbiology vol. 7: article 461.
- MAP: 40% CO_2 inhibeert *B. cereus* sporen
- Superdormante sporen
  - Subpopulatie van sporen die heel traag ontkiemen of zelfs niet ontkiemen met nutriënten en hitte-activatie
  - Waarschijnlijk veroorzaakt door heel laag aantal ontkiemingsreceptoren

ILVO

Duopasteurisatie of tyndallisatie

- Principe:
  - 1ste hitte-activatiestap om sporen te laten ontkiemen tijdens een incubatietussenstap
  - 2de hitte-inactivatiestap om ontkiemde sporen af te doden
  - Ook mogelijk met hoge druk behandeling als 1ste activatiestap
- Praktijk:
  - effect van duopasteurisatie sterk bepaald door niveau aan ontkieming van de sporen; dit blijkt vooral afhankelijk te zijn van het natuurlijk gehalte aan germinants zoals inosine en vrije aminozuren zoals alanine in de matrix.
  - toediening van germinants meestal significant positief effect op afdoding van sporen; in het algemeen afdoding van 3 tot 5 log sporen ≠ sterilisatie
  - FF project:
    - zonder toevoeging van germinant geen realistisch industrieel procédé
    - Met lysozyme om ontkieming te triggeren, een significant positief effect, maar sporeninactivatie beperkt tot ca. 1.3 log sporen per ml product na incubatiestap van 6 uren bij 22°C
  - CIP procedure met L-Ala/inosine germinant mengsel om sporen in biofilm te verwijderen

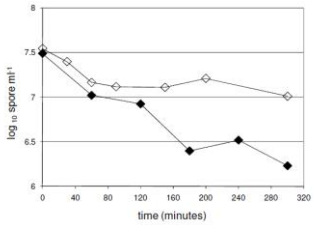


Fig. 47 Plot of surviving spores of *B. cereus* FF140 after duo-pasteurisation performed without lysozyme chloride (◇) and with lysozyme chloride (◆) at a concentration of 12.5µg ml^{-1}.

ILVO

Praktijkvoorbeelden

ILVO

GROND/BODEM als bron van sporen

Main sample category	Specific microorganism(s) (if indicated)	Sample type (if further indicated)	Number of samples	Total aerobic or anaerobic spore count (log cfu/g or mL)		Specific spore prevalence and count (log cfu/g or mL, unless otherwise indicated)		
				Average[a] or median[c]	Range[b]	Prevalence (%)	Average[a] or median[c]	Range[b]
Soil	*B. cereus*	Farm soil	38[i]–14[h]				4.9[a,i]–5.0[a,h]	4.1[i]–6.0[j]
	Butyric acid spores	Farm soil	59[j]				4.2[a,j]	3.2–4.9[j]
	C. botulinum	Apiary soil	235			31	2.0/kg[a]	1.7–3.0/kg
	Botulinum-toxin-producing clostridia	Virgin soil[k]	661			16.3		
		Nonvirgin soil[l]	1348			27.0		
	C. perfringens	Soil various sources	502			75.1		0–3.5
	C. estertheticum	Soil around abattoir				2.1[m]–14.6[n]		
	C. gasigenes	Soil around abattoir				10.4[m,n]		
	Anaerobic spores	Farm soil		4.0[c]	2.0–5.2			

- Bodem of landbouwactiviteiten kunnen de originele bron zijn van sporen, maar sporenconcentraties kunnen (zeer) laag zijn
- Niches waar ontkieming, uitgroei en terug sporenvorming optreden
- In sommige processing stappen, selectie voor sporen
- Moderne voedselbewaring en consumptie: hogere risico voor besmetting en problemen met sporenvormers als food spoilers of pathogenen

Heyndrickx M. 2011. Appl. & Environm. Soil Sci. Article ID 561975

ILVO

Processing bevordert sporenontkieming en uitgroei

- **Rauwe melk**: totale flora 10^4-10^5 cfu/ml; <1 – 10^3 sporen/ml
- **Gepasteuriseerde melk**:
  - Alle sporenvormers (bacteriën en fungi), sommige cocci en corynebacteriën
  - groei van overlevers is bevorderd: weinig competitie, melk inhibitorisch systeem (bv. lactoperoxidase) ± vernietigd

- *B. cereus:*
  - is niet dominant in rauwe melk of op ruw plant materiaal of verse gewassen voor directe humane consumptie
  - Na processing (pasteurisatie, drogen), worden sporenvormers dominant en hebben geen competitie van vegetatieve species die anders *B. cereus* overgroeien
  - Gekoelde bewaring van voeding bevordert psychrotolerante sporenvormers binnen de *B. cereus* groep (*B. cereus, B. weihenstephanensis, B. mycoides*)

ILVO

Gepasteuriseerde melk bederf

Psychrotrofe aerobe sporenvormers

Shelf-life van gepasteuriseerde gekoelde melk wordt bepaald door **psychrotrofe sporenvormers**

Defecten

Bittere of fruitige and ranzige **geur- of smaakafwijking**
Veroorzaakt door **<u>proteasen en lipasen</u>** van verschillende aërobe sporenvormers:
B. subtilis group, *B. cereus* groep, *Paenibacillus polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis*

zuur, gistachtig and gas defect
veroorzaakt door **<u>lactosefermenatie</u>** van *P. polymyxa*

structurele defecten

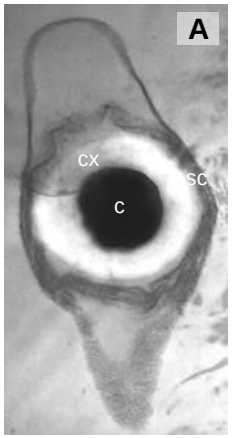
sweet curdling
<u>protease</u>
kleine vliesjes
wrongelvorming
Vooral door psychrotrofe *B. cereus*
(= grotendeels *B. weihenstephanensis*
Ook door *Bacillus subtilis* groep

bitty cream
<u>lecithinase</u>
vetdestabilisatie
"exclusief" *B. cereus* groep

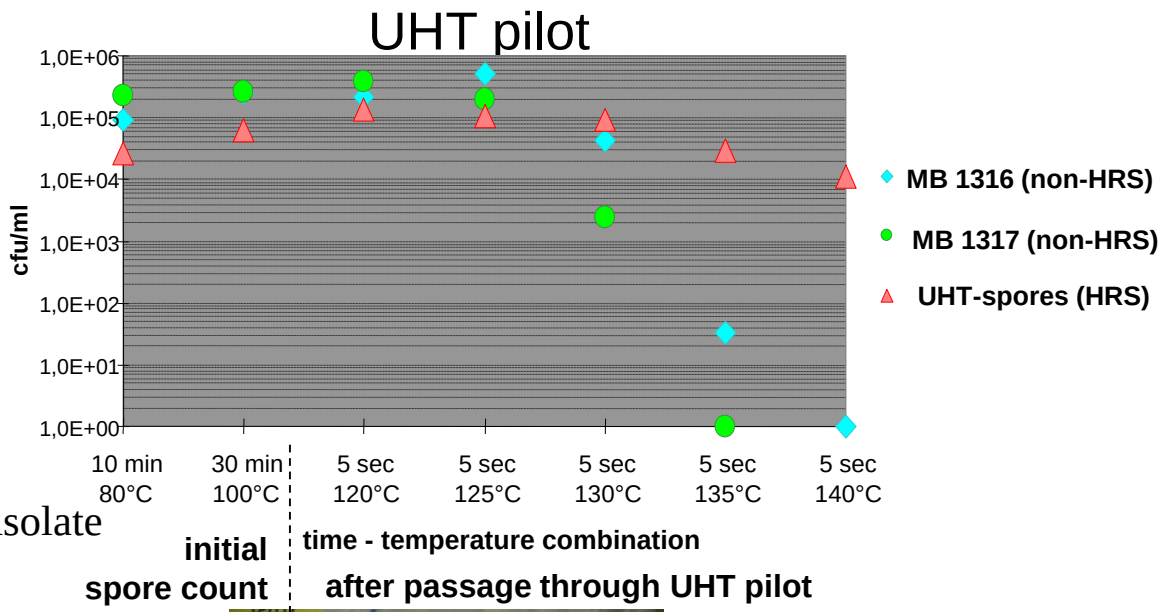
ILVO

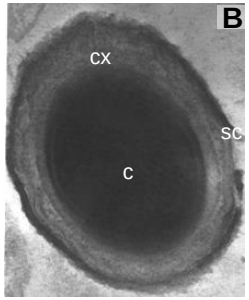
Niet-steriliteit of bederf van UHT-milk

Bacillus sporothermodurans



UHT milk HRS-isolate





Raw milk non-HRS isolate

zwakke groei in UHT-melk: 10^5 kve/ml, 10^3 sporen/ml
Pink coloration of UHT-milk by HRS-clone

Photographs Ann Van de Walle (ILVO)

ILVO

Bederf van zuivelproducten

Anaerobe of facultatief anaerobe sporenvormers

- Pap, desserten, custardpudding of -vla:
  - Anaerobe ontwikkeling van meer thermoresistente sporenvormers (o.a. *B. licheniformis*)
- Gouda en Edam type kazen & Italiaanse harde kazen:
  - "Late blowing" (laat los) defect veroorzaakt door fermentatieve gasontwikkeling in de kaas
    - Vooral door ***Clostridium tyrobutyricum***, maar ook door facultatieve anaërobe sporenvormers zoals *Paenibacillus polymyxa*
    - Indirect gestimuleerd door denitrificatie activiteit van sommige facultatieve anaerobe sporenvormers

FIG. 1. Cheeses with (top) and without (bottom) butyric acid fermentation. Cheeses 67077 and 67080 were made of cheese milk contaminated with spores of *C. tyrobutyricum* NIZO 51 and ATCC 25755[T]. Cheeses 67071 and 67074 were controls.

Klijn et al. (1995). AEM 61: 2919-2924.

ILVO

Clostridia bederf van vleesproducten

- Rauwe en gekookte vacuümverpakte rode vlees en vleesproducten onder gekoelde bewaring:
  - "Blown pack" spoilage door clostridia bij normale storage t° (-1.5 to 2°C):
    - *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* en subsp. *laramiense*, *C. gasigenes*, non-proteolytic *C. botulinum* (type E), …
    - Gas productie (CO_2, H_2), vluchtige componenten, S-bevattende componenten, metaalachtige schijn op vlees
    - Challenge tests: 1 spore in een verpakking voldoende voor bederf voor einde van shelf life (Clemens et al., 2010)
    - *C. estertheticum* en *C. gasigenes* frequent gevonden in runderslachthuizen (Moschonas et al., 2009), maar ook in grond buiten slachthuizen (soil route hypothesis) (Boerema et al., 2003)

ILVO

Bederf van vleesproducten en kant-en-klaarmaaltijden

Aerobe Sporenvormers

- REPFED's= refrigerated processed foods of extended durability,
  - aardappel- en groentepuree, voorverpakte versneden sla en groenten, kiemgroenten, maaltijdsalades, verpakt(e) vers vlees en vleesbereidingen, sauzen, kant-en-klaarmaaltijden, …
  - Milde hittebehandeling (pasteurisatie), meestal gemodificeerde atmosfeerverpakking, gekoelde bewaring
  - shelf life van enkele dagen tot maanden

- **Voorbeeld: aardappel- en groentepuree (Carlin et al. 2000):**

  - Eerste tekenen van bederf (smaak- en geurafwijking, gasvorming) meestal na 48 dagen bij 4°C, maar veel sneller bij t°-misbruik (tot 10°C tijdens vervoer, bij consument)
  - *P. polymyxa* groep dominant in deze producten na 4°C gekoelde bewaring; *B. subtilis, B. licheniformis* en *B. cereus* dominant bij t°-misbruik.
  - Courgette puree veel gevoeliger aan bederf
    - na 36 dagen bij 4°C, na 12 dagen bij 10°C
    - Groei van *B. simplex* bij 4°C

ILVO

Kant-en-klaarmaaltijden, rijst, vleesproducten, groenten

Bacillus cereus

Table 1
Incidence of *B. cereus* group spp. in sampled products.

Product	No. of samples analysed	No. (%) of samples contaminated with presumptive *B. cereus* spp.	Samples (%) with spores of presumptive *B. cereus* spp.
Lasagna	83	58 (70)	37
Béchamel sauce	86	70 (81)	–[a]
Bolognaise	86	66 (77)	–
Cooked pasta	80	16 (20)	–
Raw basmati rice	80	80 (100)	6
Fresh minced beef	80	12 (15)	–
Carrots	20	8 (40)	15
Celery	20	7 (35)	–
Chinese cabbage	20	6 (30)	–
Paprika	20	1 (5)	–

[a] Not evaluated.

S. Samapundo, M. Heyndrickx, R. Xhaferi, and F. Devlieghere. 2011.
Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. International Journal of Food Microbiology 150: 34-41.

ILVO

Kant-en-klaarmaaltijden, rijst, vleesproducten, groenten

Bacillus cereus

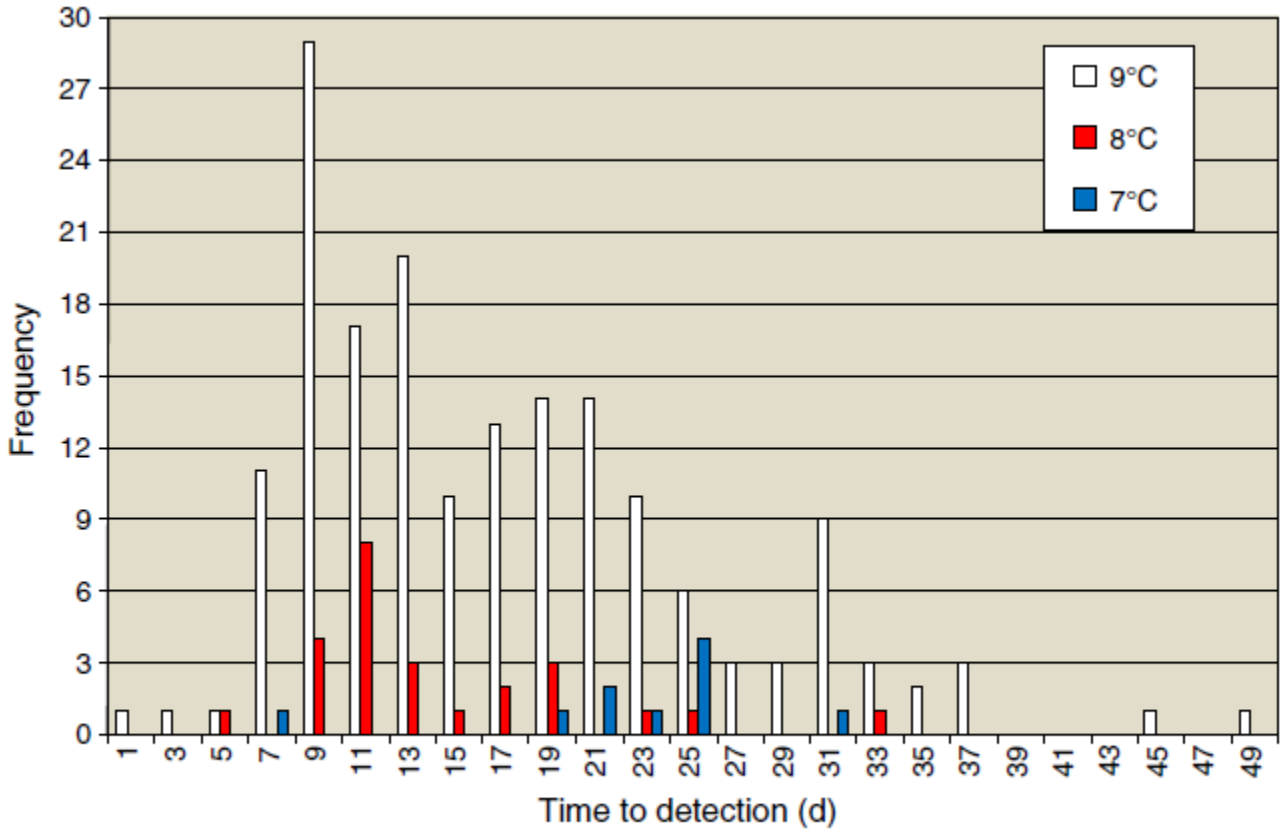


Fig. 1. Frequency distributions of the time to detection (TTD, day) of 380 *B. cereus* group isolates from food products at 7 °C, 8 °C and 9 °C.

ILVO

Kant-en-klaarmaaltijden, vlees/visproducten, groenten, kaas

Identity and characteristics of psychrotolerant sporeforming isolates.

Source	Putatively identified spore former	Enzymatic activity				Germination and outgrowth				
						@ pH = 7.1 & a_w = 0.995			@ a_w & pH of food[a]	
		Lipase	Protease	Lecithinase	Amylase	2 °C	4 °C	6 °C	7 °C	
Pangasius	*Bacillus methylotrophicus*	+[A]	+	+	+	−[B]	−	±	−	
Pangasius	*Solibacillus silvestris*	+	−	−	−	−	−	±	+	
Chicken stew	*Bacillus stratosphericus*	+	+	±[C]	−	−	−	−	+	
Chicken stew	*Bacillus foraminis*	+	+	−	+	−	−	−	−	
Meat loaf	*Bacillus pumilus*[D]	+	+	+	−	−	−	±	+	a_w 0,980
Meat loaf	*Bacillus pumilus*	+	+	+	−	−	±	+	+	pH 6,17
Chicken sausage	*Bacillus pumilus*	+	+	+	−	−	−	±	+	
Chicken sausage	*Bacillus amyloliquefaciens*	+	+	+	+	−	−	+	±	
Vegetable mix	*Bacillus pumilus*	+	+	+	+	−	−	±	+	
Couscous	*Bacillus stratosphericus*	+	+	±	−	−	−	±	+	
Chicken curry	*Bacillus cereus*	+	+	+	+	−	±	+	+	a_w 0,995; pH 6,50
Beef gravy	*Bacillus pumilus*[D]	+[A]	+	±	−[B]	−	−	±	±[C]	
White sauce	*Bacillus pumilus*	+	+	+	−	−	−	±	+	
White sauce	*Bacillus siamensis*	+	+	+	+	−	−	−	+	
White sauce	*Bacillus pumilus*	+	+	±	−	−	−	±	+	
Fish sauce	*Bacillus pumilus*	+	+	±	−	−	−	±	+	
Spaghetti carbonara	*Bacillus pumilus*	+	+	±	−	−	−	±	+	
Spaghetti carbonara	*Bacillus galactosidilyticus*	−	−	−	+	−	−	−	+	
Tagliatelle carbonara	*Sporosarcina saromensis*	+	−	±	−	−	−	±	+	a_w 0,998
Tagliatelle carbonara	*Bacillus licheniformis*	+	+	+	+	−	−	±	+	pH 7,50
Meat balls	*Bacillus pumilus*	+	+	±	−	−	−	±	+	
Meat balls	*Lysinibacillus xylanilyticus*	+	−	−	−	−	−	±	+	
Edam	*Bacillus cereus*	+[A]	+	−[B]	−	−	−	+	±	
Edam	*Bacillus pumilus*[D]	+	+	±	−	−	−	±	±	
Edam	*Bacillus pumilus*	+	+	−	−	−	−	±	±	
Edam	*Paenibacillus tundrae*	+	+	−	+	−	−	+	±	
Emmental	*Clostridium tyrobutyricum*	−	+	−	+	−	−	−	±	a_w 0,970
Emmental	*Bacillus mycoides*	+	+	+	+	−	−	−	−	pH 5,40

[a] See Table 2, A = positive, B = negative, C = weak, all isolates except *C. tyrobutyricum* were negative for gas production from glucose, D = 16S rDNA identification of all putative *B. pumilus* gave *B. safensis* as the result, confirmation as *B. pumilus* was based on phenotypic properties.

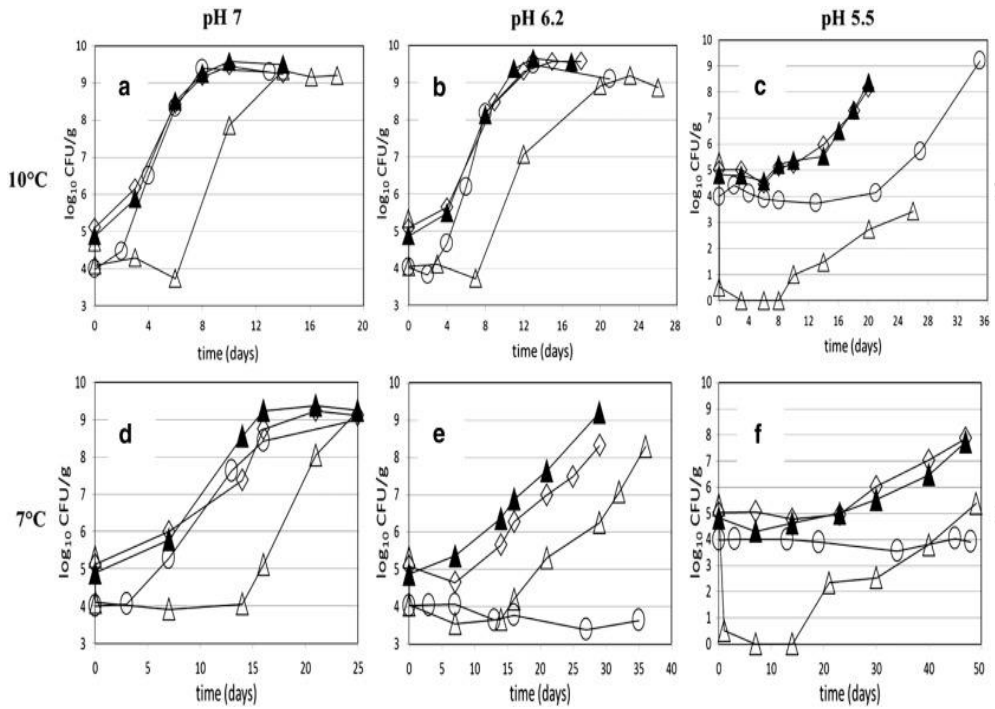
S. Samapundo, F. Devlieghere, R. Xhaferi, M. Heyndrickx. 2014. Incidence, diversity and characteristics of spores of psychrotolerant spore formers in various REPFEDs produced in Belgium. Food Microbiology 44: 288-295.

Ontkieming en uitgroei van sporen na hittebehandeling

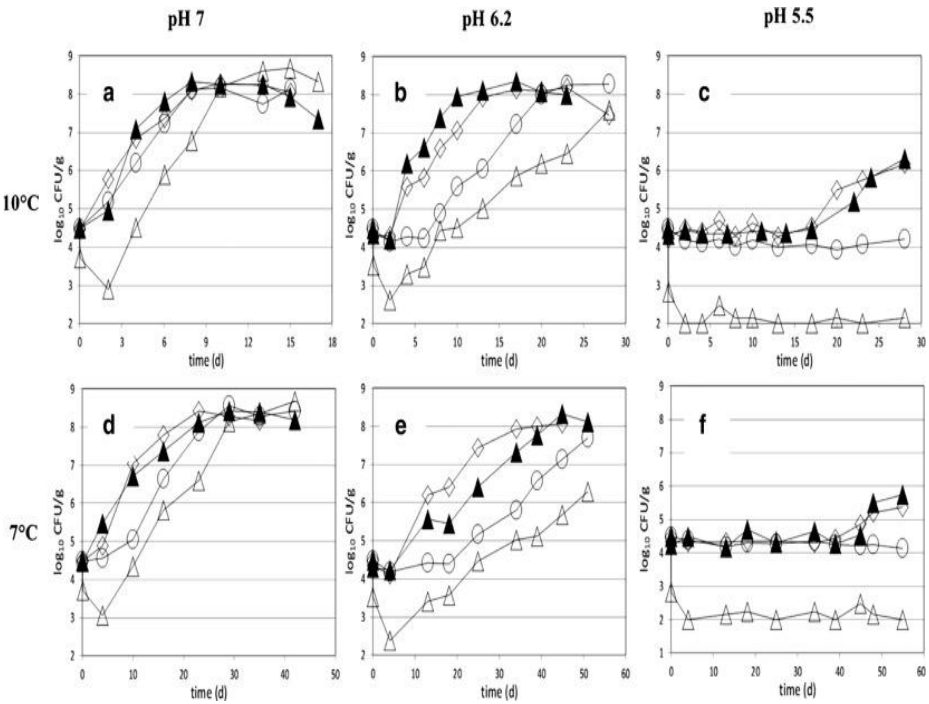
Buffer, a_w=0,990

Effect of heat intensity (○ no heat treatment, ◇ 10 min at 70 °C, ▲ 10 min at 80 °C and △ 10 min at 90 °C),

B. pumilus (meatloaf)



B. cereus (RTE chicken curry)



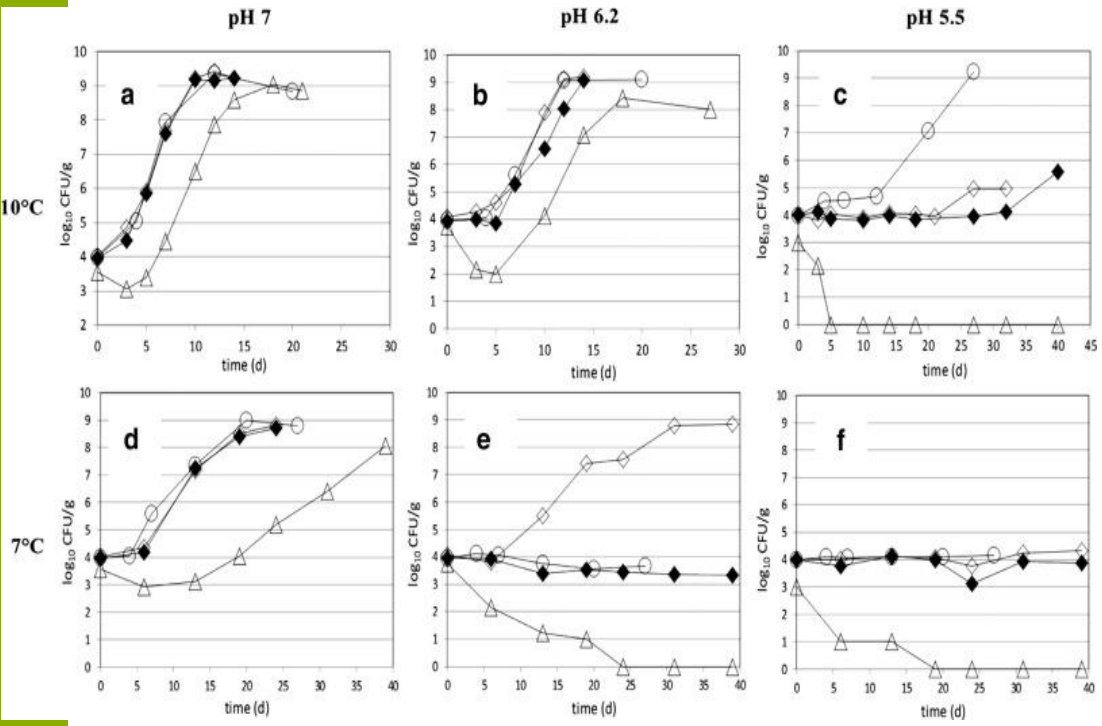
S. Samapundo, M. Heyndrickx, R. Xhaferi, I. de Baenst and F. Devlieghere. 2014. The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. International Journal of Food Microbiology 181: 10-18.

Ontkieming en uitgroei van sporen na hittebehandeling

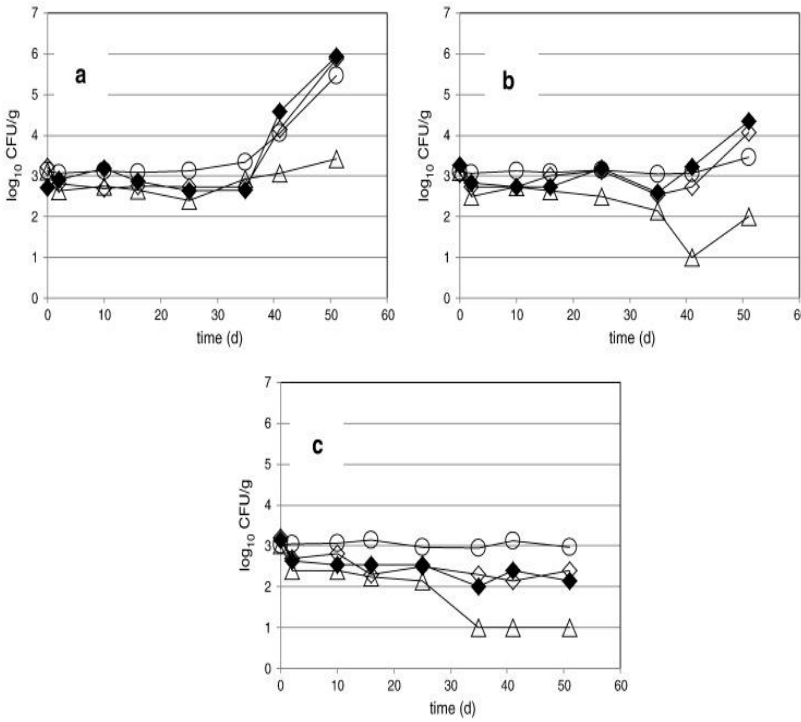
Buffer, a_w=0,960

Effect of heat intensity (○ no heat treatment, ◊ 10 min at 70 °C, ▲ 10 min at 80 °C and △ 10 min at 90 °C),

B. pumilus (meatloaf)



B. cereus (RTE chicken curry)



S. Samapundo, M. Heyndrickx, R. Xhaferi, I. de Baenst and F. Devlieghere. 2014. The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. International Journal of Food Microbiology 181: 10-18.

ILVO

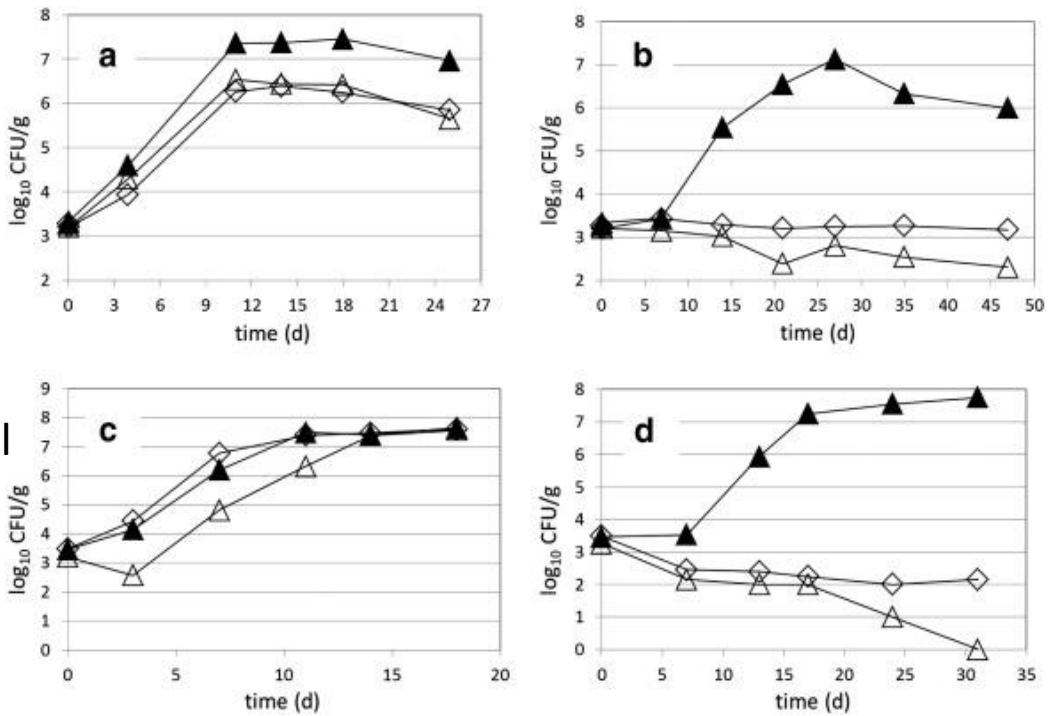
Ontkieming en uitgroei van sporen na hittebehandeling

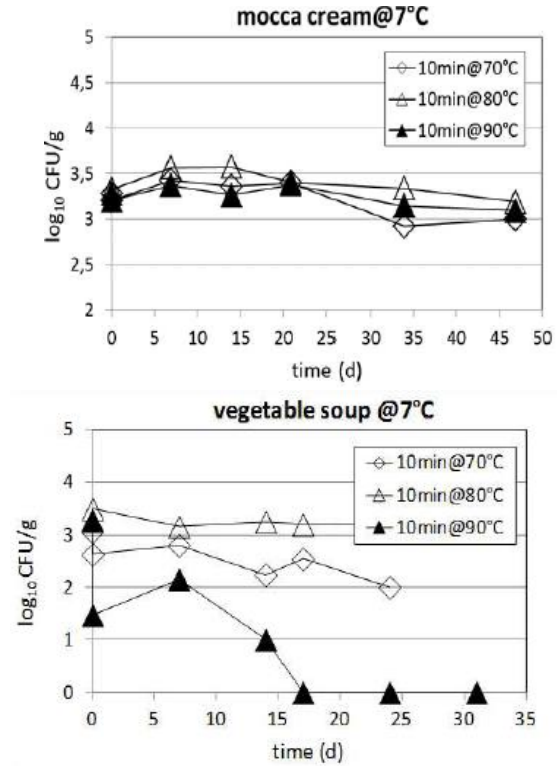
B. cereus Effect of heat intensity (10 min at 70 °C, ▲ 10 min at 80 °C and △ 10 min at 90 °C),

10°C 7°C

Full fat cream
a_w 0,953
pH 6,73

Béchamel sauce
a_w 0,993
pH 6,53





S. Samapundo, M. Heyndrickx, R. Xhaferi, I. de Baenst and F. Devlieghere. 2014. The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. International Journal of Food Microbiology 181: 10-18.

ILVO

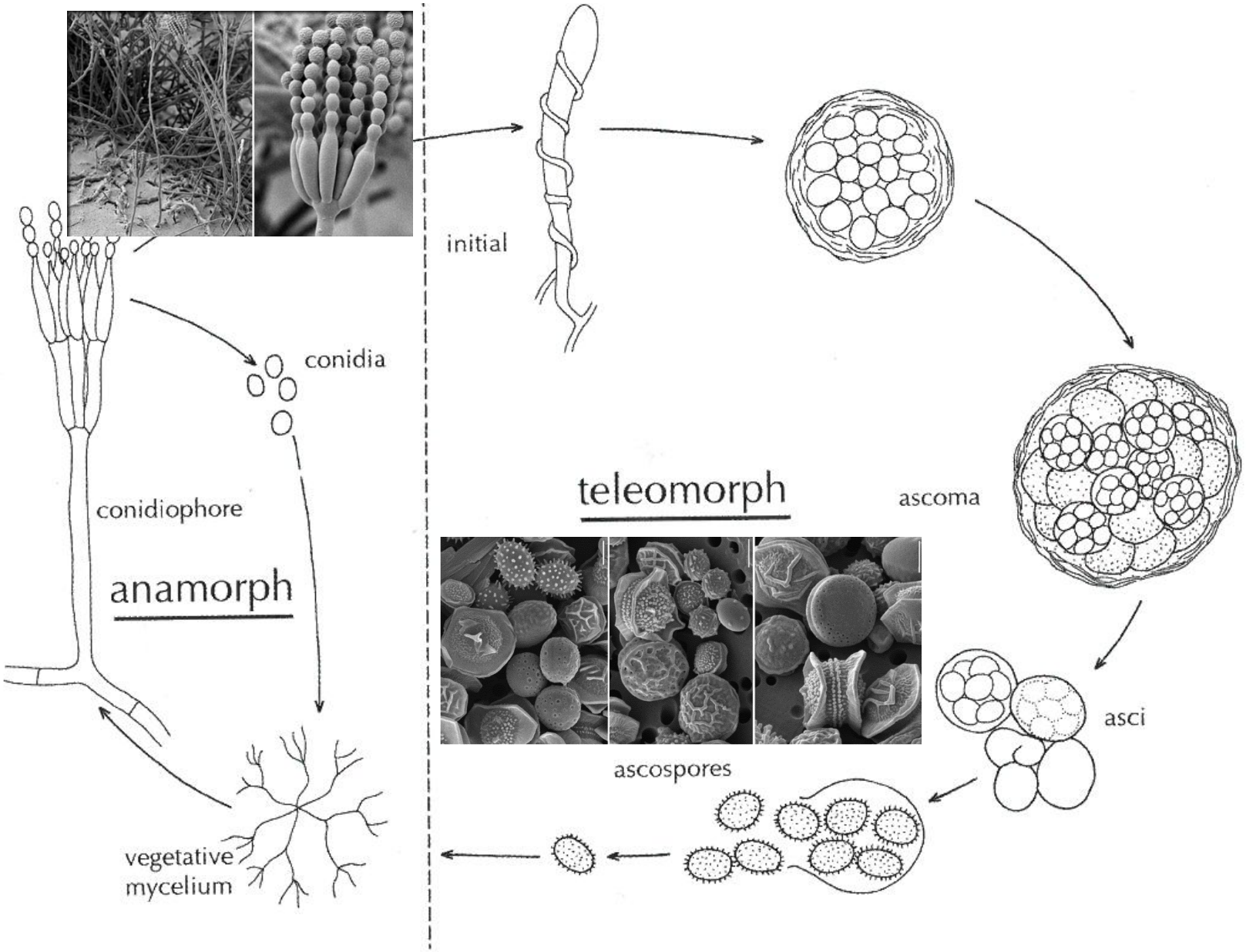
Gunstige *Bacillus* voedingstoepassingen

- Alkalische voedingsfermentaties
  - Soyabonen (*natto*), vis, cassava: Azië en Afrika
- Producent van voedingsenzymen
  - GMM's
- Sporen als probiotica
  - Sporen ontkiemen, groeien uit en sporuleren opnieuw in darm

ILVO

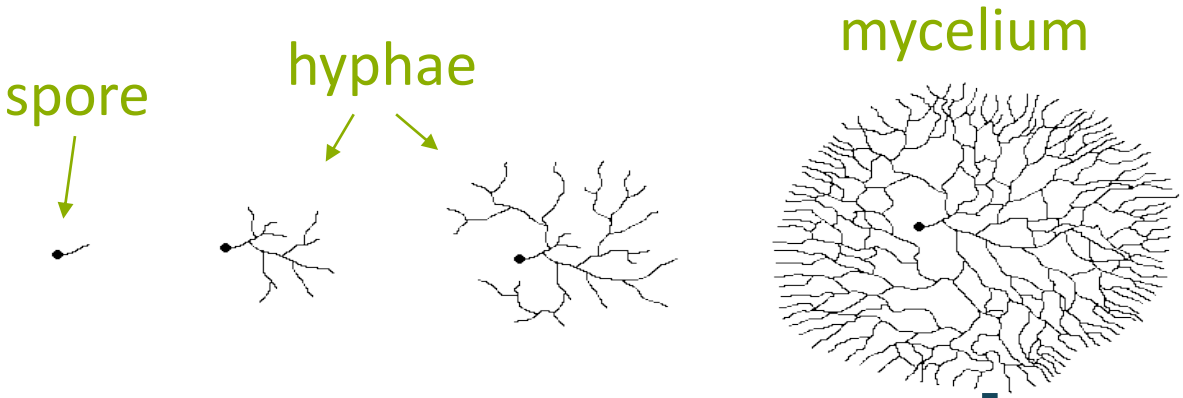
Diversiteit schimmels in zoetwaren

Growth and reproduction of Ascomycota

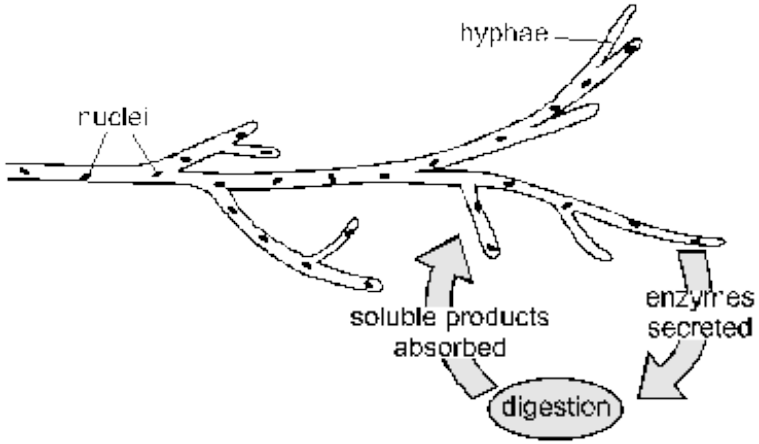


ILVO

Growth/ reproduction



Mode of nutrition



A network of influencing factors

- Intrinsic (e.g. nutrients, a_w)
- Extrinsic (e.g. temperature)
- Implicit (e.g. accompanying flora)

ILVO

The example of *Penicillium roqueforti* in food

→ Only known for the formation of small conidiospores

Economic significance

Production of blue cheese (e.g. Roquefort, Gorgonzola)

Negative impact: Food (and feed) spoilage

→ Preservative-resistant

Spoilage of rye bread

Effect of environmental factors on germination →

T (°C)		a_w	pH	Preservatives	
Min	Max	Min	Min	Propionic acid (pH 5,6)	Lactic acid
<0	33,5	0,83	2,9	MIC = 0,796 M	No MIC (>1 M)

Kalai *et al.* (2017)

ILVO

Fungal problems of food products

Fungal species that form both conidiospores and ascospores

→ ascospores: - highly condensed
- thick walled

→ Heat Resistant Mould Spores (HRMS)

<u>Examples</u>

Mould species: - *Byssochlamys nivea*
- *Neosartorya fischeri (= Aspergillus fischeri)*

Food product: spoilage of pasteurized fruit products
(e.g. juices, canned fruits)

Capability of growth under different environmental factors

→

Species	T (°C)	a_w	pH	$D_{90°C}$-value (min)
B. nivea	11-43	0,89-0,99	3-8	1,8-6,3 (strawberry pulp)
N. fischeri	10-52	0,90-0,99	3-8	1,5-23,4 (fruit juices)

Evelyn, Silva, F.V.M. (2017)

ILVO

Fungal problems of food products

Xerophilic fungi

= Fungi capable of growth, under at least one set of conditions, at water activity (a_w) < 0.85

a_w	Foods	Bacteria	Yeasts	Moulds
>0.99	Milk, fruit, vegetables,fresh meat and fish			
0.95-0.99	Cooked ham, smoked salmon	Gram-negative bacteria (e.g. *Escherichia coli*)	Basidiomycota	Basidiomycota, most soil fungi
0.90-0.95	Bread	Gram-positive bacteria (e.g. *Listeria monocytogenes*)	Most Ascomycota	*Mucor, Fusarium*
0.85-0.90	Dry salami	*Staphylococcus aureus*	*Zygosaccharomyces rouxii* (salt)	*Rhizopus, Cladosporium*
0.60-0.85	Dried fruit, grains, confectionery, salt fish, honey, fruit cakes, soy sauce, chocolate fillings, jams	Salt lake halophiles	*Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* (sugar)	xerophilic *Penicillia* and *Aspergilli, Eurotium*, *Chrysosporium*, *Wallemia sebi*, *Xeromyces bisporus*
0.20-0.60	Dry pasta, spices			
0.10-0.25	Freeze-dried products			

Pitt & Hocking (2009) Fungi and Food Spoilage.

ILVO

Fungal problems of food products

Examples

Sugar-rich (>50%) food products: marzipan, cake, …

- Mould species: - *Wallemia sebi*
  - *Eurotium herbariorum* (= *Aspergillus glaucus*)

Modelling of the G/NG interface as a function of

Substrate	T (°C)	a_w	pH	[EtOH] (g EtOH/g H_2O) (%)
Sugar-rich broth	22	0,75-0,90	5,0-6,2	0-5

Deschuyffeleer *et al.* (2015)

→ Inhibition for >3 months only if an [EtOH] of 5% is present

ILVO

Fungal problems of food products

Examples

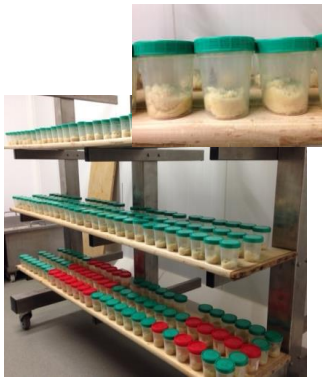
Sugar-rich (>50%) food products: marzipan, cake, …

- Mould species: - *Wallemia sebi*
  - *Eurotium repens* (= *Aspergillus pseudoglaucus*)

Challenge test marzipan – 25°C (25 days)

Preservatives	a_w	pH	*W. sebi*	*E. repens*
-	0,84	5,76	G	G
+ 0,15% Potassium sorbate	0,83	5,96	NG	G
+ 1% EtOH	0,84	5,77	NG	NG

PhD De Clercq N. (2016)



Inhibition for >1 month only if an [EtOH] of 1% is present

ILVO

Conclusies

- Sporenvormers zijn zeer divers en hardnekkig
  - Fylogenetisch, metabolisch (vegetatief), overleving en ontkieming (sporen)
  - ruwe grondstoffen, veelal via bodempartikels, en nabesmetting tijdens processing zijn wellicht belangrijkste **besmettingsbronnen** ⟹ VERMIJDEN
  - Beheersing van ontkieming en uitgroei door afstellen **voedingseigenschappen** (impliciet) en **bewaar-omstandigheden** (expliciet) ⟹ CRUCIAAL

ILVO

UCL – ELIM/MBLA

Prof. Jacques Mahillon
Dr. Xiaojin Liu

ILVO-Technology & Food

Prof. Marc Heyndrickx
Dr. Els Van Coillie
Dr. Geertrui Vlaemynck
Dr. Valerie De Jonghe
Dr. Nikki De Clercq

UGent-Lab. Microbiology

Prof. Paul De Vos
Dr. An Coorevits

Dr. Laurence Delbrassine

Drs. Varvara Tsilia

IPH-WIV
Dr. Katelijne Dierick

Dr. Sarah Denayer
Dr. Nadine Botteldoorn

KUL
Prof. A. Aertsen
Prof. C. Michiels
Drs. Tom Dongmin Kim

UGent- LFMFP
Prof. Mieke Uyttendaele
Prof. Frank Devlieghere
Prof. Andreja Rajkovic
Dr. Siele Ceuppens
Dr. Simbarashe Samapundo
Drs. Katrien Begyn

UGent- LABMET
Prof. Tom Van de Wiele
Prof. Nico Boon

UGent-L-Probe

Prof. Bart Devreese
Dr. Ilse De Baenst

Instituut voor Landbouw-
Visserij- en Voedingsonderzoek
Eenheid Technologie & Voeding
Brusselsesteenweg 370
9090 Melle – België
T + 32 (0)9 272 30 00
Marc.heyndrickx@ilvo.vlaanderen.be
www.ilvo.vlaanderen.be

Vlaanderen
is landbouw & visserij

ILVO
Instituut voor Landbouw-,
Visserij- en Voedingsonderzoek

ILVO