



Siège social
3600, boul Casavant Ouest
Saint-Hyacinthe, Qc, J2S 8E3
Tel : (450) 773-1105
Fax : (450) 773-8461

Bureau de Québec
1140, rue Taillon
Québec, Qc, G1N 3T9
Tel : (418) 643-8903
Fax : (418) 643-8350

Projet de recherche: Rapport final

Détermination d'une méthodologie de lavage de la tubulure

Par: Luc Lagacé, microbiologiste

Collaborateurs (trices) : Carolle Girouard
René Desruisseaux



Résumé

Deux méthodes de lavage de la tubulure ont été comparées soit le lavage à l'eau et le lavage à l'hypochlorite de sodium. Ces lavages ont été effectués à l'érablière expérimentale à 50% et à 100% de la coulée. Les résultats ont permis d'observer l'évolution de la contamination durant toute la saison et ce en fonction de la nature des contaminants (bactéries totales, *Pseudomonas*, levures et moisissures). La flore contaminante était essentiellement constituée de bactéries du genre *Pseudomonas*. L'effet d'une coulée forte sur la charge microbienne est observé de façon évidente avec les suivis des populations. Cependant, la charge initiale de contamination étant élevée (environ 1×10^7 UFC/ml), il a été difficile d'observer l'effet des méthodes de lavages proposées. Une légère baisse des populations a été observée après les traitements à l'eau et à l'hypochlorite de sodium sans toutefois déceler de différence entre les deux types de traitements. La présence de biofilm pourrait expliquer la reprise rapide de la contamination dans la tubulure. La formation du biofilm à la surface de la tubulure a été observée en microscopie électronique à balayage. Les photos au microscope électronique n'ont pas démontré que le biofilm s'installait de façon préférentielle sur la surface de la tubulure (bas versus haut du tube). Les effets des traitements de lavage n'ont également pas été démontrés grâce à la microscopie électronique. La poursuite des travaux sera consacrée à l'étude de différents produits de lavage et sur différents procédés pouvant limiter l'accumulation du biofilm à la surface de la tubulure.



Table des matières

Problématique	1
Objectifs du projet	2
Hypothèse	2
Protocole expérimental	2
Plan expérimental	2
Dénombrement Microbiologique	3
Eau d'érable	3
Surface de la tubulure	3
Volume de coulée	3
Microscopie électronique	3
Résultats et discussion	4
Profil de la contamination microbienne de l'eau d'érable	4
Effet du lavage sur la contamination de la tubulure	5
Observation au microscope électronique	7
Conclusion	10
Bibliographie	11



Problématique

L'adhérence des microorganismes est un phénomène commun (Bourion et coll. 1996). Les contaminants naturels de l'eau d'érable se fixent sur la surface interne de la tubulure, prolifèrent en formant des micro colonies et, avec le temps, forment un film biologique sur le plastique. Ce biofilm, formé de nombreux contaminants capables d'adhérer grâce aux polysaccharides qu'ils synthétisent, s'épaissit pour former le glycocalyx. En fixant les molécules nutritives qui circulent au voisinage immédiat des microorganismes, le glycocalyx sert aussi de réservoir alimentaire. Le glycocalyx offre une protection contre les agressions extérieures comme les désinfectants (Bourion et coll., 1996, Gauthier et Isoard, 1989). L'eau d'érable en contact avec le biofilm se contamine donc facilement. On dit que lorsque la température est froide, le métabolisme lent des bactéries semble empêcher la production de polysaccharides (Stone et Zottola, 1985). En début de saison, les temps froids ne favoriseraient donc pas la formation de glycocalyx. Il est donc important d'avoir une procédure de nettoyage adéquate en fin de saison de manière à recommencer la nouvelle saison avec du matériel le plus propre possible.

Le chlore est le désinfectant recommandé pour le lavage de la tubulure dans les érablières (CPVQ 1984). Ses avantages sont, entre autres, d'avoir un large spectre de désinfection et d'être efficace à basse température. La solubilité du chlore est à son optimum autour de 5°C (NAFPP, 1994). De plus, le chlore ne mousse pas et la dureté de l'eau ne l'affecte pas. Toutefois, il perd beaucoup de son efficacité lorsque le pH est plus élevé que 8,5 (Lenahan, 1992). À pH légèrement acide, on le retrouve sous la forme d'acide hypochlorique (HOCl) qui est un bactéricide très puissant (Andrade et coll., 1995). Depuis 1986, on recommande pour le lavage de la tubulure, l'utilisation du chlore à 600 ppm.

Dépendant de l'installation, les résidus de produits de lavage peuvent être problématiques. La concentration de l'eau d'érable pour la fabrication du sirop et le fait qu'une petite quantité de résidus de produits de lavage se trouve multipliée par 40 peut entraîner de mauvaises saveurs. Un produit tel que le peroxyde d'hydrogène ne devrait pas causer de problèmes, mais les produits stabilisants qui y sont ajoutés seraient à vérifier. Pour ce qui est de l'usage de l'hypochlorite de sodium, une enquête démontre que celui-ci n'a pas d'incidence sur l'apparition de goût salé dans le sirop en dessous de 200 ppm et sur l'innocuité du sirop (Dumont, 1997).

Les conclusions apportées par les résultats du projet de 1997 amènent à se pencher sur l'efficacité de l'eau comme produit de lavage. Un lavage à l'eau a démontré qu'il avait un certain potentiel à diminuer la charge microbienne de l'eau d'érable. Avec l'imbroglio concernant les résidus de produits de lavage dans le sirop d'érable, l'utilisation de l'eau comme agent de lavage semble tout à fait justifiée. Les questions qui restent en suspens concernent la vitesse de reprise de la contamination et l'efficacité d'un tel traitement si la fréquence des lavages est moindre. La microscopie serait alors un outil intéressant permettant d'évaluer l'efficacité du lavage pour déloger le biofilm.



Objectifs du projet

1. Déterminer la qualité microbiologique de l'eau d'érable qui circule dans les tubes collecteurs immédiatement avant chaque lavage afin d'évaluer la charge potentielle de contaminants
2. Déterminer la qualité microbiologique de la paroi des tubes avant et après lavage pour évaluer l'efficacité relative de chaque traitement
3. Évaluer la vitesse de reprise de la contamination de l'eau d'érable
4. Déterminer par microscopie électronique, l'effet du lavage sur le biofilm



Hypothèse

Sur la bases des données actuellement disponibles, ce projet vise à vérifier les hypothèses suivantes :

- Une technique de lavage appropriée permet de diminuer de façon appréciable la charge microbienne de l'eau d'érable
- La vitesse de reprise de la contamination de l'eau d'érable est significativement diminuée par une pratique de lavage adéquate



Protocole expérimental

Plan expérimental

Les traitements étaient appliqués sur 4 lignes de tubulures complètement indépendantes les unes des autres et de longueur égale soit 500 pieds. Les bonnes pratiques d'entaillage ont été utilisées pour entailler les arbres servant à l'étude.

Tube 1 = Tube témoin sans lavage

Tube 2 = Tube avec lavage à l'eau à 50% et 100% de la coulée

Tube 3 = Tube où l'entaillage des arbres est fait à 50% de la coulée suivi d'un lavage à l'eau à 100% de la coulée

Tube 4 = Tube avec lavage à l'hypochlorite de sodium (600 ppm) à 50% et 100% de la coulée

Le % de coulée était estimé à partir du volume d'eau d'érable recueillie par rapport au volume total de la saison.

Dénombrement Microbiologique

Eau d'érable

La qualité microbiologique de l'eau d'érable était évaluée en procédant à des dénombrements microbiens de la flore totale sur un milieu gélosé PCA incubé à 30°C pendant 48 heures. Le dénombrement des bactéries du genre *Pseudomonas* était également effectué sur milieu *Pseudomonas agar* incubé à 30°C pendant 48 heures. Le nombre de levures et moisissures était aussi obtenu sur gélose acidifiée PDA incubée à 23°C pendant 5 jours. Le suivi des populations microbiennes de l'eau d'érable a été effectué en analysant l'eau d'érable de la ligne T1 à tous les 2 jours durant toute la saison de coulée. L'eau d'érable provenant des lignes T2, T3 et T4 a été dénombrée à 50% de la coulée avant et après le traitement de lavage.

Surface de la tubulure

Les analyses microbiologiques de la surface des tubes étaient réalisées au début de la saison ainsi qu'avant et après le traitement de lavage de la tubulure à 50% de la coulée. Ces analyses étaient effectuées en prélevant une section de tube dont la surface externe était préalablement désinfectée à l'alcool éthylique à 70%. La section de tube était congelée dans un sac aseptique avant d'être analysée. Au moment de l'analyse, le tube était décongelé et coupé aseptiquement afin d'avoir une section d'une longueur d'environ 1 cm de longueur pour une surface interne d'environ 4,5cm². Cette section était ensuite plongée dans une éprouvette contenant 10 ml d'eau peptonée stérile contenant des billes de verre. L'éprouvette contenant la section de tube à analyser était par la suite placée dans un bain à ultrasons et traitée à 47 kHz durant 1 minute. Ce traitement est efficace pour déloger les bactéries de la surface sans être néfaste pour la viabilité des bactéries (Bourion et coll., 1996). Suite au traitement aux ultrasons, les dénombrements microbiologiques des échantillons étaient effectués sur PCA pour la flore totale, *Pseudomonas agar* pour les bactéries du genre *Pseudomonas* et sur PDA acidifié pour les levures et moisissures.

Volume de coulée

Le volume de coulée était exprimé par le nombre de litres à l'entaille et était obtenu en mesurant la quantité d'eau d'érable recueillie et en divisant cette quantité par le nombre d'entailles effectuées. Le nombre d'entailles était de 270 avant 50% de la coulée et 360 après 50% de la coulée (entaillage de T3), ce qui faisait 90 entailles par ligne de tubulure.

Microscopie électronique

Afin d'observer l'aspect du biofilm à la surface de la tubulure, des échantillons de celle-ci ont été analysés en microscopie électronique à balayage. Les échantillons ont été préparés en les fixant au glutaraldéhyde et en les déshydratant par des passages successifs dans une série de solutions d'éthanol de concentrations croissantes (jusqu'à 100%). Par la suite, les échantillons ont été séchés dans un appareil de séchage au point critique (CO²). Les échantillons ont finalement été recouverts d'or et observés à 5 kV en microscopie à balayage (Nanolab LE2100). L'orientation des échantillons de tubulure prélevés était notée afin d'observer si la formation du biofilm était uniforme sur la surface interne de la tubulure (haut vs bas).



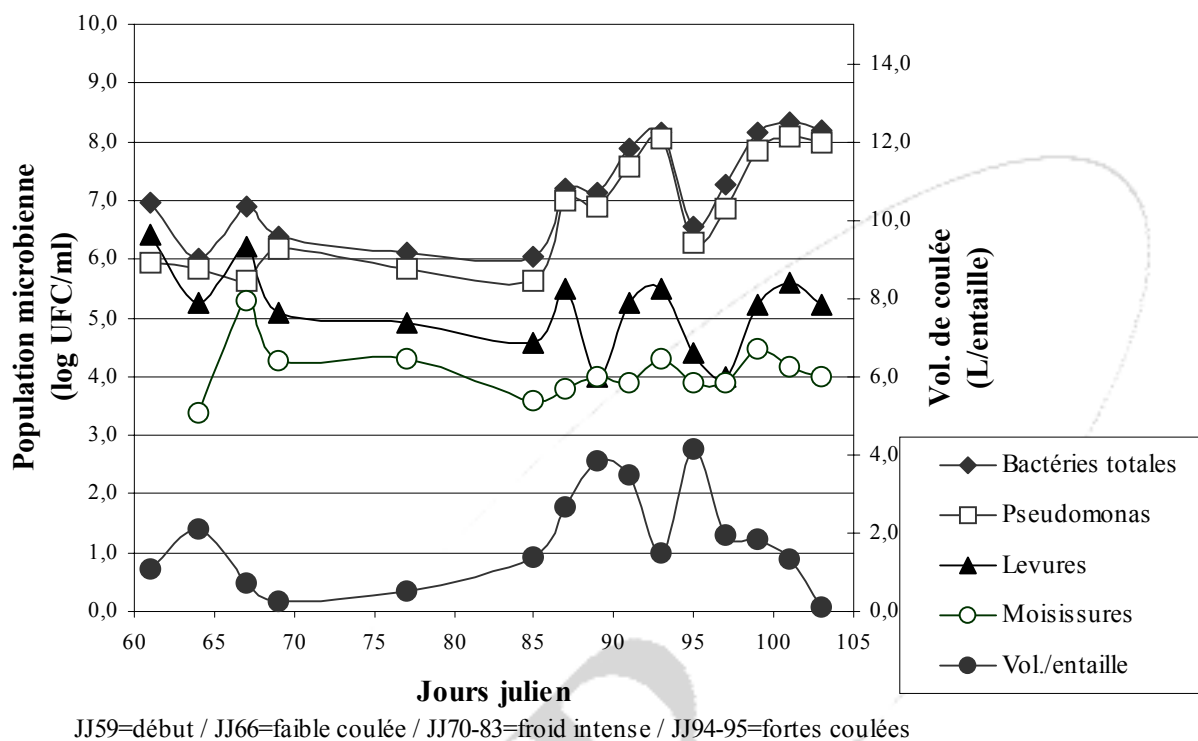
Résultats et discussion

Profil de la contamination microbienne de l'eau d'érable

L'évolution de la contamination microbienne de l'eau d'érable a été suivie tout au long de la saison de coulée. Les résultats de ce suivi est présenté à la figure 1. Comme on peu le constater, la contamination de l'eau d'érable est relativement élevée dès le début de la saison, ce qui est considéré comme inhabituel. Généralement, la contamination microbienne en début de saison est relativement faible et est dans la plupart des cas inférieure à 1×10^4 UFC/ml. La flore totale se situe au jour julien (JJ) 61 à environ 1×10^7 UFC/ml tandis que les *Pseudomonas* et les levures sont à environ 1×10^6 UFC/ml. Le nombre de moisissures est plus faible et se situe entre 1×10^3 et 1×10^4 UFC/ml. En regardant la figure 1, on constate une légère augmentation de contaminants au (JJ) 67 qui serait dû à la faible coulée du JJ 66 (21 litres). Par la suite, les froids intenses entre les JJ 70 et JJ 83 ont entraînés une certaine stabilité dans la contamination pour la même période. À remarquer sur la figure 1 que le nombre de *Pseudomonas* est presque équivalent au nombre de bactéries totales et ce pour la durée complète de la saison de coulée. Ce résultat laisse croire que ce genre de bactéries constitue la majorité de la flore microbienne de l'eau d'érable. Les levures et moisissures quant à elles demeurent en quantités inférieures tout au long de la coulée (environ 2 à 3 logs de moins pour les levures et 3 à 4 logs de moins pour les moisissures).

La mesure du volume moyen de coulée par entaille tel que montré à la figure 1 permet de mettre en relation le débit de coulée et la contamination microbienne. Les fortes coulées des JJ 94 et 95 ont eu un effet bénéfique sur la contamination bactérienne qui a été réduite de 99 % dans le cas du témoin. La coulée moyenne a atteint 4 L/entaille à cette période ce qui est environ le double d'une coulée normale. Une forte coulée pourrait donc avoir un effet bénéfique appréciable comparable dans certains cas à un traitement de lavage. Dans l'ensemble, les résultats laisse croire que les conditions climatiques ont une influence importante sur la contamination microbienne. Cette contamination serait diminuée lorsque la température s'élève et permet une coulée abondante ou lorsque la température est intensément froide et que la croissance microbienne est arrêtée. Elle serait par ailleurs favorisée lorsque que la température est suffisamment froide pour ralentir la coulée mais pas trop froide pour laisser la flore psychrotrophe se développer.

Figure 1 : Évolution de la contamination microbienne et de la coulée durant la saison 1998



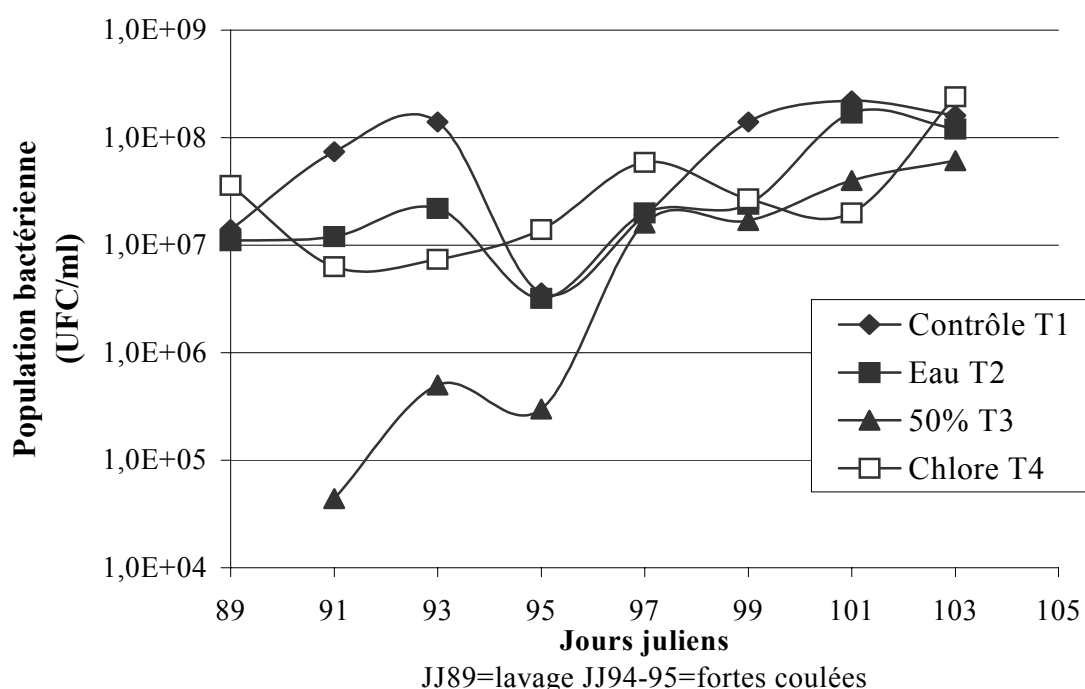
Effet du lavage sur la contamination de la tubulure

Le graphique 2 présente les résultats de l'effet des traitements de lavage de la tubulure à 50% de la coulée (JJ 89) sur la qualité microbiologiques de l'eau d'érable. La ligne T2 a subi un lavage à l'eau tandis que la ligne T4 a été lavée à l'hypochlorite de sodium. Les arbres du traitement T3 ont été entaillés à 50% de la coulée. On remarquera que la charge bactérienne de l'eau d'érable est considérablement élevée et que même après un traitement de lavage, cette charge reste tout de même importante se situant à environ 1×10^7 UFC/ml. Néanmoins, le lavage à l'eau montre une légère diminution de la flore bactérienne de l'eau d'érable d'environ 84% par rapport au témoin au jour julien 91. Le lavage à l'eau se compare donc au lavage à l'hypochlorite de sodium qui lui a permis d'obtenir une réduction de 91% de la flore bactérienne. Toutefois, la progression de la contamination de l'eau d'érable provenant de la tubulure ayant été traitée se compare à celle du témoin où la contamination est relativement élevée. La contamination élevée de l'eau en début de saison est probablement responsable de la reprise rapide de la contamination suite au traitement de lavage. Probablement qu'en ayant une contamination plus représentative du début de saison (environ 1×10^4 UFC/ml), la reprise de la croissance suite au traitement aurait été plus lente.

Il est également possible de noter à la figure 2, l'effet de la forte coulée des JJ 94-95 où les populations bactériennes ont affiché une légère baisse pour cette période. La diminution de la contamination est relativement importante pour la tubulure témoin et plus modeste pour les autres traitements. De plus, en procédant à un entaillage tardif (50% de la coulée), on obtient une population de départ significativement

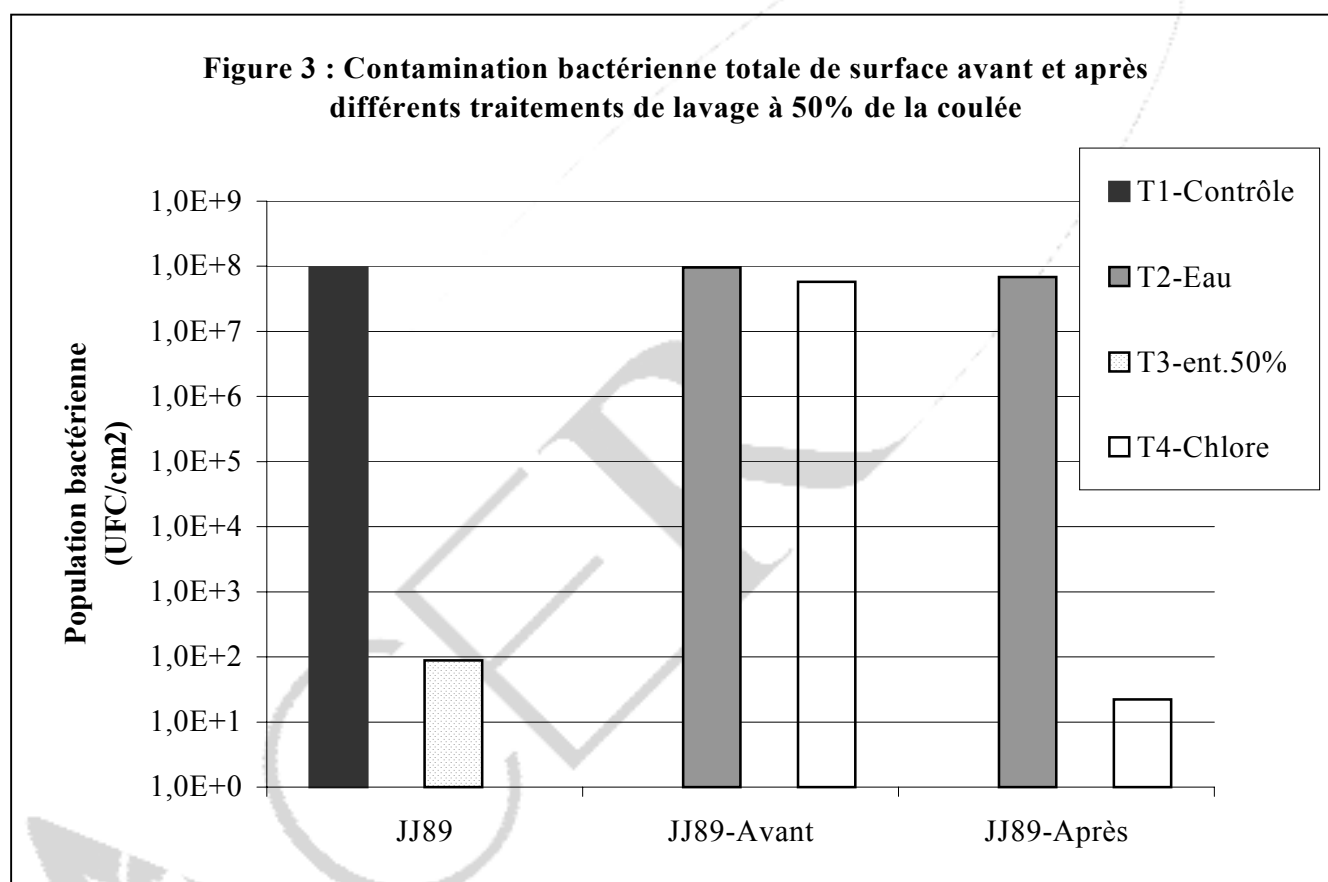
plus faible (T3) que pour les autres traitements. Cependant, la progression de la contamination de l'eau d'érable est rapide et vient rejoindre le niveau de population avec un entaillage en début de saison. L'eau d'érable de la tubulure T3 possède tout de même une charge bactérienne importante même si l'entaillage a été fait tardivement, ce qui expliquerait la progression rapide de sa population. De façon générale, les courbes de contamination bactérienne ont un profil très semblable pour chacun des traitements, ce qui semble dénoter une forte influence climatique sur la charge microbienne.

Figure 2 : Contamination bactérienne de l'eau d'érable provenant de différentes lignes de tubulure durant la saison 1998 en fonction de différents traitements de lavage



L'analyse de la charge bactérienne à la surface de la tubulure a par ailleurs donné des résultats un peu surprenant comme on peut le constater à la figure 3. Sur cette figure, il aurait été normal d'observer que les traitements de lavage n'ont pas permis de diminuer la contamination à la surface de la tubulure puisque la contamination de l'eau d'érable correspondante était restée élevée (figure 2). Cette constatation est vraie pour le lavage à l'eau T2 où la diminution de la contamination de surface est négligeable et se situe au même niveau que le témoin sans lavage T1. Cependant, pour le lavage à l'hypochlorite de sodium, la diminution de la flore de surface est considérable, passant de presque 1×10^8 UFC/cm² à presque 1×10^1 UFC/cm² (diminution de 99.99%). Un résultat similaire est aussi obtenu pour un lavage à l'hypochlorite de sodium à 100% de la coulée. Dans un tel cas, il aurait été possible de penser que cette diminution de contamination se répercute sur la charge microbienne de l'eau d'érable correspondante mais ce phénomène n'a pas été observé. Plusieurs raisons peuvent être évoquées afin d'expliquer la différence de contamination entre la surface de la tubulure et l'eau d'érable qui y transite. On peut s'interroger à savoir si en prélevant une section de tubulure pour analyse, cette section est représentative

de l'ensemble de la tubulure. On pourrait penser que le traitement de lavage serait efficace dans les régions lisses de la tubulure mais ne le serait pas à certains points difficiles à atteindre de la tubulure (joints, coudes, valves...). Aussi, une certaine part de la contamination pourrait venir de l'entaille qui n'est pas décontaminée pendant la coulée. Pour le traitement T3 où l'entailage a été fait à 50% de la coulée, les résultats démontrent que la contamination de surface au départ est relativement faible et que l'eau d'érable obtenue de cette tubulure possède une contamination inférieure au témoin (figure 2). Cependant, la contamination de surface de la tubulure T3 (environ 1×10^2 UFC/cm²) au départ serait tout de même assez suffisante pour amener une progression rapide de la contamination de l'eau d'érable qui y circule comparable à l'eau d'érable d'un entailage en début de saison. Il faut également ajouter que la tubulure utilisée lors de ce projet n'était pas neuve par conséquent elle pouvait présenter une certaine usure de sa surface interne laissant place à l'attachement du biofilm.



Observation au microscope électronique

Des essais de lavage de la tubulure par les années passées ont amené à penser que la formation du biofilm à la surface de la tubulure pouvait être préférentielle par rapport à l'orientation du tube. En effet, lorsque l'eau d'érable s'écoule dans la tubulure, le bas du tube est lavé contrairement au haut qui reste passablement sec. La formation du biofilm serait donc favorisée au haut du tube où la probabilité du lavage par la coulée de l'eau d'érable est plus faible et que la disponibilité des nutriments est suffisante pour assurer l'élaboration du biofilm. L'observation en microscopie électronique à balayage n'a cependant pas pu déceler une quelconque formation préférentielle du biofilm à la surface de la tubulure. L'observation des échantillons du haut de la tubulure apparaissaient semblables à ceux du bas, ce qui peut

signifier que la construction du biofilm ne se fait pas de manière homogène. La couche de biofilm était observable autant sur la partie du haut que du bas de la tubulure. D'autres parts, l'observation en microscopie électronique n'a pas décelé de différence entre les sections de tubulure ayant été lavées (eau ou NaOCl) et celles n'ayant pas été lavées. De même, aucune différence n'a été remarquée entre les échantillons de tubulure avec l'avancement de la saison. Vue l'hétérogénéité de la surface interne de la tubulure, il est difficile d'interpréter correctement les observations au microscope électronique. Or, la section de tubulure analysée pourrait ne pas être représentative de l'ensemble de la surface interne et ainsi engendrer certaines difficultés dans l'interprétation des observations. De plus, la possibilité d'observer des artefacts peut aussi apporter quelques difficultés venant fausser l'interprétations des résultats.

Ceci étant dit, la figure 4 montre une surface de tubulure intacte n'ayant pas été colonisée par un biofilm microbien mais présentant tout de même un amas de cellules au centre de la photo. Cette figure constitue donc un exemple de surface intacte sur laquelle le biofilm n'est pas encore élaboré. On remarquera par contre que cette surface présente une certaine porosité offrant ainsi une sorte de point d'encrage aux cellules lesquelles pourront s'y installer et proliférer pour former le biofilm. Pour illustrer ce qu'est un biofilm, la figure 5 en donne un exemple éloquent où la couche de polysaccharide semble emprisonner des cellules microbiennes à la surface interne de la tubulure. On y observe donc une couche appréciable de polysaccharide d'une certaine épaisseur où des cellules bactériennes en forme de bâtonnet semblent être retenues par la matrice. Il est donc facile d'imaginer qu'une telle couche de matériel microbien soit difficile à déloger et qu'elle peut offrir un environnement protecteur aux cellules microbiennes. Le biofilm devient donc une source de contamination importante qui doit être considérée dans l'élaboration d'une technologie de lavage et d'assainissement.

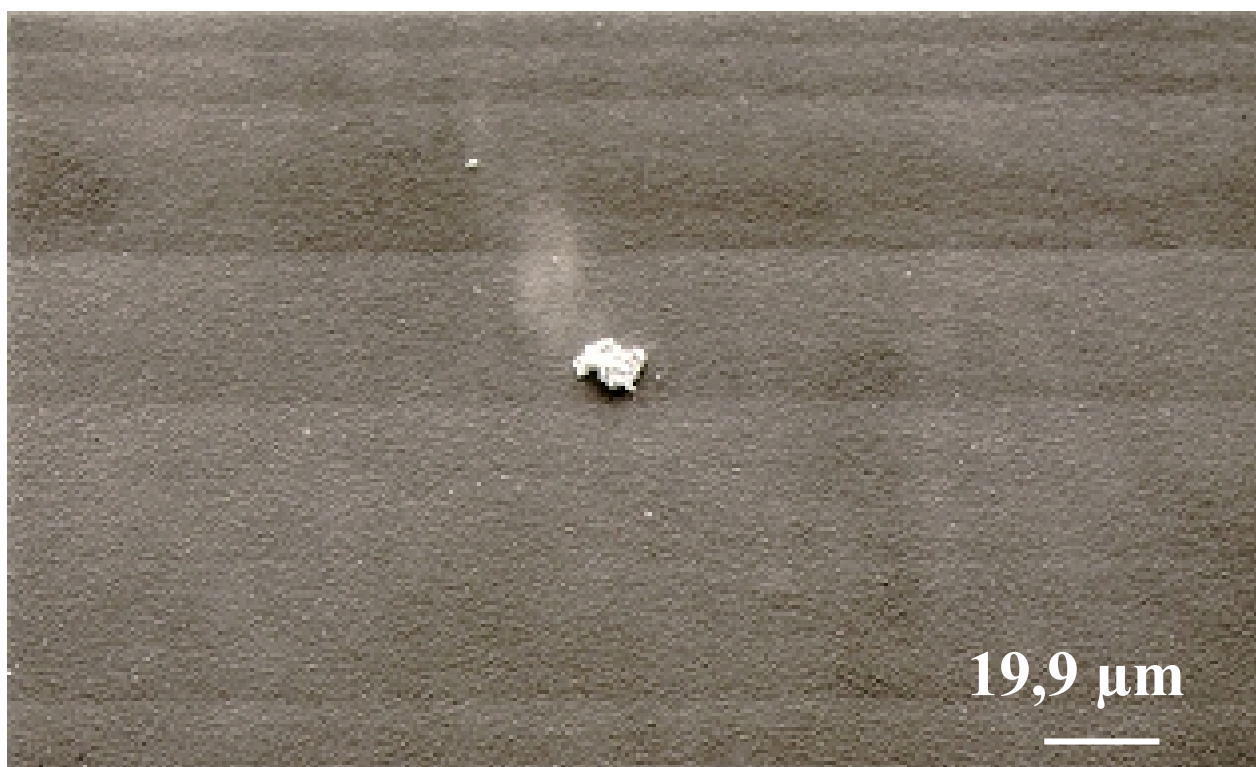


Figure 4 : Observation au microscope électronique à balayage d'une surface interne de tubulure témoin sans biofilm

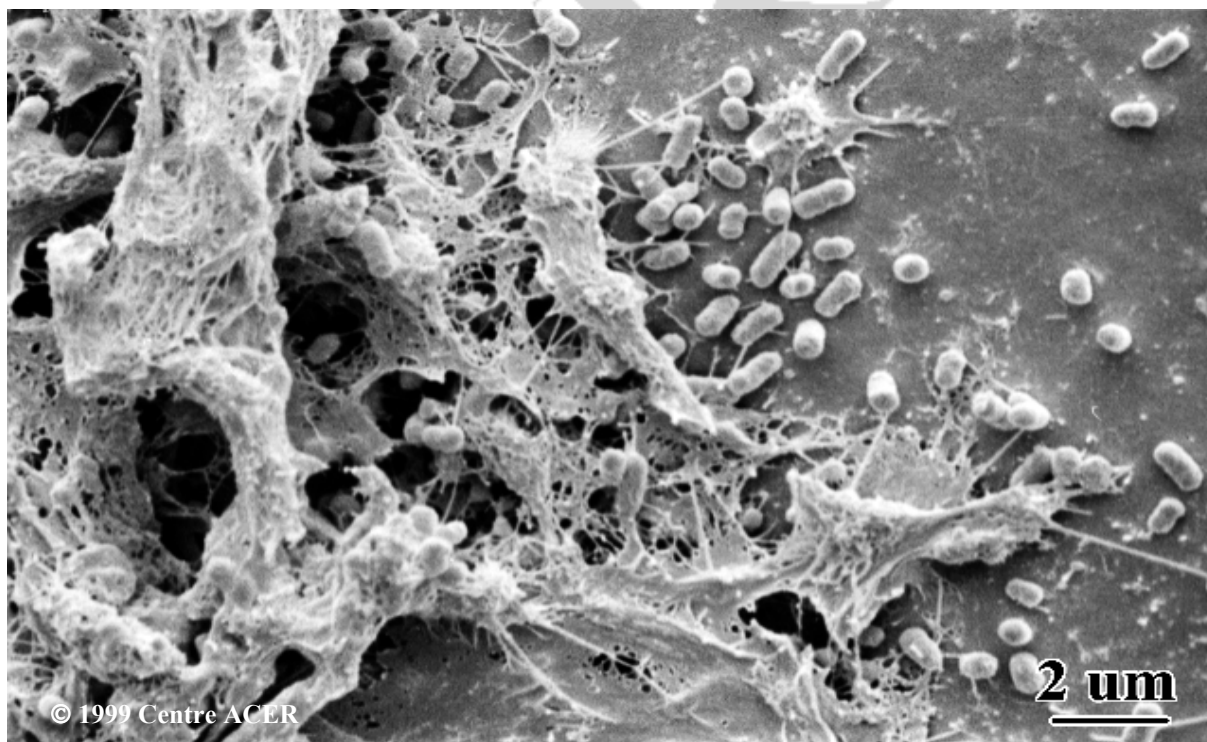


Figure 5 : Observation en microscopie électronique à balayage du biofilm à la surface interne de la tubulure utilisée pour la collecte de l'eau d'érable



Conclusion

Les résultats obtenus de ce projet ont permis d'observer l'évolution de la contamination microbienne de l'eau d'érable durant la saison de coulée. Cette contamination, principalement dominée par les bactéries du genre *Pseudomonas*, était déjà importante dès le début de la saison, ce qui est relativement inhabituel. L'évolution de la contamination semble avoir un lien avec les conditions climatiques qui prévalent. À une période de froid intense, la contamination reste à peu près stable tandis qu'à une période plus chaude de la saison, la coulée est plus importante et la contamination diminue de façon appréciable.

D'autres parts, les résultats obtenus de l'effet des traitements de lavage montrent que l'eau d'érable récoltée après un traitement de lavage à l'eau ou à l'hypochlorite de sodium est légèrement moins contaminée comparativement au témoin sans lavage. Le niveau de contamination de l'eau d'érable reste néanmoins élevée, ce qui contribue à une reprise rapide de la croissance pour obtenir finalement un profil de contamination rejoignant celui du témoin. En dénombrant la flore à la surface de la tubulure avant et après lavage à l'eau, aucune diminution de la contamination n'est observée. Cependant, pour un lavage à l'hypochlorite de sodium, la diminution de la contamination est considérable. Ce résultat semble surprenant puisque aucune diminution de la contamination n'a été observée sur l'eau d'érable suite au lavage à l'hypochlorite de sodium. Or, il serait concevable de penser que la section de tubulure analysée n'est pas représentative de la tubulure entière ou bien que la contamination origine d'une autre source que la tubulure traitée (entaille, portion de tubulure non traitée, ...). Par ailleurs, l'entaillage tardif (50% de la coulée) a permis de constater que la contamination de l'eau d'érable provenant de ces entailles était relativement basse au départ mais qu'elle progressait rapidement pour finalement rejoindre la contamination provenant d'un entaillage en début de saison.

La microscopie électronique quant à elle n'a pas été en mesure de mettre en évidence la formation préférentielle du biofilm par rapport à l'orientation de la tubulure. De même, il a été impossible d'observer l'effet du lavage et la différence entre un lavage à l'eau et un lavage à l'hypochlorite de sodium par un examen au microscope électronique.

Par conséquent, il devient donc difficile de conclure sur l'efficacité du traitement de lavage. La contamination exceptionnellement élevée de la tubulure au départ a eu pour conséquence de diminuer l'effet des traitements de lavage étudiés. Ce qui amène à dire que dans une étude comme celle-ci, plusieurs facteurs interviennent dans l'évaluation des traitements rendant ainsi le contrôle des conditions difficile. Or, dans la poursuite de l'évaluation du traitement de lavage afin d'améliorer la qualité microbiologique de l'eau d'érable, il serait peut être intéressant de concevoir un modèle recréant les conditions de coulée. Ce modèle pourrait vraisemblablement permettre de contrôler les paramètres (débit, niveau de contamination, concentration d'assainissant, température, ...) intervenant dans l'observation des effets mesurés. Les comparaisons des conditions de lavage testées pourront ainsi être plus valables et apporter plus d'informations sur le traitement à utiliser à l'érablière.



Bibliographie

- Andrade, N. J. et Melo Serrano, A. 1993. Use of *Bacillus subtilis* spores to evaluate the efficiency of sodium hypochlorite at different concentration and pH values. Rev. Microbiol., Sao Paulo, 24 (1): 26-31.
- Bourion, F. et Cerf, O. 1996. Disinfection efficacy against pure culture and mixed population biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon and rubber. Sciences des Aliments 16 (2): 151-166
- Conseil des Productions Végétales du Québec (CPVQ). 1984. Érablière : Lavage et Assainissement du Système de Collecte de l'Eau d'Érable. Bibliothèque Nationale du Québec. AGDEX 300/756
- Dumont, J. 1997. Intégrité des produits d'érable : Identification des principaux contaminants potentiels, de leur teneur et des facteurs influençant cette teneur. Troisième partie : Les résidus de produits de lavage : les résidus potentiels de l'hypochlorite de sodium. Groupe de recherche acéricole MAPA.
- Gauthier, Y. et Isoard, P. 1989. L'adhésion des bactéries sur les surfaces. Industries Alimentaires et Agricoles, 106 (1-2) : 31-33.
- Lenahan, R. J. 1992. Peroxyacetic Acid : The new generation sanitizer. MBAA Technical Quaterly, 29 : 53-56.
- National Association of Fresh Produce Processor (NAFPP). 1994. Recommended Sanitary Guidelines for Produce Processing Industry. Deuxième édition.
- Stone, L. S. et Zottola, E. A. 1985. Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. Journal of Food Science 50 : 951-956.