



Contrôle de la contamination de *Listeria monocytogenes* dans les drains d'industries alimentaires

Mémoire

Jérôme Fuchs

Maîtrise en microbiologie agroalimentaire
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Jérôme Fuchs, 2014

Résumé

L'innocuité microbiologique des surfaces a toujours été d'importance capitale en industrie agroalimentaire. Bien que ce point soit connu de tous, les moyens de lutte sont en constante évolution grâce à la compréhension et à la maîtrise de l'adhésion, de la croissance et de la dispersion des microorganismes, afin de lutter contre la propagation et la multiplication de microorganismes pathogènes dans de ce type d'industrie. Dans cette étude, on a cherché à confronter un organisme pathogène alimentaire connu, *Listeria monocytogenes*, à un produit commercial composé d'une matrice détergente classique et d'un consortium bactérien de plusieurs souches de *Bacillus* sélectionnées par notre partenaire industriel en vue de se rapprocher le plus de la réalité des drains en industrie agroalimentaire. Les études ont été réalisées aux températures de 10, 20 et 30°C, dans un système avec ou sans agitation, dans un milieu riche en nutriments (Infusion cœur cerveau en anglais *Brain Heart Infusion*) afin que les nutriments ne soient pas une limite à la croissance. Deux concentrations ont été utilisées dans cette étude, pour l'organisme pathogène (3 et 5 log ufc/mL) et pour le produit commercial (consortium bactérien à 3 et 5 log ufc/mL). Des courbes de croissance en culture pure et en conditions compétitives ont été effectuées afin de comparer l'effet du produit commercial sur *L. monocytogenes*. Un suivi du pH est également réalisé afin d'analyser l'activité microbiologique dans le milieu. On observe que globalement, le produit a la capacité d'inhiber le microorganisme pathogène de plus d'1 log d'ufc/mL. De plus, l'inhibition est favorisée à 10°C lorsque le consortium bactérien est à 5 log ufc/mL et lorsque *L. monocytogenes* est à 3 log ufc/mL. L'agitation a également un effet positif en amplifiant l'inhibition de l'organisme pathogène en favorisant la croissance de la flore compétitive du produit commercial composée essentiellement de microorganismes aérobiques. C'est pour cela que la plus grande efficacité de la méthode est à 10°C en agitation pour la compétition consortium bactérien (avec matrice) à 5 log ufc/mL et *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL. Cet effet pourrait être en partie dû à la matrice détergente qui compose le produit. A 10°C : la première compétition est le consortium à 5 log ufc/mL-*L. monocytogenese* à 5 log ufc/mL, le microorganisme pathogène perd 1 log ufc/mL par rapport aux 5 log d'origine. Le deuxième est le consortium à 5 log ufc/mL- *L. monocytogenese* à 3 log ufc/mL, dans ce cas il diminue jusqu'à passer sous le seuil de détection; une différence de 9 log ufc/mL sépare le dénombrement la culture pure de *L. monocytogenes* par rapport à la culture en compétition dans les mêmes conditions. Alors qu'à 10°C en compétition avec *L. monocytogenes* à 3 et 5 log ufc/mL, lorsque le consortium bactérien est à 3 log ufc/mL cette fois-ci, aucune modification de la croissance de *L. monocytogenes* n'est observée par rapport à sa croissance en culture pure, que ce soit avec ou sans agitation. Ce système est complexe, les phénomènes contrôlant la croissance de ces bactéries dans le milieu sont multiples et agissent en synergie. Le présent document se propose de détailler ces interactions entre les bactéries qui se compétitionnent et la matrice détergente du produit.

Abstract

The microbiological cleanliness of surfaces has always been of paramount importance in the food industry. Although this is known to all, means of ensuring this are constantly improving due to a better understanding of bacterial adhesion, growth and spread, to fight against the propagation and growing pathogenic microorganisms in this type of industry. A known foodborne pathogen: *Listeria monocytogenes* was exposed to a commercial product composed of a conventional detergent matrix and a bacterial consortium of several strains of *Bacillus* selected by our industrial partner seeking to be close to real drain conditions in industrial food processing plants. The experiments are performed at 10, 20 and 30°C, in a system with or without agitation and in an environment rich in nutrients (Brain Heart Infusion) to avoid cell growth restriction. Two concentrations were used in this study for the pathogen (3 and 5 log cfu/mL) and the commercial product (bacterial consortium at 3 and 5 log cfu/mL). Growth curves of pure culture and culture in competition were produced in order to compare the effect of the commercial product on the pathogen. pH monitoring is also carried out to analyze the microbiological activity in the environment. It was observed that the commercial product is able to inhibit the pathogen. Overall, this inhibition is stronger at 30, than at 10 °C. In addition, the inhibition is favored when the bacterial consortium is at 5 log cfu/mL and when *L. monocytogenes* is at 3 log cfu/mL. Agitation also has a positive effect by amplifying the inhibition of the pathogen by promoting the growth of competitive flora of the commercial product consisting mainly of aerobic microorganisms. The greatest efficacy is observed at 10 °C with stirring for two competitions, probably because of the inhibitory effect of the matrix itself. The first competition was when the consortium was at 5 log cfu/mL - pathogen log 5 cfu/mL: pathogen cell counts were reduced by 1 log cfu/mL with an initial 5 log cfu/mL at the beginning. The second concentration was with the consortium at 5 log cfu/mL – pathogen 3 log cfu/mL. In this case, *L. monocytogenes* decrease to go under the detection limit, a difference of 9 log cfu/mL between the pure culture and culture in competition. However, at 10°C in competition, when the bacterial consortium was at 3 log cfu/mL, no change was observed in the growth of *L. monocytogenes* in relation to its growth in pure culture, whether with or without agitation. This system is complex. Phenomena controlling the growth of these bacteria in the environment are multiple and may act synergistically. This document provides details of these interactions with the competing bacteria and the product's matrix.

Table des Matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des Matières	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Remerciements	xv
Introduction.....	1
Revue de littérature	3
1. CARACTÉRISTIQUES DE LISTERIA MONOCYTOGENES	3
1.1. Description de <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.1.1. Origines	3
1.1.2. Caractéristiques générales	3
1.1.3. Exigences nutritionnelles.....	4
1.1.4. Particularités	4
1.1.5. Sensibilité aux antibiotiques/bactériocines.....	4
1.2. Risques alimentaires	5
1.2.1. Virulence et pathogénie	5
1.2.2. La listériose.....	6
1.2.3. Produits à risques.....	9
1.2.4. Conséquences sanitaires	9
2. LA CONTAMINATION BACTERIENNE DANS LES INDUSTRIES.....	11
2.1. La contamination en usine alimentaire	11
2.1.1. Développement bactérien	11
2.1.2. Identification des foyers de contamination de <i>L. monocytogenes</i> dans l'usine	11
2.2. Caractéristiques des effluents dans les drains d'industries alimentaires.....	13
2.2.1. Origine des effluents.....	13
2.2.2. La demande en oxygène des effluents	14
2.2.3. Composition des effluents d'industrie alimentaire	15
2.2.4. Éléments secondaires constituant les effluents	16
2.3. Développement bactérien dans les drains d'eaux usées.....	17
2.3.1. Microorganismes présents dans ces drains	17
2.3.2. Effet de la température dans le cas du développement bactérien dans les drains	18
2.3.3. Moyen de lutte pour inhiber la croissance des bactéries.....	20
2.3.4. Le concept des barrières microbiologiques multiples.....	21
2.4. L'adaptation des bactéries dans un milieu industriel	22
2.4.1. Résistance dans les drains.....	22
2.4.2. Capacité à former des biofilms	22
2.4.3. Le quorum sensing.....	23
3. LE CONCEPT D'EXCLUSION COMPÉTITIVE	25
3.1. Origine du concept : l'Écologie	25
3.2. Exclusion compétitive et biofilms.....	26
3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> et biofilms	26

3.2.2.....	Compétitions bactériennes de <i>L. monocytogenes</i> et autres bactéries au sein d'un biofilm.....	26
3.2.3.	La prévention de l'adhésion des bactéries sur une surface.....	27
3.2.4.	Cultures protectrices et autres produits commerciaux.....	27
Hypothèses et objectifs.....		29
Matériels et méthodes.....		31
1. Croissance en culture pure et compétition.....		31
1.1.	Les souches.....	31
1.2.	Préparation de souches.....	32
1.3.	Préparation du cocktail de <i>Listeria</i>	32
1.4.	Conditions de l'expérimentation.....	32
1.1.	Croissance en culture pure.....	35
1.2.	Croissance en compétition.....	36
1.3.	Analyses statistiques.....	36
2. Interactions microbiennes.....		37
2.1.	Réalisation du tapis bactérien.....	37
2.2.	Centrifugation, filtration, neutralisation, et protéinase.....	37
3. Effet de la matrice détergente du produit commercial.....		39
Résultats.....		41
1. Courbes de croissance.....		41
1.1.	Croissance à 30°C.....	41
1.1.1.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	41
1.1.2.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	44
1.1.3.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	47
1.1.4.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	49
1.2.	Croissance à 20°C.....	51
1.2.1.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	51
1.2.2.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	54
1.2.3.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	56
1.2.4.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	59
1.3.	Croissance à 10°C.....	61
1.3.1.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	61
1.3.2.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	64
1.3.3.	Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	67

1.3.4.Évolution de la croissance en compétition du consortium de <i>Bacillus</i> à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL	69
2. Taux de croissance.....	72
2. Interactions microbiennes.....	75
2.1. Les interactions Bacillus/Listeria.....	75
2.2. Effet de la filtration, centrifugation, neutralisation et de la protéinase	78
3. Effet de la matrice détergente	81
3.1. Résistance à la matrice détergente	81
3.2. Persistance de la matrice détergente	83
Discussions	85
1. Effets des conditions à l'étude sur le comportement des cultures microbiennes.....	85
2. Interactions microbiennes.....	89
3. Effet de la matrice détergente	91
3.1. Résistance à la matrice détergente	91
3.2. Persistance de la matrice détergente	91
Conclusion.....	93
Bibliographie	95
Annexe A : Calcul du taux de croissance (Prescott et al., 2003)	107
Annexe B : Données des courbes de croissance en culture pure.....	109
Annexe C : Données des courbes de croissance en compétition.....	115
Annexe D : Données des courbes de pH en culture pure.....	127
Annexe E : Données des courbes de pH en compétition.	133

Liste des tableaux

Tableau 1 Composition des effluents d'industrie de produits carnés.....	15
Tableau 2 Composition des effluents d'industrie laitière.....	16
Tableau 3 Phase de latence pour <i>Pseudomonas</i> à différentes températures.....	19
Tableau 4 Origine et numéro de référence des souches utilisées.....	31
Tableau 5 Plan d'expérimentation des courbes de croissance en cultures pures.....	33
Tableau 6 Plan d'expérimentation des courbes de croissance en compétitions.....	34
Tableau 7 Taux de croissance à 30, 20 et 10°C du consortium de <i>Bacillus</i> et du cocktail de <i>Listeria</i> en culture pure et en compétition.....	72
Tableau 8 Interactions entre <i>Bacillus/Listeria</i>	77
Tableau 9 Effet de différents traitements de centrifugation, neutralisation et filtration sur l'inhibition des souches.....	78
Tableau 10 Zone d'inhibition (mm) de la matrice détergente sur les souches du cocktail de <i>Listeria monocytogenes</i>	82

Liste des figures

Figure 1 Le cycle d'infection de <i>L. monocytogenes</i> chez l'homme.....	6
Figure 2 Cycle d'infection intracellulaire de <i>L. monocytogenes</i>	8
Figure 3 Représentation d'un écoulement laminaire et turbulent	17
Figure 4 Cinétique de croissance bactérienne.....	18
Figure 5 Courbes de croissance des micro-organismes psychrophiles, mésophiles et thermophiles selon la température	19
Figure 6 Courbes de croissance de deux microorganismes en culture pure <i>versus</i> en compétition en fonction du temps (jours).....	25
Figure 7 Méthodologie de la croissance en culture pure	35
Figure 8 Méthodologie de la croissance en compétition	36
Figure 9 Courbes de croissance à 30°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	42
Figure 10 Suivi de l'évolution du pH à 30°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	43
Figure 11 Courbes de croissance à 30°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	44
Figure 12 Suivi de l'évolution du pH à 30°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	46
Figure 13 Courbes de croissance à 30°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	47
Figure 14 Suivi de l'évolution du pH à 30°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	48
Figure 15 Courbes de croissance à 30°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	49
Figure 16 Suivi de l'évolution du pH à 30°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	50
Figure 17 Courbes de croissance à 20°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	52
Figure 18 Suivi de l'évolution du pH à 20°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	53
Figure 19 Courbes de croissance à 20°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	55
Figure 20 Suivi de l'évolution du pH à 20°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	56
Figure 21 Courbes de croissance à 20°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	57
Figure 22 Suivi de l'évolution du pH à 20°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	58
Figure 23 Courbes de croissance à 20°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	59
Figure 24 Suivi de l'évolution du pH à 20°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	60
Figure 25 Courbes de croissance à 10°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log	

ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	61
Figure 26 Suivi de l'évolution du pH à 10°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	63
Figure 27 Courbes de croissance à 10°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	65
Figure 28 Suivi de l'évolution du pH à 10°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	65
Figure 29 Courbes de croissance à 10°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	67
Figure 30 Suivi de l'évolution du pH à 10°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	69
Figure 31 Courbes de croissance à 10°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	70
Figure 32 Suivi de l'évolution du pH à 10°C du consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 3 log ufc/mL.....	71
Figure 33 Zone d'inhibition d'une culture de <i>Bacillus subtilis</i> (B6) sur <i>Listeria monocytogenes</i> (L27).....	75
Figure 34 Photographie du puits rempli par <i>Bacillus licheniformis</i> (B1) et de son interaction sur le tapis bactérien de <i>Bacillus subtilis</i> (B3). On rajoute de la protéinase K sur le coté gauche du puits.	79
Figure 35 Persistance de la matrice détergente lors de la compétition à 20°C entre le consortium de <i>Bacillus</i> initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de <i>L. monocytogenes</i> à 5 log ufc/mL.....	83

Remerciements

Bien que j'ai su découvrir mon attachement à la microbiologie lors de mes études universitaires de premier cycle, c'est grâce au cheminement réalisé en vue de la maîtrise que j'ai compris que cette discipline suscite en moi une vraie vocation. Après l'effet « ouvre boîte », et mes débuts d'intérêts en France pour la microbiologie, c'est au Québec, que j'ai enfin pu prendre mon envol. Je tiens donc à remercier tout particulièrement madame la professeure Linda Saucier qui m'a donné la chance de continuer mes études dans un environnement riche en connaissances et en partage. Elle m'a permis d'approfondir mon savoir microbiologique et d'en redemander, ce qui a provoqué en moi l'effet « tremplin » qui me permet d'accroître non seulement mon intérêt pour cette discipline, mais également mon attachement à la complexité du monde de la recherche.

Je tiens également à remercier mes pairs et amis qui ont su m'apporter conseil et aide aux moments opportuns, il s'agit d'Anthony, Khadidja, Elodie, Ida, Philippe, Marie-Pierre et Alessandra. C'est grâce à leur talent, que j'ai pu améliorer mes connaissances en microbiologie agroalimentaire, en biologie moléculaire et en analyse statistique.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers les contacts que j'ai eu au sein de la compagnie qui commercialise le produit à l'étude, sans pouvoir les nommer, question de confidentialité.

Je remercie particulièrement mes amis français et québécois qui ont permis mon intégration dans ce beau pays, faisant de moi un étudiant rapidement adapté à ce nouveau milieu.

Pour finir, je tiens à remercier le personnel et les professeurs du Département des sciences animales, pour leurs conseils avisés et pour la formidable ambiance générale et l'entraide qui règnent au pavillon Paul-Comtois.

Introduction

L'une des premières obligations de l'industrie alimentaire est de fournir à ses consommateurs un produit qui n'aura aucun effet néfaste sur leur santé. C'est pourquoi il est si important de contrôler la provenance des aliments, mais également l'hygiène générale des industries, comme celle de la transformation des produits laitiers et carnés. Dans les usines, l'innocuité microbiologique du matériel utilisé ainsi que celle de l'environnement général est un facteur crucial.

La crise de la listériose en août 2008, ayant pour origine une contamination de certains produits transformés de la compagnie Maple Leaf Foods ainsi que ceux de plusieurs petites fromageries, a bouleversé les consommateurs québécois. Cette maladie, causée par une bactérie pathogène, *Listeria monocytogenes*, peut provoquer des cas d'avortement et dans le pire des scénarios, peut causer la mort (Weatherill, 2009). Les autorités ont donc dû proposer des mesures pour que ce genre d'incident ne survienne pas à nouveau. La vigilance a de plus été augmentée sur les sites spécifiques de contamination à l'intérieur des usines. Dans ces sites, les drains sont d'un intérêt capital alors que tout semble propre, les microorganismes présents dans ceux-ci peuvent toujours proliférer et constituer une source de contamination.

Les pertes de profits reliées à un rappel de produits ou à des arrêts de production dus aux contaminations sont importants et doivent être évités. C'est pourquoi, les compagnies oeuvrant dans le domaine de l'hygiène cherchent continuellement à améliorer l'efficacité de leurs produits de nettoyage et de désinfection pour lutter contre la prolifération et surtout l'adhésion de microorganismes pathogènes sur les différentes surfaces des usines. C'est le cas de notre partenaire industriel, qui cherche à développer des produits à la fine pointe de la biotechnologie. Certains produits de la compagnie combinent ainsi une matrice détergente à des cultures bactériennes. C'est le cas de ce produit à l'étude dans ce projet. Principalement formulé pour limiter les odeurs, il est actuellement employé dans les drains d'industries alimentaires pour éliminer les nutriments présents dans les drains à l'aide de l'action combinée de la matrice détergente et de la culture active. Une nouvelle application de ce produit pourrait être possible si les organismes qu'il contient pourraient contrôler, en exerçant une exclusion compétitive, la microflore indésirable des usines de transformation alimentaire. Toutefois cette capacité à exercer une exclusion compétitive est une hypothèse qui reste à démontrer.

Revue de littérature

1. CARACTÉRISTIQUES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

1.1. Description de *Listeria monocytogenes*

1.1.1. Origines

Listeria monocytogenes a été isolée pour la première fois au début du XX^e siècle dans plusieurs échantillons de tissus de patients infectés. En 1919, Hulphers a nommé la bactérie *Bacillus hepatis* car il l'avait isolée à partir des foyers nécrotiques d'un foie de lapin. En 1926, Murray et ses collègues ont adopté le nom de *monocytogenes* comme nom d'espèce pour décrire un bacille provoquant une monocytose puissante chez les lapins (Murray, *et al.*, 1926).

En 1927, en l'honneur de Lord Joseph Lister, Pirie nomme *Listerella hepatolytica* le bacille responsable d'une épizootie parmi les rongeurs dans la région du fleuve Tigre en l'Afrique du Sud. En 1929, les premiers isolements de ces bactéries provenant d'humains ont été signalés par A. Nyfeldt (1929). Un autre cas humain a été décrit lorsque des diphtéroïdes ont été isolés à partir de cultures liquides céphalo-rachidiennes d'un patient présentant une méningite (Cotoni, 1942). En 1940, les bactéries désignées par le terme *monocytogenes* ont reçues le terme définitif de « *Listeria* » pour nommer le genre de ces bactéries (Gray et Killinger, 1966; Seeliger et Jones, 1986).

1.1.2. Caractéristiques générales

La bactérie *L. monocytogenes* est un bacille à Gram positif, non sporulant et ne produisant pas de capsule. Les cellules de *Listeria* se retrouvent isolées ou en courtes chaînettes et sont généralement motiles à condition que les cultures soient effectuées à 20-25 °C, températures auxquelles les flagelles péritriches (1 à 5) nécessaires à la motilité se développent ; ces bactéries sont non-motiles à 37°C (Peel, *et al.*, 1988).

Le genre *Listeria* comporte sept espèces reconnues. Parmi ces espèces, seules les espèces *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. seeligeri* ont été associées à des pathologies chez l'humain ou chez l'animal. Mais d'après Larpent (2000) c'est *L. monocytogenes* qui cause la majorité des infections associées au genre *Listeria*. *L. monocytogenes* est responsable d'infections sévères (nommé listérioses) chez l'homme et les animaux provoquant des méningo-encéphalites, des avortements ou des septicémies (Guillier, 2005).

1.1.3. Exigences nutritionnelles

L. monocytogenes est mésophile, mais il peut croître à des températures variant entre -2 et 45 °C, ce qui implique qu'il possède également un profil psychrotrophe, profil problématique en alimentation puisque ces organismes sont capables de proliférer dans les aliments malgré la chaîne du froid (Branger, 2009). Ces bactéries sont chimio-organotrophes et croissent en milieu complexe ; elles ont la capacité de produire de l'acide lactique par fermentation de certains glucides. Elles sont également anaérobies facultatives (Larpen, 2000).

L. monocytogenes est largement répandu dans la nature et peut être généralement trouvé dans le sol, la végétation en décomposition, les eaux résiduaires et les eaux usées (Schuchat, *et al.*, 1991). Ce micro-organisme ubiquitaire a également été isolé chez de plus de 50 différentes espèces animales, y compris les oiseaux, les poissons et les crustacés (Farber et Peterkin, 1991). On estime que 1 à 5% des êtres humains sont porteurs asymptomatiques de *L. monocytogenes* dans leur intestin (Lorber, 1997). En raison des multiples niches écologiques dans lesquelles *L. monocytogenes* peut être isolé, les origines des infections humaines ont longtemps été incertaines, mais des études épidémiologiques ont fourni des preuves de l'origine alimentaire pour deux foyers d'infection et lors d'épisodes sporadiques de listériose (Gellin et Broome, 1989 ; Schlech *et al.*, 1983). La contamination par *Listeria* a été décrite dans le lait, le fromage, les légumes crus, le poisson, la volaille, et les produits carnés (Dalton, *et al.*, 1997).

1.1.4. Particularités

La persistance de *L. monocytogenes* dans une grande variété d'aliments est principalement liée à sa capacité à survivre et se multiplier dans des conditions extrêmes, telles que des températures de réfrigération (1 à 10 ° C), un pH bas (3,6 à 5,0), et des concentrations élevées de NaCl (5 à 10% ; Conner *et al.*, 1986). De plus, *L. monocytogenes* est catalase positive et oxydase négative (George *et al.*, 1988). Cette bactérie a la capacité de croître en présence de nalidixine (Branger, 2009).

1.1.5. Sensibilité aux antibiotiques/bactériocines

D'après Larpen (2000), plusieurs antibiotiques sont efficaces pour traiter la listériose, les principaux étant : l'ampicilline, la gentamicine, la pénicilline, l'érythromycine, le chloramphénicol (peu utilisé en antibiothérapie en raison de sa forte toxicité) et la tétracycline. Les écrits de Buchanan et Gibbons (1974) appuient ces résultats, et ils affirment qu'il existe une variabilité à cette sensibilité en fonction des souches de *L. monocytogenes*.

Concernant les bactériocines, il existe de nombreuses interactions entre bactériocines et micro-organismes dans la littérature. Par exemple, la nisine est efficace contre *L. monocytogenes in vitro* (Katla *et al.*, 2003) ou dans la viande (de type saucisse ; Garriga *et al.*, 2002). De Barbeyrac (2002) nous apprend également que la pédiocine est une bactériocine efficace contre *L. monocytogenes*.

1.2. Risques alimentaires

1.2.1. Virulence et pathogénie

Les infections à *L. ivanovii* sont plus fréquentes chez les animaux que chez les humains. La principale bactérie responsable des cas de listérioses humaines est *L. monocytogenes*. (Lamont *et al.*, 1988). Au moins 16 sérotypes de *L. monocytogenes* sont reconnus. Les deux antigènes de surface, flagellaire et somatique (contenant des glucides), contribuent à la désignation sérotypique de *L. monocytogenes* (Seeliger et Hohne, 1979). Trois sérotypes (4b, 1/2a, et 1/2b) sont responsables à eux seuls d'environ 90% des pathologies humaines (Schuchat *et al.*, 1991). Cependant, aucune corrélation directe n'a été trouvée avec un génotype particulier qui pourrait expliquer les caractéristiques de virulence particulière de ces sérotypes. Bien que la listériose puisse affecter des personnes en bonne santé (Schlech *et al.*, 1983), *L. monocytogenes* reste un pathogène opportuniste qui a une prédilection pour les personnes présentant un déficit immunitaire comme le fœtus, les nouveau-nés, les femmes enceintes, et les personnes âgées (Lorber, 1997). Les patients transplantés, les patients cancéreux recevant un traitement, ou les individus traités avec des corticostéroïdes sont particulièrement à risque pour contracter une infection sévère. Le risque de listériose est également nettement augmenté chez les individus infectés par le VIH (Jurado, 1993 ; Jensen *et al.*, 1994). La concentration de la bactérie peut augmenter dans les produits réfrigérés de moins de 100 cellules par gramme, ce qui dans de nombreuses études est considéré comme la plus forte dose acceptable pour les personnes en bonne santé (Buchanan *et al.*, 2000). Comme il est indiqué précédemment, *L. monocytogenes* a une large gamme d'hôtes et peut infecter les humains et les animaux, provoquant des infections impliquant principalement le système nerveux central et l'unité foeto-placentaire avec un taux de mortalité élevé, soit 30% (Huss *et al.*, 2000).

La listériose se présente chez l'homme sous deux principales formes : la listériose périnatale et la listériose chez l'adulte. Pour ces deux formes, les signes cliniques apparaissent principalement sous forme de septicémie généralisée ou d'infection du système nerveux central, ou SNC (Vásquez-Boland *et al.*, 2001). Les principales affectations cliniques du SNC par *L. monocytogenes* sont la méningite et l'encéphalite diffusée ou localisée (Charlton, et Garcia, 1977). Par rapport à *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, qui peuvent également causer la méningite, une méningite causée par *Listeria* présente un taux de mortalité plus élevé (Mylonakis *et al.*, 1998). L'infection du tronc cérébral avec *L. monocytogenes* provoque principalement une rhombencéphalite, une complication de la listériose humaine semblable à la listériose ovine (Gill, 1933 ; Uldry *et al.*, 1993).

1.2.2. La listériose

1.2.2.1. Les étapes de l'infection

A l'exception de la transmission de la mère au fœtus et des cas sporadiques en raison d'un contact direct avec des animaux infectés (McLauchlin et Low, 1994), l'infection humaine avec *L. monocytogenes* est initiée par la consommation d'aliments contaminés (Fleming *et al.*, 1985 ; Linnan *et al.*, 1988).

Tout d'abord, la bactérie entre dans l'organisme par le tube digestif. La progression se poursuit par le passage à travers la paroi intestinale, puis migre jusqu'au foie pour s'y multiplier. Finalement, l'infection atteint chez la femme l'utérus et le fœtus et envahit le système nerveux central (Moroni, 2007). Les principales étapes du parcours de *L. monocytogenes* sont schématisées à la figure 1.

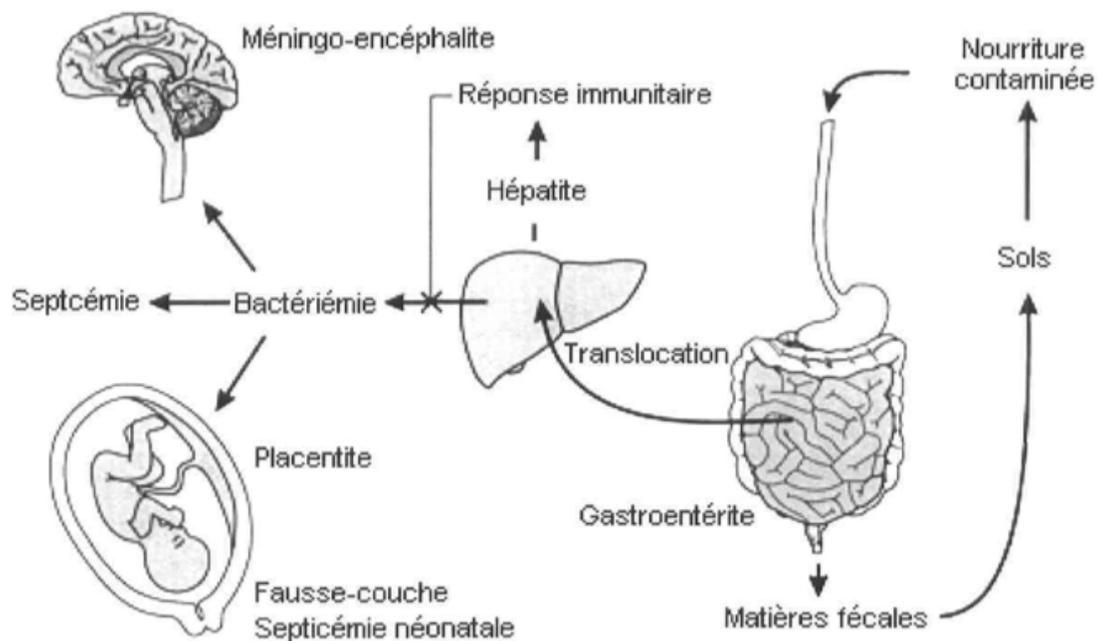


Figure 1 Le cycle d'infection de *L. monocytogenes* chez l'homme

D'après Moroni (2007).

Il est cependant important de mentionner que les conditions acides extrêmes rencontrées par *L. monocytogenes* le long du tube digestif permettent de détruire un nombre conséquent de bactéries. Toutefois si le microorganisme pathogène est en concentration suffisante dans l'aliment d'origine, un nombre adéquat de cellules viables pourra survivre et infecter l'individu. L'infection par *L. monocytogenes* dépend donc de la charge bactérienne dans l'aliment contaminé, de la virulence de la souche ingérée et de l'état du système immunitaire de l'hôte. Dès lors, les étapes de l'infection s'enchaînent comme suit (figure 1):

- Le pathogène traverse la paroi intestinale par l'invasion des cellules épithéliales de l'intestin (Râcz *et al.*, 1972) et/ou au niveau des plaques de Payer (Marco *et al.*, 1997).

- Une fois cette barrière traversée, la bactérie utilise le réseau sanguin ou le réseau lymphatique pour envahir des organes cibles : la rate et le foie. Bien que les macrophages diminuent rapidement la population de ce microorganisme pathogène (6 heures), les bactéries survivantes se reproduisent à l'intérieur des hépatocytes (Cousens et Wing, 2000). Cette reproduction étant intracellulaire, le système immunitaire, par le biais des anticorps, est incapable de lutter contre cette infection, car les défenses du système immunitaire humain sont incapables de franchir les membranes cellulaires. Chez un individu en bonne santé, les hépatocytes produisent des facteurs chimiotactiques reconnus par les neutrophiles (apparentées aux leucocytes), éliminant ainsi l'infection en moins d'une semaine (Rogers *et al.*, 1996). Par contre, chez un individu immunodéprimé, la multiplication du microorganisme peut se poursuivre par une libération des bactéries dans la circulation sanguine et provoquer une septicémie et ainsi aboutir à l'infection du système nerveux central (SNC) et de l'utérus (Vásquez-Boland *et al.*, 2001).

- Une fois l'utérus contaminé, l'infection peut se propager à travers la paroi utérine d'une femme enceinte, infecter le fœtus et provoquer sa mort *in utero* (Vásquez-Boland *et al.*, 2001).

- L'infection du SNC chez l'adulte cause le plus souvent des méningites.

1.2.2.2. *Le cycle intracellulaire*

En plus des étapes générales d'infection (présentées plus haut), nous développerons ici plus précisément la reproduction du pathogène dans l'organisme. D'après Vásquez-Boland *et al.* (2001), *L. monocytogenes* est un parasite intracellulaire facultatif qui peut se développer autant à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules eucaryotes. Toutefois c'est son cycle de reproduction intracellulaire, principal mode de reproduction lors d'une infection, qui présente le plus d'intérêt car la réponse immunitaire adaptative est incapable de lutter contre ce type de reproduction. En effet, les pores de la membrane cellulaire infectée par le microorganisme pathogène ne laisse pas pénétrer les anticorps ou les leucocytes qui dans le sang, peuvent détruire la bactérie. Bien que *L. monocytogenes* soit capable de se reproduire dans plusieurs types de cellules (phagocytaires ou non), comme les macrophages, les cellules épithéliales, les hépatocytes, les cellules endothéliales et une variété de cellules nerveuses comme les neurones, le cycle de reproduction intracellulaire est identique. Ce cycle de reproduction intracellulaire est présenté à la figure 2 et comporte les étapes suivantes :

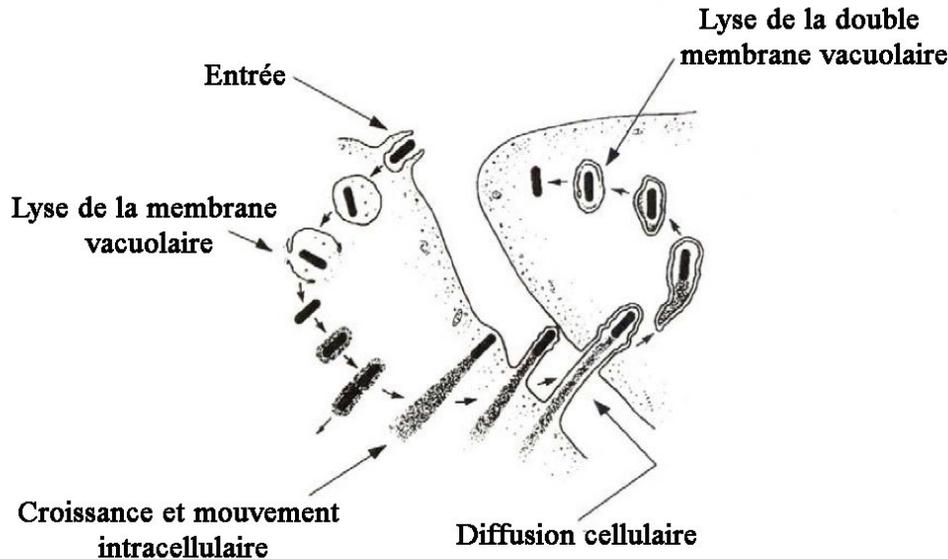


Figure 2 Cycle d'infection intracellulaire de *L. monocytogenes*

Adapté de Tilney et Portnoy, 1989.

- Ce cycle débute avec l'adhésion des bactéries à la surface de la cellule cible puis par leur pénétration. Cette adhésion est réalisée par la gamme de ligands protéiques utilisée par la bactérie. Par interaction entre ligands et récepteurs membranaires, la bactérie progresse dans la cavité formée à la surface cellulaire pour être définitivement absorbée. Le type de mécanisme est appelé un mécanisme « zipper » (Dortet *et al.*, 2009).
- Au début de la reproduction intracellulaire, la bactérie va se dégager de la vacuole phagocytaire par hémolyse bactérienne impliquant des phospholipases. Deux heures après la pénétration, plus de la moitié des bactéries se retrouve libre dans le cytoplasme (Vásquez-Boland *et al.*, 2001).
- Une fois ces pathogènes libres dans le cytoplasme de la cellule, les bactéries commencent à se multiplier grâce au contenu cytoplasmique. Le temps de génération est d'environ une heure (Vásquez-Boland *et al.*, 2001).
- Une fois les bactéries libérées dans le cytoplasme, de nombreux filaments d'actine recouvrent la bactérie et s'organisent en une queue d'environ 40 μm de longueur. Cette queue permet le déplacement aléatoire de la bactérie, à une vitesse de 0,3 $\mu\text{m/s}$ dans le cytoplasme. Lors de ce déplacement, il arrive que la bactérie entre en contact avec la paroi de la cellule, l'étire, et entre en contact avec la paroi d'une cellule limitrophe. La contamination se propage donc à une nouvelle cellule. A ce stade et de la même manière qu'à l'étape initiale, la bactérie se retrouve dans le cytoplasme de la nouvelle cellule captive cette fois-ci dans une nouvelle double membrane. De même que pour la première cellule contaminée, la bactérie se libère des membranes, ce qui permet de se multiplier à nouveau, tout en évitant le passage par la circulation sanguine et donc en esquivant toutes réponses immunitaires humorales (ou adaptative) (Dortet *et al.*, 2009).

1.2.3. Produits à risques

La capacité du microorganisme à croître aux températures normales de réfrigération représente le plus important facteur responsable de la contamination des aliments par *L. monocytogenes* (Lou et Yousef, 1999). *L. monocytogenes* est parfois présent en petite concentration dans plusieurs fourrages destinés aux animaux d'élevage (Wilkinson 1999) et est retrouvé fréquemment dans beaucoup d'aliments comme les produits laitiers (Rudolf et Scherer, 2001), les produits carnés et les aliments prêts à la consommation (Larpen, 2000). De plus, les épidémies de listériose sont de plus en plus fréquentes et sont notamment associées à des aliments comme le lait, le fromage et les produits carnés (Rocourt, 1996). C'est dans l'optique de diminuer cette contamination des aliments par ce microorganisme pathogène que l'industrie alimentaire essaie de développer de nouvelles stratégies pour limiter sa propagation.

1.2.4. Conséquences sanitaires

La transmission d'origine alimentaire de la listériose a été suggérée tôt dans la littérature médicale, mais n'a été définitivement documentée qu'en 1981 lors d'une investigation sur une éclosion survenue en Nouvelle Ecosse, au Canada (Schlech, 1983). Il a été démontré, par des enquêtes épidémiologiques, que la listériose est une toxi-infection d'origine alimentaire (Embarek, 1994; Slutsker et Schuchat, 1999), ce qui signifie que la consommation d'aliments contaminés est le mode de transmission principal de la listériose. Les aliments ont été identifiés comme étant le vecteur de plusieurs graves épidémies (> 30% des cas) de listériose depuis 1981 (Swaminathan, 2001). Une autre épidémie de listériose, aux USA (Massachusetts) en 1979, a sans doute été causée par du céleri cru et de la laitue servie comme garniture avec d'autres aliments (Ho *et al.*, 1986). Cependant, il existe plusieurs façons de prévenir la contamination des aliments par *L. monocytogenes*, mais les concepts mis en évidence ne sont pas encore maîtrisés. En effet, Mahoney et Henriksson (2003) ont étudié l'effet de la consommation d'un salami contenant des souches probiotiques sur une infection à *L. monocytogenes* sur des souris par contamination de leurs rations. De même, plusieurs études ont utilisé des modèles *in vitro* d'adhésion cellulaire pour évaluer le potentiel inhibiteur de souches probiotiques contre *L. monocytogenes* (Sevin, 2004). Dans ces deux cas, l'inhibition du microorganisme a été constatée, mais cette diminution peut être causée par plusieurs phénomènes : l'emprisonnement de l'organisme pathogène dans la matrice alimentaire, la compétition pour les nutriments entre l'organisme pathogène et le probiotique, et finalement la production d'agents antimicrobiens par la culture probiotique.

Plus récemment, depuis 2005, un bactériophage virulent (P100) et lytique, qui peut infecter et tuer la majorité des *L. monocytogenes* a été caractérisé et évalué. Ce dernier a été considéré comme hautement efficace contre ce microorganisme pathogène sur du poisson cru (Montañez-Izquierdo *et al.* 2012). Ne pouvant se contenter que d'un seul organisme efficace, notamment à cause de la capacité des bactéries à s'adapter pour survivre (voir point 2.4). La recherche se doit donc de trouver de nouveaux moyens de lutte efficaces contre la propagation de cet organisme pathogène, en ciblant un point stratégique : les industries agroalimentaires.

2. LA CONTAMINATION BACTERIENNE DANS LES INDUSTRIES

2.1. La contamination en usine alimentaire

2.1.1. Développement bactérien

Les contaminations primaires et secondaires sont les deux composantes de la contamination en usine agro-alimentaire. La contamination primaire est celle causée par la microflore du sol, de l'eau (incluant les eaux d'égout) ainsi que les matières premières d'origine animale ou végétale (contamination de surface). La contamination secondaire quant à elle, est la conséquence de l'ensemble des risques provoqués par la transformation de l'aliment. C'est-à-dire, les lieux de travail (surfaces, équipements, instruments de travail, équipements), les manipulations par les humains, les ingrédients qui entrent dans la formation de l'aliment, l'ensemble des traitements et des procédés de transformation, l'entreposage, le transport et la commercialisation du produit (Guiraud, 2003).

Bien que le contrôle de la contamination primaire soit décisif pour assurer l'innocuité microbiologique des aliments, la contamination secondaire est devenue une priorité pour les industriels (Sofos, 1998). La problématique de la contamination croisée en industrie est constante et malgré les efforts réalisés, comme le système de « marche en avant » ou les programmes HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point; Mortlock, 1999), on remarque que non seulement les humains sont des vecteurs de contaminations bactériennes, mais également les équipements (Weatherill, 2009). Il reste encore les mauvaises pratiques d'hygiène causant une contamination croisée, comme le mauvais lavage des mains (Cogan *et al.*, 2001), ou l'utilisation inadéquate des ustensiles et des matériaux (Altekruse *et al.*, 1995; Knabel, 1995; Beumer et Giffel, 1999). De plus, il a été rapporté que le mauvais nettoyage et assainissement des structures ou des surfaces des équipements, dans lesquels les cellules bactériennes peuvent être adaptées, peut faciliter la contamination croisée des aliments (Dykes, 2003 ; Taulo *et al.*, 2008).

2.1.2. Identification des foyers de contamination de *L. monocytogenes* dans l'usine

Dans les pays nordiques, de 4 à 8 cas par million d'habitants sont signalés chaque année (Anon., 2001). Tous les pays nordiques ont un système de notification pour *L. monocytogenes*. La concentration de la bactérie peut augmenter dans les produits réfrigérés de moins de 100 cellules par gramme à plus de 100 000 cellules par gramme, sur une période de 3-4 semaines, pendant la durée de vie de nombreux produits alimentaires (Miettinen *et al.*, 1999). Ainsi, les produits alimentaires prêt-à-manger qui sont stockés à la température de

réfrigération pendant plus de 10-15 jours et qui sont consommés sans chauffage suffisent pour tuer les cellules bactériennes vivantes, appartiennent au type de denrées alimentaires à risque de causer la listériose. Il a également été signalé que le temps de génération de *L. monocytogenes* est plus court dans les fruits de mer (pH 6.1 à 7.6) que dans les viandes (pH 5.1-6.2). Ceci est en partie dû à l'impact du pH sur sa croissance, ce taux de croissance étant favorisé à un pH approchant de la neutralité (Shineman et Harrison, 1994). Bien que *L. monocytogenes* et d'autres espèces de *Listeria* ont été isolés à partir de nombreux types d'aliments bruts et transformés, les principales sources et les vecteurs de contamination ne sont pas encore complètement élucidés (Ojeniyi *et al.*, 1996; McCarthy, 1997; Valdimarsson *et al.*, 1998; Gravani, 1999; Nørrung *et al.*, 1999; Capita *et al.*, 2001).

L. monocytogenes a été isolé dans 4,27% des échantillons provenant de gâteaux recueillis dans différents hôtels, restaurants et pâtisseries (Uhtil *et al.*, 2004). *L. monocytogenes* survit également dans les lubrifiants utilisés dans l'industrie alimentaire, en particulier lorsque les lubrifiants sont contaminés par des matières organiques et de l'eau (Aarnisalo *et al.*, 2007). La filière porcine, de l'abattoir à l'usine de transformation, est particulièrement sensible au risque de contamination par *L. monocytogenes*, du fait de sa présence dans le tractus intestinal ou sur la peau des porcs, de la contamination croisée, en particulier, dans les chambres froides et les salles de découpe (Giovannacci *et al.*, 1999).

Les siphons de sol dans les installations de transformation des aliments constituent un réservoir particulièrement important pour la persistance de *Listeria* et peuvent être un point de contamination dans l'environnement des installations de traitement et, éventuellement, dans les produits alimentaires (Kathariou, 2002). La décontamination des drains de plancher pour éliminer *Listeria* spp. est particulièrement difficile puisque la bactérie s'y retrouve à l'intérieur d'un biofilm. *L. monocytogenes* bénéficie ainsi d'une protection additionnelle contre les désinfectants et les traitements disponibles pour contrôler les microorganismes pathogènes sur les surfaces en industrie (Milohanic *et al.*, 2004 ; Taormina et Beuchat, 2001 ; Timmerman *et al.*, 2004). La mise en place des biofilms par des bactéries pathogènes dans les drains de plancher dans les usines de transformation des aliments protège les cellules contre les régimes de nettoyage efficaces et réduit ou minimise l'efficacité des traitements bactéricides. Des études ont montré que *L. monocytogenes* évolue au sein de la microflore mixte des biofilms dans des environnements de transformation des aliments et que les drains d'industrie peuvent ainsi être une source majeure de contamination (Borucki I., 2003 ; Jams I., 1986 ; Tompkin, 2002). De plus il a été démontré que *L. monocytogenes* peut se disséminer dans plusieurs locaux séparés physiquement (mur, plusieurs portes, etc.) en utilisant les drains d'une usine alimentaire et contaminer les surfaces de travail et finalement les aliments (Lundén *et al.*, 2003).

2.2. Caractéristiques des effluents dans les drains d'industries alimentaires

Les industries de viandes, volailles et laitières produisent les plus importantes charges de déchets de toute l'industrie alimentaire (Cournoyer, 1996). Les industries de viandes comprennent les abattoirs et les usines de transformations qui préparent, découpent, cuisent, salent, fument et transforment ces viandes en produits carnés. Ce sont les abattoirs qui sont les unités les plus polluantes de l'industrie des produits carnés. Les déchets provenant de ces établissements contiennent diverses quantités de sang, graisses, déchets solides et liquides pouvant servir de nutriments aux micro-organismes de tous genres (Cournoyer, 1996). Les points qui suivent tentent d'expliquer comment un organisme pathogène alimentaire peut se développer dans ces matrices organiques.

2.2.1. Origine des effluents

On nomme co-produits tous les éléments de la carcasse valorisables en industrie agroalimentaire. Les sous-produits sont les organes valorisables en alimentation animale ou dans des filières autres que la valorisation en alimentation humaine (industrie pharmaceutique, cosmétologie, etc.). Les déchets sont donc des substances organiques qui ne répondent pas aux critères de transformation ou de valorisation de ces filières. L'ensemble des déchets générés par les industries d'abattage peuvent être à l'origine de pollution et de nuisances pour l'environnement (Herau, 2003). En abattoir, les déchets sont de trois types :

- Les déchets solides
- Les déchets liquides
- Les boues

2.2.1.1. *Les déchets solides*

Parmi les déchets solides, on distingue d'une part les déchets carnés qui regroupent :

- les abats, les boyaux ;
- les corps gras ;
- les os, cornes, sabots, onglons ;
- les poils, les soies et les cuirs ;
- les déchets divers récoltés lors du balayage des différents postes, les déchets solides issus du prétraitement des effluents liquides.

D'autre part, on distingue les déchets non carnés que sont les déjections, lisiers, fumiers, et matières stercoraires (contenu digestif des polygastriques). Ces déchets sont donc le plus souvent regroupés sur une aire étanche dont les liquides d'égouttage sont récupérés et rejetés dans le réseau de traitement des eaux. Les matières solides résiduelles sont ensuite valorisées en agriculture (épandage, compostage...).

2.2.1.2. Les déchets liquides

Les déchets liquides ont plusieurs origines :

- les eaux de lavage du matériel ;
- les eaux de lavage des surfaces (sols) des installations à l'intérieur des bâtiments ;
- les eaux de lavage des surfaces situées à l'extérieur des bâtiments ;
- les eaux de lavage des camions ;
- les eaux pluviales du site ;
- les eaux dites de « process » (eau de lavage des carcasses, eau d'évaporation des matières premières obtenues lors de la transformation des déchets animaux en farines; Urbaniak et Sakson, 1999).

2.2.1.3. Les boues

Les boues constituent un cas particulier, elles sont issues du système d'épuration des eaux usées. Le but du traitement est d'enlever la matière en suspension (MES) et de limiter la fraction organique dissoute. Ce processus entraîne la formation des boues. On distingue deux fractions principales extraites du processus épuratoire, Elissalde (2001):

- Boues primaires, faciles à écanter, 3 à 5% de matières sèches (MS)
- Boues biologiques ou secondaires, correspondant à des floccs organiques avec 5% de MS.

Ainsi, de par leurs charges organiques, ces différents déchets occasionnent un risque de pollution majeur et présentent un risque sanitaire potentiel pour la santé humaine (Benka-Coker et Ojioro, 1995).

2.2.2. La demande en oxygène des effluents

La demande en oxygène est un paramètre important à analyser pour déterminer l'effet des polluants organiques sur une eau (Kosseva, 2009). Il existe deux méthodes principales pour mesurer directement la demande en oxygène :

- par la procédure de Demande Biochimique en Oxygène (DBO) ;
- et/ou par la procédure de Demande Chimique en Oxygène (DCO).

La DBO exprime les quantités de matières organiques biodégradables présentes dans l'eau. Plus précisément, ce paramètre mesure la quantité d'oxygène nécessaire à la destruction des matières organiques grâce à des phénomènes d'oxydation par voie aérobie. Pour mesurer ce paramètre, on utilise comme référence la quantité d'oxygène consommée au bout de cinq jours. La DBO, qui est basée sur le métabolisme des microorganismes, donne l'image la plus proche de ce qui arrive réellement dans les cours d'eau et rivières.

La DCO représente la teneur totale de l'eau en matière oxydable, ce paramètre correspond à la quantité d'oxygène qu'il faut fournir pour oxyder par voie chimique ces matières. A la différence de la DBO, la DCO n'implique pas de processus microbiologiques, mais utilise plutôt des oxydants chimiques pour oxyder les polluants.

2.2.3. Composition des effluents d'industrie alimentaire

Russell (1986) signale que les effluents de l'abattage des animaux et des opérations de traitement contiennent de hautes concentrations de protéines et de graisses, et que ces concentrations sont de 10 à 100 fois supérieures à celles retrouvées dans les eaux usées domestiques. La composition des effluents des usines de viande est présentée au tableau 1.

Tableau 1 Composition des effluents d'industrie de produits carnés

Composition	Plage de valeurs
Protéine (%)	15 - 36
Fibre (%)	8,38 - 24,6
Matière grasse (%)	4,5 - 6,3
MES (%)	40,94 - 67,2
COD (mg/L)	2000 - 7685
DBO (mg/L)	1300 - 9800
STS (mg/L)	850 - 6300
SV (mg/L)	660 - 5250
Calcium (%)	0,6 - 12,5
Phosphore (%)	0,93 - 2,8
Potassium (%)	0,3 - 0,7
Fer (%)	10,1 - 16,0
Zinc (%)	11,2 - 14,5
pH	7,1 - 8,2
Température (°C)	11,8 - 26

Avec MES = Matière en suspension; COD = Demande chimique en oxygène;
DBO = Demande biochimique en oxygène ; STS = Solides totaux en suspension
et SV = Solides volatiles.

Adapté de Cunningham, 1976 ; Connor *et al.*, 1983 ; Nambi *et al.*, 1992 ;
Fuchs *et al.*, 2003; Aguilar *et al.*, 2005 et Garcia *et al.*, 2005.

Les déchets de l'industrie laitière contribuent de manière substantielle à la pollution des effluents. Certaines de leur caractéristique peuvent être résumées comme suit: la charge organique élevée (par exemple : les acides gras et du lactose), des variations considérables du pH (4.2 à 9.4), la charge relativement importante de solides totaux en suspension (STS) est de 0.4 à 2 g/l (Kosseva *et al.*, 2003). Les eaux usées des produits laitiers peuvent contenir des protéines, des sels, des matières grasses, du lactose, comme le présente le tableau 2.

Tableau 2 Composition des effluents d'industrie laitière

Composition	Plage de valeurs
Protéine (mg/L)	210 - 250
Matière grasse (mg/L)	35 - 500
MES (mg/L)	24 - 57000
Hydrate de carbone (mg/L)	252 - 931
COD (mg/L)	500 - 4500
DBO (mg/L)	450 - 4790
STS (mg/L)	135 - 8500
Azote (mg/L)	15 - 180
Calcium (mg/L)	57 - 112
Phosphore (mg/L)	20 - 250
Potassium (mg/L)	11 - 160
Sodium (mg/L)	60 - 807
Chlorure (mg/L)	48 - 469
pH	5,3 - 9,4
Température (°C)	17,9 - 40

Avec MES = Matière en suspension; COD = Demande chimique en oxygène;
DBO = Demande biochimique en oxygène et STS = Solides totaux en suspension

Adapté de Kosseva *et al.*, 2001 ; Demirel, 2003.

2.2.4. Éléments secondaires constituant les effluents

- *L'oxygène.* Du fait de leur composition, les rejets industriels (nommés flux) peuvent être considérés comme laminaires ou turbulents selon leur composition et leur vitesse (Figure 3). Un écoulement laminaire n'introduit pas d'oxygène dans le flux, à l'inverse d'un écoulement turbulent, qui lui, est plus à même d'introduire de l'oxygène par brassage. Cette différence est de taille, car on sait que la présence ou l'absence d'oxygène (aérobie ou anaérobie) peut avoir une influence sur la croissance bactérienne (Doyle, 2001). Un même flux (composition identique) peut passer de laminaire à turbulent, et vice versa, si sa vitesse est modifiée. Par exemple, lors d'une session de nettoyage de la chaîne de production, le flux est généralement turbulent (présence de mousse dans le drain et beaucoup d'eau y circule). Par contre, lorsque la chaîne de travail est inutilisée (la nuit par exemple), le flux est plus lent, l'eau stagne, et le flux est considéré comme laminaire.

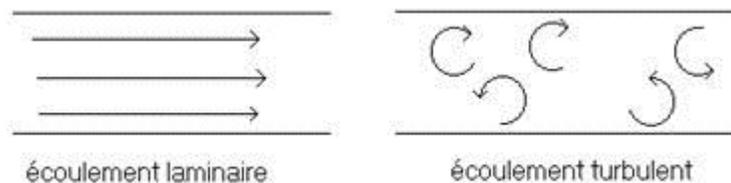


Figure 3 Représentation d'un écoulement laminaire et turbulent

- *La température.* La température de l'effluent est dans la plupart des cas comprise entre 15 et 25°C (Elissalde, 2001). Mais la température des effluents d'industrie dépend du type d'usine, les effluents laitiers sont généralement plus chauds que ceux des industries de produits carnés à cause des températures dans l'environnement de l'usine, respectivement de 10°C et 20°C pour les viandes et le lait (Elissalde, 2001). Certaines pratiques de nettoyage et des écoulement d'effluents fluctuant, peuvent influencer sur la température dans les drains, ce qui rend cette dernière aléatoire en industrie (Elissalde, 2001).

- *L'eau.* Bien que les effluents soient principalement composés d'eau, entre 90 et 95%, c'est l'activité de l'eau (A_w) qui est le facteur déterminant dans la croissance bactérienne (Prescott *et al.*, 2003).

- *Le pH.* Le pH des effluents d'abattoir et de laiterie a des valeurs proches de la neutralité (tableau 1 et 2), puisque tous les composants de l'effluent, que ce soit l'eau, les contenus digestifs, le sang ou l'urine, ont un pH proche de la neutralité. Cependant, des variations peuvent être observées selon l'alcalinité ou l'acidité des produits utilisés pendant les opérations de nettoyage.

La présence de nutriments, d'eau, d'une température et d'un pH favorable pour la croissance sont les conditions parfaites pour la prolifération bactérienne. Le point suivant propose d'illustrer la facilité avec laquelle les microorganismes peuvent se multiplier dans les effluents d'industrie alimentaire ainsi que les moyens mis en œuvre pour limiter ce développement.

2.3. Développement bactérien dans les drains d'eaux usées.

2.3.1. Microorganismes présents dans ces drains

En plus des composés résiduels consécutifs de la transformation des produits alimentaires (lait, viande) qui servent de nutriments, d'autres organes comme la peau ou les viscères contribuent à une grande variété de microorganismes dans les drains et parmi eux, des espèces potentiellement dangereuses pour les humains comme *L. monocytogenes* (Jian, et Zhang, 1999). La charge de contaminants des eaux usées rejetées par les usines de transformation de la viande varie selon les saisons, les jours et sur un même quart de travail (Sroka *et al.*, 2004).

Certaines zoonoses pathogènes pour l'homme tels que *Campylobacter*, *Salmonella* et *Yersinia* sont capables de décomposition des acides aminés à partir de protéines altérées fournies dans les effluents et aptes à former des métabolites toxiques dans les boues (Fransen *et al.*, 1994). Il est possible dans le cas de *L. monocytogenes* de contaminer les produits alimentaires par le biais des drains d'industrie de viande (Lundén *et al.*, 2003). Il faut donc trouver des moyens d'empêcher cette prolifération bactérienne, conséquence d'un milieu trop riche, propice à la croissance microbienne (Lunden, 2004).

2.3.2. Effet de la température dans le cas du développement bactérien dans les drains

Dans les drains comme ailleurs, les bactéries sont sensibles à certains facteurs intrinsèques et extrinsèques comme il sera présenté au point 2.4. Mais dans ce milieu complexe qu'est le drain d'une usine alimentaire, on sait que la température varie selon le type de transformation alimentaire (point 2.2), voici ce qu'implique ces changements.

Tous ces microorganismes se caractérisent par une courbe de croissance qui comporte 4 étapes (Prescott *et al.*, 2003):

- la phase de latence,
- la phase exponentielle (de croissance),
- la phase stationnaire,
- la phase de décroissance.

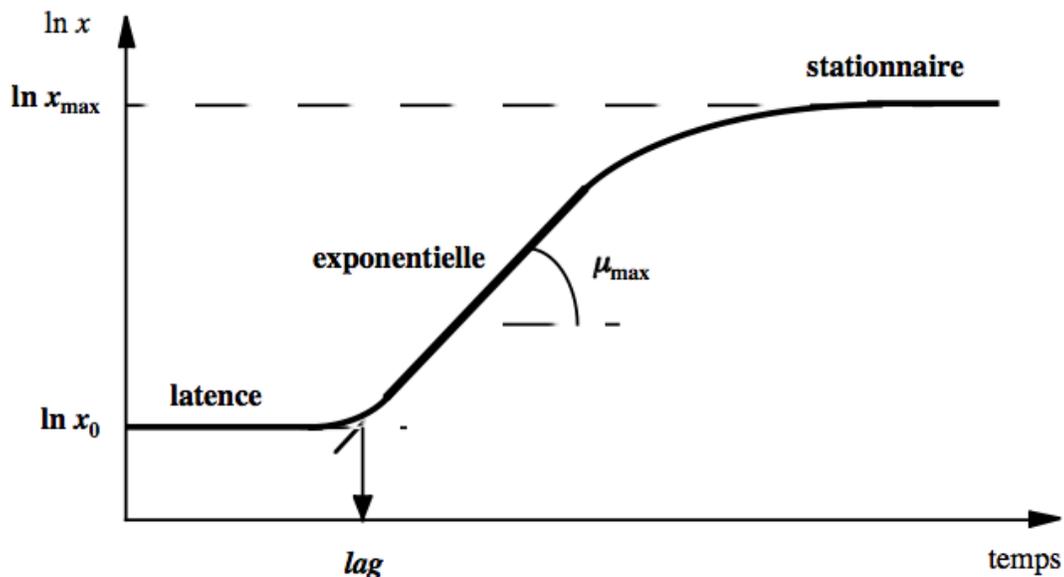


Figure 4 Cinétique de croissance bactérienne.

μ_{max} : taux de croissance maximum, *lag* : le temps de latence et x_0 et x_{max} les concentrations cellulaires initiales et maximales.

Adapté de Prescott *et al.*, 2003.

La température intervient sur les microorganismes de deux façons, sur la phase de latence et sur le taux de croissance. Plus la température se rapproche de la température optimale de croissance d'un organisme donné, plus la phase de latence des microorganismes diminue. Pour *Pseudomonas*, des ordres de grandeur de phase de latence en conditions de laboratoire sont donnés en fonction de la température dans le tableau 3 (Donnelier, 1993).

Tableau 3 Phase de latence pour *Pseudomonas* à différentes températures

Température (°C)	0	5	10	15	20	25
Phase de latence (h)	55	25	15	8	5	3

En ce qui concerne le taux de croissance, plus la température du milieu se rapproche de la valeur optimale de la bactérie, plus son taux de croissance sera important (Figure 5). Il faut savoir que dans une même famille bactérienne (psychrophile par exemple), chaque espèce a sa température optimale spécifique : une première bactérie peut avoir son taux de croissance maximum à 19°C et une autre à 25°C (Donnelier, 1993).

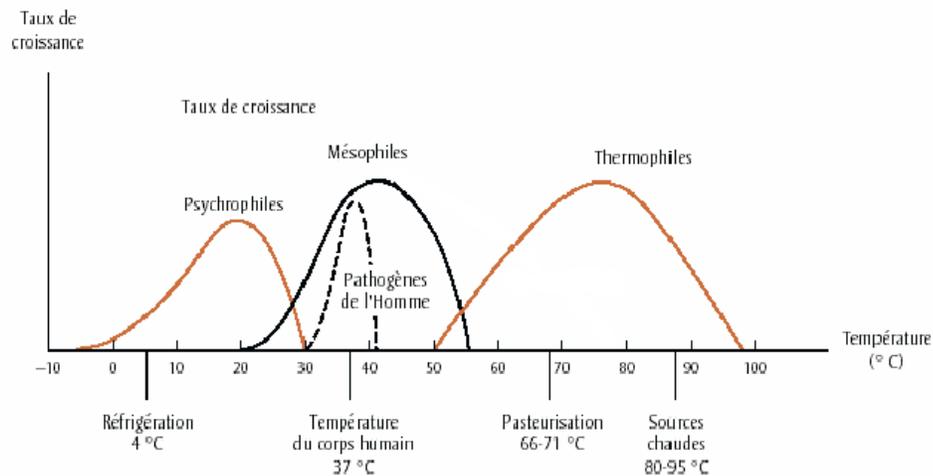


Figure 5 Courbes de croissance des micro-organismes psychrophiles, mésophiles et thermophiles selon la température

Adapté de Donnelier, 1993.

2.3.3. Moyen de lutte pour inhiber la croissance des bactéries

Les eaux usées dans l'industrie de la viande sont extrêmement difficiles à purifier en raison de leurs caractéristiques spécifiques, des décharges irrégulières causées par la chaîne d'abatage, de transformation et/ou le nettoyage et du contenu considérable de matières organiques, minérales et de matières biogènes tel que le sang, les matières fécales et résidus d'abatage et de transformation. Les principaux objectifs de ce traitement étant d'éviter le colmatage des drains par accumulation de matières organiques et de limiter les odeurs dues à leur dégradation par les microorganismes (Bohdziewicz et Sroka, 2005).

L'utilisation des désinfectants dans les industries agroalimentaires est réglementée. Il y a un certain nombre de conditions préalables pour une désinfection efficace. Tout d'abord, le désinfectant doit avoir le spectre d'activité en étant en mesure d'éliminer les contaminants concernés dans milieu d'étude. En général, les désinfectants ont un très large spectre de cibles, car ils sont efficaces contre les bactéries, les virus et les champignons. Cependant, les bactéries à Gram négatifs ont tendance à être moins sensibles que les bactéries Gram positives (McDonnell et Russell, 1999). En second lieu, il est important d'utiliser la bonne concentration, le pH, la température et le temps d'exposition suffisant pour obtenir l'élimination des bactéries. Enfin, le nettoyage de la surface avant la désinfection est nécessaire pour éliminer les composés organiques, sinon la désinfection sera inutile (Allion, 2004).

Une large gamme de désinfectants est disponible pour l'industrie alimentaire, et ils peuvent être divisés en sept groupes (Holah *et al.*, 2002) suivants.

- Les alcools
- Les aldéhydes (glutaraldéhyde)
- Les biguanides
- Les (bis)phénols
- Les agents halogènes de libération (HRA)
- Les peroxydes
- Les composés d'ammonium quaternaire (CAQ)

Le schéma d'action des désinfectants reste le même quelle que soit la molécule. Trois phases sont identifiées : l'absorption de la molécule désinfectante à la paroi du microorganisme, la pénétration à l'intérieur de la cellule et l'action (McDonnell et Russell, 1999). Les solutions à base de chlore, de peroxyde et à base de CAQ sont les désinfectants les plus fréquemment appliqués dans l'industrie alimentaire. Ces trois groupes ont leurs avantages et leurs inconvénients, et donc le choix dépend de la composition du milieu à désinfecter. Les solutions à base de chlore ne coûtent pas cher, mais sont facilement inactivés par la présence de matière organique, comme ceux des drains d'industrie agroalimentaire. En outre, ils sont corrosifs pour les métaux. Les peroxydes sont très efficaces et sont inactivés dans une moindre mesure par les débris organiques. Cependant, ces composés ne peuvent être utilisés sur tout type de matériel, car ils sont corrosifs. Les CAQ sont largement utilisés en raison de leurs performances adéquate et leurs natures non-corrosif. Cependant, ils sont plus chers que le chlore (Dupuis *et al.*, 2002 ; Holah *et al.*, 2002).

Les cibles des molécules désinfectantes chez *L. monocytogenes* sont variables, l'action peut s'effectuer au niveau de la membrane (bases fortes, biguanides, ammoniums quaternaires) ou sur les protéines et enzymes (dérivés halogénés, oxydants et aldéhydes) ou encore sur les acides nucléiques (oxydants, acides, aldéhydes ; Dupuis *et al.*, 2002). Les différences de sensibilité de *Listeria monocytogenes* aux désinfectants ont été déterminées dans plusieurs études (Aase *et al.*, 2000 ; Holah *et al.*, 2002 ; Lunden *et al.*, 2003). Ils ont essentiellement été fait avec des CAQ (chlorure de benzalkonium plus précisément) car ils sont couramment utilisés dans l'industrie alimentaire : les souches de *Listeria monocytogenes* sont considérées comme sensibles aux CAQ à une concentration minimale inhibitrice (CMI) inférieure à 2 µg/mL.

La littérature à ce sujet nous pousse à comprendre que bien que les CMI peuvent être déterminés in vitro (avec des différences causées par une méthodologie qui varie d'une étude à l'autre ; Holah *et al.*, 2002), il n'en est pas de même dans un modèle complexe qui sont les drains d'industrie agroalimentaire où l'utilisation seule de désinfectant chimique ne peut être une solution efficace pour éliminer les microorganismes pathogènes (Lunden *et al.*, 2003).

2.3.4. Le concept des barrières microbiologiques multiples

Une approche permettant d'obtenir une bonne conservation des aliments sans les soumettre à des transformations trop marquées consiste en l'utilisation de la technologie des barrières (Leistner, 2000). Il s'agit d'appliquer en conjonction plusieurs procédés ralentissant la croissance des microorganismes, et non plus successivement pour éviter toute réponse bactérienne aux stress (Prescott *et al.*, 2010). Chacune de ces barrières n'a que peu d'effets sur les qualités organoleptiques du produit, mais, par ailleurs, ne sont pas suffisantes à elles seules pour assurer la qualité microbiologique du produit. C'est alors la combinaison de ces techniques qui va permettre d'obtenir une inhibition microbiologique satisfaisante. Les techniques les plus couramment utilisées sont la température (augmentation : cuisson modérée, thermisation de courte durée, etc. ; diminution : réfrigération), la réduction de l'activité de l'eau, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, l'ajout de antimicrobiens de nature chimique (nitrates, sulfates, sorbate) et ou naturels (acide organique, polyphénols extrait de végétaux, etc. ; Gill et Landers, 2003 ; Leistner, 2000).

2.4. L'adaptation des bactéries dans un milieu industriel

2.4.1. Résistance dans les drains

Les phénomènes d'adaptation à un désinfectant, par transformation, conjugaison ou transduction, ont été montrés pour *L. monocytogenes* si elle est préalablement mise en présence de concentrations non létales, ce qui est le cas dans les drains lors de forte dilution. Ce phénomène a été observé pour les ammoniums quaternaires, des alkylamines, et l'hypochlorite (Aase *et al.*, 2000, Lunden *et al.*, 2003). De plus, l'exposition à des concentrations sous-létales d'un désinfectant pourrait induire une protection de *L. monocytogenes* à l'action d'autres désinfectants (protection croisée ; Lunden *et al.*, 2003), rendant le changement périodique de désinfectant inefficace.

Les détergents peuvent être alcalins ou acides et contiennent très souvent des additifs tels que des phosphates, des agents séquestrants, des tensioactifs, et ainsi de suite. L'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) est couramment utilisé comme un substitut des polyphosphates. Il a une faible biodégradabilité et reste dans les eaux usées après le traitement. Il est démontré que les tensioactifs peuvent affecter fortement les écosystèmes des rivières et peuvent être toxiques pour les animaux aquatiques en fonction des conditions de biodégradabilité et de leur demi-vie (Thassitou et Arvanitoyannis, 2001). On cherche donc à innover dans ce domaine afin de limiter la pollution environnementale par l'utilisation de techniques plus écologiques tout en restant le plus efficace possible car les drains restent difficiles à nettoyer.

2.4.2. Capacité à former des biofilms

Dans l'environnement, les bactéries vivent préférentiellement sous forme de bio films (Costerton *et al.*, 1995 ; Moretro *et al.*, 2004 ; Zobell, 1943). Ce sont des associations denses et structurées de microorganismes entourés d'une matrice extracellulaire, qui se développent sur une grande variété de surfaces telles que des tissus vivants, des appareils médicaux et agro-industriels, des systèmes de distributions d'eau et dans les systèmes naturels aquatiques. Ces organisations microbiennes permettent aux bactéries de se maintenir dans une niche écologique et de résister à de nombreux stress environnementaux tels que le pH, l'oxygène, la dessiccation et les composés bactéricides. De manière générale, le cycle de vie d'un biofilm se découpe en trois étapes : l'adhésion des cellules à une surface, la maturation du biofilm, et la dispersion des cellules. En fonction du stade de développement, la population d'un biofilm, dite benthique, se distingue d'une population planctonique (en suspension dans l'eau) par de nombreux aspects, dont un taux de croissance réduit, la régulation de gènes spécifiques et la synthèse d'une matrice extracellulaire et une grande résilience face aux stress environnementaux (Donlan, 2002).

La composition et les propriétés physiques de la matrice extracellulaire entourant les cellules varient en fonction des espèces et des facteurs environnementaux. De manière générale, elle est fortement hydratée et composée d'exopolysaccharide (EPS, qui constituent entre 40 et 95% du poids sec, des protéines (1 à 60%), des acides nucléiques (1 à 10%) et des lipides (1 à 40% ; Flemming et Wingender, 2010).

L'acquisition de la résistance par la formation d'un biofilm est un processus multifactoriel basé sur des mécanismes de défense innés liés à la structure et à la physiologie du biofilm (matrice extracellulaire), et des mécanismes acquis, résultant de l'action du stress (induction de la réponse au stress, apparition de mutants conférant au biofilm une multi-résistance aux antibiotiques ; Macia *et al.*, 2005 ; Anderson et O'Tolle, 2008). Grâce à cela, les cellules vivant en biofilm peuvent être jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux composés bactéricides que les cellules planctoniques (Mah et O'Toole, 2001 ; Drenkard, 2003).

2.4.3. Le quorum sensing

Le quorum-sensing est un terme utilisé pour décrire la signalisation intercellulaire des bactéries. L'expression des gènes est en effet souvent régulée par de petites molécules sécrétées par les cellules dans le milieu environnant. Lorsque ces molécules signales sont retrouvées à une concentration témoignant d'un quorum (ou densité cellulaire critique), elles induisent des mécanismes nécessitant des activités coordonnées d'un grand nombre d'individus. En fonction de la densité cellulaire et des bénéfices apportés à la population, le quorum-sensing induit soit la formation du biofilm soit sa disparition (Parsek et Greenberg, 2005). Les paramètres physico-chimiques du milieu extérieur (pH, température, etc.) déterminent la stabilité de la molécule signal (Kirists et Parsek, 2006). Les bactéries Gram positives telles que *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *L. monocytogenes* et les bactéries lactiques peuvent communiquer par l'intermédiaire de molécules de quorum sensing (Kleerebezem *et al.*, 1997 ; Reading et Sperandio, 2006) ce qui peut provoquer des communications inter-espèces et conduire à l'inhibition d'une bactérie sur une autre dans un même milieu.

3. LE CONCEPT D'EXCLUSION COMPÉTITIVE

3.1. Origine du concept : l'Écologie

L'exclusion compétitive est un des principes les plus connus de l'écologie théorique (McArthur, 1958). C'est à la fin du XVIII^e siècle, que ce principe fût introduit par T. Malthus puis au XIX^e par P.F. Verhulst, définissant ce concept par « une compétition entre deux espèces pour une ressource commune » (Hardin, 1960). Depuis lors, c'est Gauss qui réalisa dans les années 1930 l'approche expérimentale de la croissance des microorganismes : les paramécies (Gause, 1934). Il propose donc l'appellation que nous, microbiologistes, nous connaissons de nos jours : « principe d'exclusion compétitive ».

On remarque à la figure 6, la différence du taux de croissance entre la culture pure et la compétition. Cela s'explique par la dominance de *P. aurelia* dans le milieu, sa forte croissance prouve que ce microorganisme a su s'adapter plus efficacement que son homologue *P. caudatum*. *P. aurelia* (Hardin, 1960). Les conditions étaient d'ajouter de l'eau fraîche chaque jour et un flux constant de nourriture. Bien que *P. caudatum* a dominé dans un premier temps (taux de croissance plus rapide), *P. aurelia* a ensuite été dominant dans le milieu et a conduit *P. caudatum* à décroître par compétition pour les mêmes ressources présent dans le milieu : c'est l'exclusion compétitive.

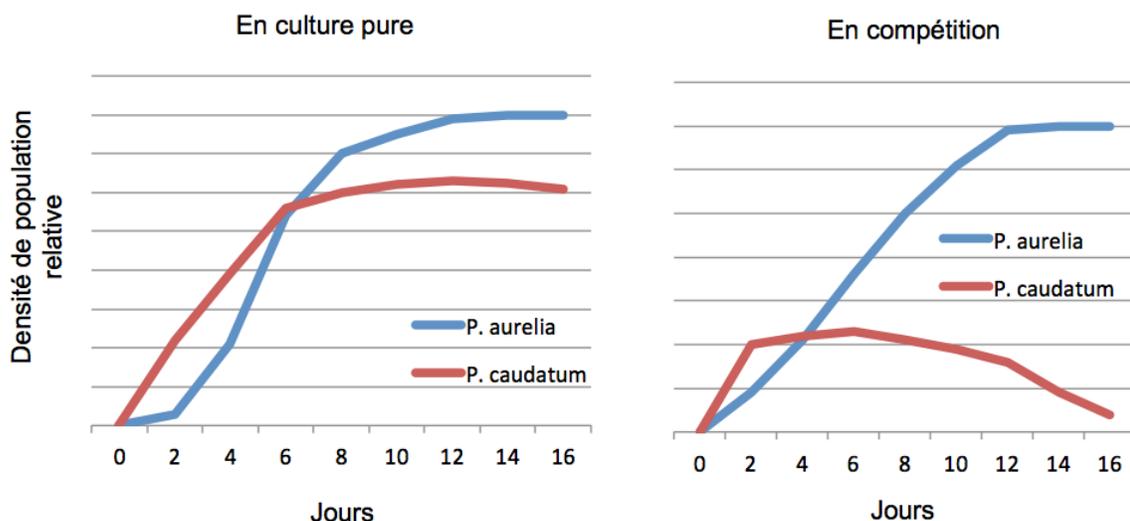


Figure 6 Courbes de croissance de deux microorganismes en culture pure *versus* en compétition en fonction du temps (jours)

Adapté de McArthur, 1958.

3.2. Exclusion compétitive et biofilms

3.2.1. *Listeria monocytogenes* et biofilms

L. monocytogenes est un organisme pathogène alimentaire très répandu, très dangereux, possédant une grande capacité d'attachement aux surfaces alimentaires (Kim et Frank, 1994) et pouvant former un biofilm (Chavant *et al.*, 2002) lorsque le microorganisme détecte un facteur de stress comme lors d'une décontamination des surfaces de contact alimentaire (Aarnisalo *et al.*, 2000). Certains auteurs rapportent que *L. monocytogenes* existe sous forme d'un biofilm dans les drains (Jams et Larry. 1986 ; Milohanic *et al.*, 2004). Le biofilm est très efficace pour empêcher la pénétration du désinfectant à cause de la matrice extracellulaire (point 2.4.2) et sa présence sert de protection aux microorganismes pathogènes en industrie agroalimentaire (Weatherill, 2009). De plus, certaines études ont démontré que *L. monocytogenes*, lorsqu'ils se développent dans un biofilm de microflore mixte, est une source majeur de contamination (Borucki *et al.*, 2003; Kathariou, 2002).

3.2.2. Compétitions bactériennes de *L. monocytogenes* et autres bactéries au sein d'un biofilm

Une étude de Carpentier et Chassing (2004) axée sur l'environnement en usine alimentaire, avait pour but de trouver des microorganismes ayant la possibilité de réduire le développement de *L. monocytogenes* dans un biofilm sur une surface alimentaire; dans ce cas-ci, l'acier inoxydable, très répandu dans les industries fromagères et des produits carnés. Pour ce faire, plusieurs dizaines de microorganismes ont été isolés à partir de plusieurs milieux (dont certains alimentaires), identifiés puis mis en compétition dans un biofilm de *L. monocytogenes*. Parmi les seize bactéries pouvant réduire la croissance de *L. monocytogenes* sur l'acier inoxydable, trois d'entre elles ont la capacité d'inhiber de 3 log le développement de cet organisme pathogène. Au sein de ces trois bactéries se trouve une bactérie particulièrement intéressante soit, *Bacillus subtilis*, dont la souche a été nommée CCL9 et qui semble agir de façon efficace dans la lutte contre les organismes pathogènes en industrie agroalimentaire.

L'étude de Zhao *et al.*, (2004), comme celle de Carpentier et Chassing (2004), cherche à lutter contre l'établissement d'un biofilm *in vitro* de *L. monocytogenes* sur des plaques en acier inoxydable. L'intérêt de leur étude vient de leur hypothèse : ils estiment que la température d'incubation peut influencer la capacité de l'organisme à entrer en compétition. L'expérimentation de Zhao *et al.*, (2004), consiste en une exclusion compétitive exercée d'une part en fonction de l'utilisation des nutriments présents dans le milieu Tryptic Soy Broth (TSB), et d'autre part, sur l'inhibition de la croissance de *L. monocytogenes* (réalisée par la production de métabolites). L'ensemble des microorganismes utilisés dans cette étude (bactéries et levures) ont été isolés à partir de drains d'industries agroalimentaires. De plus, l'étude de Zhao *et al.*, (2004) illustre l'exclusion compétitive que réalise *in vitro* les deux bactéries entre 4 et 37°C : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C-1-92 et

Enterococcus durans 152, les deux sont productrices d'acides lactiques et ont été isolées à partir d'un drain d'industrie agroalimentaire. En 2006, Zhao *et al.*, confirment ces compétitions dans une étude semblable mais à des températures de 3 à 26°C, avec des réductions de la concentration de *L. monocytogenes* de 2,3 jusqu'à 3,8 log ufc/100 cm² (soit de 2,3 à 3,8 ufc/mL) en fonction des drains à l'étude, ce qui est très encourageant vu le profil psychotrope de *Listeria*.

Par contre, c'est surtout grâce à la production de bactériocine, la nisine (Olasupo *et al.*, 1999), que *Lactococcus lactis* peut entrer en compétition. Bien que cette bactérie soit non-sporulée, la production de bactériocine permet de croire que *Bacillus subtilis*, dont certaines souches (G2, H4 et F1; Campaoré *et al.*, 2013) sont producteurs de bactériocines, et peuvent être efficaces contre *L. monocytogenes* (Zheng et Slavik, 1999 ; Campaoré *et al.*, 2013). De plus, certaines souches produisent l'iturine (Peyroux, 1973), et accessoirement, la bacillomycine (Besson *et al.*, 1977) et la mycosubtiline (Peyroux *et al.*, 1976).

3.2.3. La prévention de l'adhésion des bactéries sur une surface

En industrie alimentaire, un biofilm peut se développer en quelques heures seulement et est difficile à éradiquer car il s'avère très résistant aux lavages et aux désinfections (Carpentier et Cerf, 1993). Par ailleurs, la présence de biofilms sur des appareils industriels (« biofouling ») entraîne une perte d'efficacité des processus. D'autre part, les biofilms sont à l'origine de phénomènes de corrosion en raison de leurs capacités à lier les métaux. Les sulfures produits par les bactéries sulfato-réductrices à partir de sulfates interagissent par exemple avec le fer présent à la surface colonisée, augmentant ainsi sa vitesse de corrosion (Flemming et Wingender, 2001).

L'adhésion d'une cellule à une surface comprend une étape d'adhésion réversible et une irréversible. L'attachement réversible implique des forces « faibles » (liaisons van der Waals, électrostatiques, interactions hydrophobes) entre la cellule et la surface (Strevett et Chen, 2003). À cette étape, les cellules sont facilement détachables par les forces hydrodynamiques du liquide environnant par exemple. L'étape d'adhésion irréversible met en jeu des forces plus importantes, telles que les liaisons hydrogènes, covalentes ou des interactions hydrophobes fortes. La perte des flagelles et la synthèse d'organelles d'adhésion telles que les fimbriae sont souvent nécessaires pour la fixation irréversible à proprement parler (Pruss *et al.*, 2006). A ce stade, le décrochage des cellules nécessite des méthodes physiques ou chimiques plus drastiques (Goulter *et al.*, 2009).

3.2.4. Cultures protectrices et autres produits commerciaux

En 2006, Zhao confronte son hypothèse de 2004 à la réalité industrielle : ses expérimentations sont réalisées dans des drains agroalimentaires (Zhao, 2006). L'évolution de *L. lactis* est poursuivie, en posant l'hypothèse que les métabolites de cette dernière ont le même fonctionnement que ceux de *B. subtilis*. L'étude conclue que dans une industrie de transformation de la volaille, à 4 et 26°C, *L. lactis* est capable d'entrer en

compétition contre *L. monocytogenes*. Bien que certains microorganismes soient efficaces contre *L. monocytogenes*, ils sont également la cible des détergents industriels dans le drain, ce qui limite leurs survivis (Zhao, 2006). L'industrie tend donc à trouver de nouveaux produits comprenant une matrice détergente ainsi qu'un consortium de suspensions bactériennes actives. Le rôle de ce produit est d'éviter l'apparition des mauvaises odeurs, d'éliminer les bactéries pathogènes et d'altération dans les drains tout en favorisant la croissance des bactéries contenues dans le produit commerciale qui elles ne sont pas pathogènes. Bien que l'utilisation de bactéries sporulées devrait être un avantage pour résister au détergent, leur efficacité en tant que compétiteur dans des drains d'industrie agroalimentaire reste encore à démontrer.

Hypothèses et objectifs

Afin de répondre aux besoins de l'industrie, nous nous proposons dans cette étude de tester l'efficacité d'un produit commercial biodégradable qui est utilisé pour éliminer les odeurs nauséabondes et afin de limiter la croissance de bactéries pathogènes : c'est le cas du microorganisme pathogène *L. monocytogenes* qui nous préoccupe, aux vues du danger qu'il représente dans l'industrie agroalimentaire. Il est donc important de déterminer les concentrations minimales de ce produit nécessaires pour inhiber *L. monocytogenes* sans développer chez ce dernier le phénomène de résistance par l'utilisation de concentrations sous le seuil de létalité.

En confrontant cet organisme pathogène et ce produit commercial dans différentes conditions environnementales proches de celles retrouvées dans les drains des industries agroalimentaires et, en effectuant l'étude statistique des courbes de croissance et de leurs taux de croissance en culture pure et en compétition, l'efficacité de ce produit pourra être confirmé.

Hypothèse : Les souches bactériennes contenues dans ce produit commercial sont capables d'exercer une exclusion compétitive sur la croissance de *L. monocytogenes in vitro* dans des conditions similaires à celles rencontrées dans les drains d'usines de transformation alimentaire.

Objectif général : Étudier le comportement d'un microorganisme pathogène particulier, *L. monocytogenes*, lorsque ce dernier est en compétition avec les bactéries non-pathogènes présentes dans le produit commercial.

Objectifs intermédiaires :

- Démontrer l'effet de la température, de l'agitation et de la concentration initiale des deux espèces sur l'efficacité du produit commercial.
- Réaliser le suivi du pH des solutions à l'étude afin de d'évaluer qualitativement l'activité métabolique des bactéries et de déterminer l'espèce dominante.
- Déterminer les origines de l'inhibition de *L. monocytogenes* si il y a lieu.

Moyens pour atteindre ces objectifs :

- Réaliser des courbes de croissance en culture pures et en compétition des différentes bactéries dans l'ensemble des conditions à l'étude.
- Faire le suivie du pH dans les mêmes conditions.
- Déterminer s'il existe des interactions entre les espèces bactériennes (production bactéricide ou autre composé) par compétition sur tapis bactérien et observation de zone d'inhibition.

Matériels et méthodes

1. Croissance en culture pure et compétition

1.1. Les souches

Pour la réalisation de cette étude, un total de 18 souches ont été utilisées ; elles sont présentées dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 Origine et numéro de référence des souches utilisées

Nom de la souches	N°	Origine
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	Partenaire industriel
<i>Bacillus pumillus</i>	1 Co	Partenaire industriel
<i>Bacillus subtilis</i>	1 CI	Partenaire industriel
<i>Bacillus subtilis</i>	2	Partenaire industriel
<i>Bacillus subtilis</i>	3	Partenaire industriel
<i>Bacillus subtilis</i>	5	Partenaire industriel
<i>Bacillus subtilis</i>	6	Partenaire industriel
<i>Listeria innocua</i>		Université Laval SAN
<i>Listeria monocytogenes</i>	8a	Santé Canada
<i>Listeria monocytogenes</i>	9	Santé Canada
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	Santé Canada
<i>Listeria monocytogenes</i>	11	Santé Canada
<i>Listeria monocytogenes</i>	12	Santé Canada
<i>Listeria monocytogenes</i>	13	Santé Canada
<i>Listeria monocytogenes</i>	14	Santé Canada
<i>Listeria monocytogenes</i>	22	Santé Canada
<i>Listeria monocytogenes</i>	26	ATCC 19112
<i>Listeria monocytogenes</i>	27	ATCC 19114

Le produit commercial à l'étude, est composé d'une matrice détergente et odorante ainsi que d'un consortium bactérien de cinq souches de *Bacillus subtilis* sous la forme de spores, soit les souches **1 CI, 2, 3, 5 et 6**. Ces bactéries de source naturelles sont à une concentration initiale de 7 log ufc/mL.

Parmi toutes les souches de *L. monocytogenes* disponibles dans notre laboratoire, 5 d'entre elles ont été choisies pour former le cocktail représentatif de la variabilité entre espèce. Nous avons sélectionné les souches en comparant leur taux de croissance à 30°C, 20°C et 10°C sans agitation par suivi de la densité optique (ou DO) d'un milieu Infusion cœur et cerveau (BHI, Becton-Dickinson-Difco, Sparks, MD, USA) inoculé à 3 log ufc/mL de chaque souche de *L. monocytogenes* en culture pure. Les 5 souches présentant le taux de croissance le plus élevé dans ces trois conditions ont donc constitué le cocktail à étudier, il s'agit des souches **11, 12, 13, 14 et 22**.

1.2. Préparation de souches

Avant chaque expérience, les souches ont été cultivées dans du milieu BHI et incubée pendant 24 heures à $30 \pm 1^\circ\text{C}$, chaque souche est repiquée à un minimum de deux et un maximum de six fois avant d'être utilisée. Ces cultures ont été préparées à partir d'aliquots congelés et entreposés à $-80 \pm 1^\circ\text{C}$ dans du BHI supplémenté de 20% de glycérol vol/vol (grade enzymatique, Fisher scientific, Fair Lawn, New Jersey) utilisé comme cryo-protecteur.

1.3. Préparation du cocktail de *Listeria*

Le cocktail de cinq souches de *L. monocytogenes* est préparé à partir de cultures pures de 10 mL en phase stationnaire suite à une incubation dans du BHI liquide stérile à 30°C pendant 24 heures afin d'obtenir une concentration finale de 9 log ufc/mL. Finalement, les cultures de 10 mL sont réparties équitablement dans 2 tubes Falcons de 25 mL et centrifugées à 4080 g à 4°C pendant 10 min puis les culots ainsi obtenus sont recueillis, lavés deux fois à l'eau peptonée à 1 % et remis en suspension dans 25 mL de BHI liquide afin d'être utilisés immédiatement dans les études de croissance.

1.4. Conditions de l'expérimentation

Les courbes de croissances du consortium bactérien (cocktail de *Bacillus sp.* avec matrice détergente; donc le produit commercial) et du cocktail de *L. monocytogenes* seul ont été effectuées dans les mêmes conditions *in vitro* afin de pouvoir les comparer aux résultats des cultures ou les deux organismes sont mis en compétition.

Trois températures ont été à l'étude, il s'agit de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ (température de croissance permettant la croissance des deux bactéries sans restriction (Prescott *et al.*, 2003), $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (température des salles de transformation en industries laitières, et températures moyenne des drains d'industrie agroalimentaires) et $10 \pm 1^\circ\text{C}$ (température maximale des salles de transformation et de découpe en production carnée, et température minimale des drains d'industrie agroalimentaire ; Fuchs *et al.*, 2003).

Deux types d'agitation ont été étudiés soit, une agitation forte (300 rpm) et une agitation nulle (0 rpm) afin d'évaluer l'importance de l'incorporation d'oxygène et ainsi simuler les écoulements turbulents *versus* laminaires et pour déterminer son impact sur l'efficacité de l'exclusion compétitive.

Deux concentrations initiales du consortium bactérien et du cocktail de *Listeria* ont été étudiées soit 5 log ufc/mL qui se justifie par la publication de Zhao (2006) indiquant que *L. monocytogenes* contamine les drains d'industrie agroalimentaire à une concentration pouvant atteindre 5,5 log ufc/mL, et à une concentration plus faible de 3 log ufc/mL correspondant d'une part à la concentration d'utilisation conseillée pour le produit commercial (dilué de 1000 à 10000 fois) et afin pour d'observer un nombre fiable de cellule sans passer trop rapidement sous le seuil de détection (SSD = 1,7 log ufc/mL) de la méthode de dénombrement (voir plus bas).

L'échantillonnage a été effectué à différents temps selon la température d'incubation. À 30°C, l'expérience a duré 24 heures après inoculation des bactéries dans le milieu BHI avec un échantillonnage toutes les 2 heures. Un dénombrement des bactéries en présence et une mesure pH (Thermo Fisher Scientifique, Orion 4 star pH/RDO portable multi paramètre) ont été effectués. A 20°C, l'échantillonnage à été fait toutes les 8 heures sur un temps d'étude total de 56 heures alors qu'à 10°C, l'expérience a été de 10 jours, avec un prélèvement à toutes les 24 heures.

Tableau 5 Plan d'expérimentation des courbes de croissance en cultures pures

Température (°C)	Concentration initiale (log ufc/mL)	Agitation (AA ou SA)
30	3	AA
		SA
	5	AA
		SA
20	3	AA
		SA
	5	AA
		SA
10	3	AA
		SA
	5	AA
		SA

AA = Avec Agitation et SA = Sans Agitation

Les tableaux 5 et 6 illustrent respectivement le plan d'expérimentation des différentes courbes de croissance que nous avons effectuées lors de cette étude en culture pure et en compétition. Chaque courbe de croissance a été effectuée en duplicata et répétée trois fois.

Tableau 6 Plan d'expérimentation des courbes de croissance en compétitions

Température (°C)	Concentration initiale (log ufc/mL)	Agitation (AA ou SA)
30	Bacillus 3 – <i>Lm</i> 3 (<i>Ba3-Lm3</i>)	AA
		SA
	Bacillus 5 - <i>Lm</i> 5	AA
		SA
	Bacillus 3 - <i>Lm</i> 5	AA
		SA
20	Bacillus 5 - <i>Lm</i> 3	AA
		SA
	Bacillus 3 - <i>Lm</i> 3	AA
		SA
	Bacillus 5 - <i>Lm</i> 5	AA
		SA
10	Bacillus 3 - <i>Lm</i> 5	AA
		SA
	Bacillus 5 - <i>Lm</i> 3	AA
		SA
	Bacillus 3 - <i>Lm</i> 3	AA
		SA

Bacillus = produit commercial (consortium bactérien + matrice détergente)

Lm = *L. monocytogenes*

AA = Avec Agitation et SA = Sans Agitation

1.1. Croissance en culture pure

Le produit commercial est contient initialement d'un consortium bactérien de 7 log ufc/mL est dilué dans 90 ml de BHI liquide stérile, jusqu'à la concentration finale de 5 ou 3 log ufc/mL (c'est ce qu'on dit parque signifie « dilution adaptée » dans les figures 7 et 8). L'ensemble des explications qui suivent est illustré à la figure 7 ci-dessous. *L. monocytogenes* initialement à 9 log ufc/mL est dilué de façon similaire. Le contenu de chaque erlenmeyer est homogénéisé à l'aide d'un barreau magnétique stérile présent à l'intérieur de l'erlenmeyer pendant quelques minutes. Finalement, le contenu de chaque erlenmeyer est réparti dans des tubes Falcons de 15 mL à raison de 6 mL par tube. Ce volume est suffisant pour faire le dénombrement et pour mesurer le pH à chaque temps d'échantillonnage. L'ensemble des tubes est placé dans l'incubateur en fonction des conditions expérimentales décrites au tableau 6.

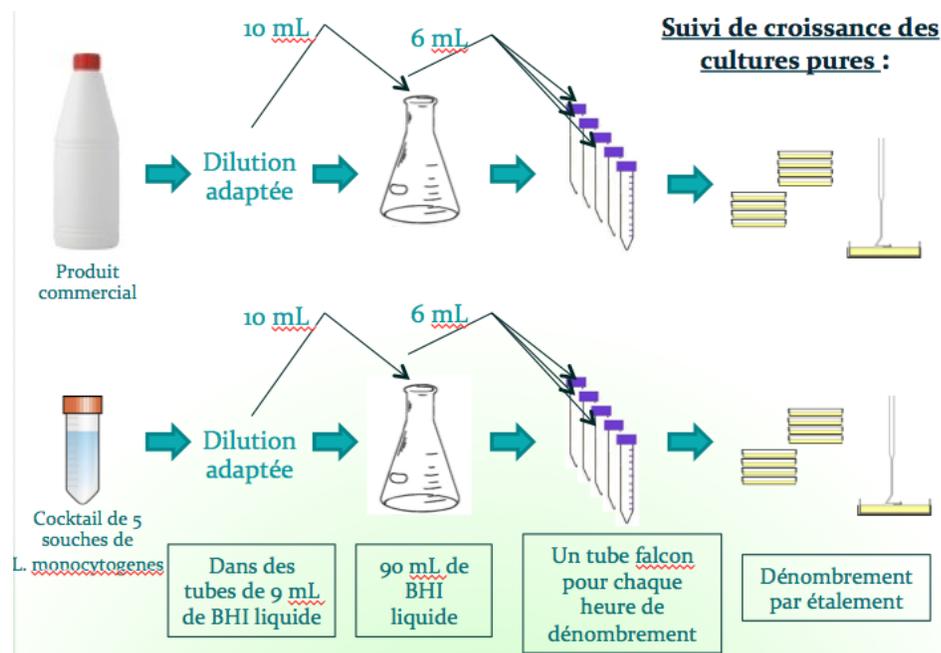


Figure 7 Méthodologie de la croissance en culture pure

Le dénombrement des *Listeria* a été effectué selon la méthode publiée par Santé Canada (2011; MFHPB-30). Des dilutions sériées (1 :10) ont été réalisées dans de l'eau peptonée stérile puis étalées sur le milieu gélosé Palcam (Palcam *Listeria* Agar Base, EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Allemagne) en duplicata. Après une incubation à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 heures, les colonies présentes dans la boîte ont été comptées. Le dénombrement des *Bacillus* a été réalisé sur milieu MYP (MYP Agar Base, EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Allemagne) puis incubé à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 heures. Des tests de contrôle négatif ont été effectués afin de s'assurer qu'aucune souche de *L. monocytogenes* ne pouvait pousser sur milieu MYP et de même aucune colonie de *Bacillus* sp. n' a été observé sur gélose de Palcam.

1.2. Croissance en compétition

Les démarches pour effectuer cette expérimentation sont identiques à celles que nous avons utilisées pour les cultures pures. La différence, illustrée à la figure 8 est que les deux tubes de 10 mL obtenus après dilution, soit les 10 mL de dilution de *L. monocytogenes* et les 10 mL de dilution du produit commercial sont introduits dans un erlenmeyer contenant 80 mL de BHI liquide stérile (20%(v/v)). Les dénombrements sont effectués en inoculant les deux milieux sélectifs. Les dénombrements de *Listeria* ont été réalisés sur Palcam après 48 heures d'incubation à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Et le suivi de la croissance des bactéries du produit commercial, soit les 5 souches de *Bacillus sp.* sont dénombrées sur géloses MYP après 18 heures d'incubation à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

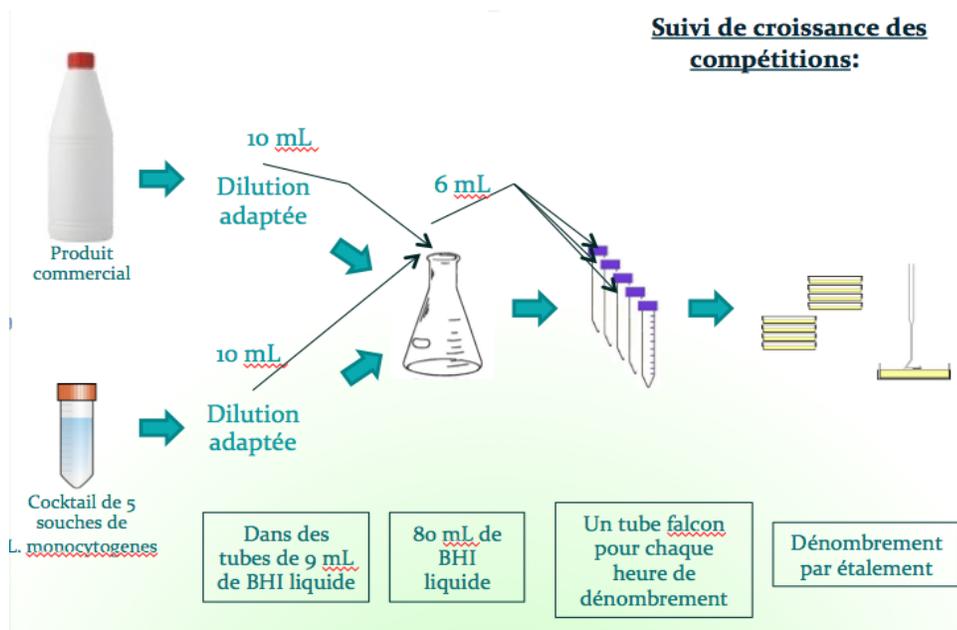


Figure 8 Méthodologie de la croissance en compétition

1.3. Analyses statistiques

L'ensemble des résultats de dénombrement et de pH a été ensuite analysé grâce au logiciel Stat-View. On a réalisé un test de Bartlett afin de vérifier l'homogénéité des variances, puis une analyse des variances a été faite grâce à un test paramétrique (ANOVA) et enfin un test Student-Newman-Keuls (destinés aux valeurs homogènes) pour évaluer les effets du temps et du traitement ainsi que leur interaction. Les expériences de dénombrement des deux types de culture ont été répétées trois fois en duplicata pour plus de précisions dans les résultats. Finalement, un niveau de probabilité de $P < 0.05$ a été utilisé pour juger si les variables ou les interactions sont significatives. Les valeurs de ce niveau de probabilité ont été indiquées dans les graphiques des courbes de croissances correspondant.

2. Interactions microbiennes

2.1. Réalisation du tapis bactérien

La totalité du contenu de l'aliquot (200 μ l) a été prélevée et inoculée dans un tube contenant 9,9 mL de BHI et repiquée de la même manière qu'à la section 1.2. On dilue dans l'eau peptonée (Becton-Dickinson-Difco, Sparks, MD, USA) la culture pure bactérienne afin d'obtenir une suspension bactérienne équivalente à environ $1 \text{ à } 3 \times 10^7$ ufc/mL. Dans les 15 minutes suivant la préparation des cultures, il faut homogénéiser l'échantillon, tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, le presser fermement en le tournant plusieurs fois contre la paroi interne du haut du tube pour en extraire l'excès de liquide. Avec ce même écouvillon, il faut étaler trois fois (sans retremper dans la solution) toute la surface d'une gélose BHI en tournant chaque fois de 90° de façon à assurer un ensemencement uniforme. Attendre quelques minutes (mais pas plus de 5) pour que toute l'humidité sur la surface se résorbe. Lorsque la boîte est sèche, il suffit de percer des trous/puits de 6 mm de diamètre à l'aide d'une pipette stérile de 5 mL. Vous pouvez créer jusqu'à 7 puits par boîte de Pétri (Tagg *et al.*, 1976). Chaque boîte de Pétri, avec les puits doit être remplie dans les 10 minutes après la réalisation du tapis bactérien. Pour ce faire, on a introduit 50 μ L de la suspension bactérienne pure dans le puit. Le tout est incubé 24 h à $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2. Centrifugation, filtration, neutralisation, et protéinase

Pour déterminer la nature du ou des composés exerçant une inhibition, les cultures pures introduites dans les puits subissent différents traitements. La culture pure est centrifugée à 4080g pendant 10 minutes à température ambiante et le culot suspendu dans 1 mL de BHI liquide. En ce qui concerne le surnageant, il peut être stérilisé par filtration à l'aide d'un filtre de 0,45 μ m (Seringue filtrante en acrylique avec membrane en polyéthersulfone, stérile, VWR International, numéro catalogue : 89414-888). Afin de valider que l'inhibition n'est pas le résultat des conditions acides du milieu, le surnageant a été neutralisé jusqu'à un pH de 7 avec du NaOH 0,1 M. Pour s'assurer que l'activité n'est pas dû à la présence d'un peptide antimicrobien, comme par exemple une bactériocine, 5 μ L de protéinase K (Qiagen, Courtaboeuf, France, >600 mAU/ml) est déposé à 2 mm du bord des puits contenant la culture pure non modifiée. Chaque test est effectué en duplicata et répété trois fois.

3. Effet de la matrice détergente du produit commercial

L'activité antimicrobienne de la matrice détergente constituant le produit commercial a été évaluée par la méthode de la goutte sur le tapis bactérien (*Tagg et al., 1976*). Des aliquots de 200 μ L de chacune des souches en phase stationnaire ($\log 9$ ufc/mL) ont été utilisés pour inoculer (1%(v/v)) 7,5 mL milieu gélose BHI molle à 0,75% d'agar avec pour ensuite être déposé sur une gélose BHI standard présolidifiée. Un aliquot de 5 ml du produit commercial a été centrifugé à 4°C, 4080 rpm pendant 10 minutes, le surnageant a été récupéré et inoculé sans dilution et dilué jusqu'à 1 :10000 dans du BHI. Un aliquote (50 μ L) de chacune des dilutions a été déposé sur la gélose inoculée. L'effet de la matrice a été étudié à 30, 20 et 10°C. Le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré à l'aide d'un vernier (Vernier Caliper, numero de série 70285062, 150 mm, Mitutoyo Corporation, Takatsu-ku, Japon) après une incubation de 24 heures à 30°C; 48 heures à 20°C et 7 jours à 10°C.

Résultats

1. Courbes de croissance

1.1. Croissance à 30°C

1.1.1. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

La figure 9 ci-dessous présente l'évolution des courbes de croissance des *Bacillus* et de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition à des concentrations initiales de 3 log ufc/mL à 30°C avec et sans agitation. Ce que l'on remarque en premier, c'est que la concentration finale en culture pure est de 9,2 log ufc/mL pour *L. monocytogenes* et de 7,5 log ufc/mL pour *Bacillus*. On observe également qu'en culture pure, pour les deux espèces, il n'y a pas d'effet de l'agitation sur la croissance ($P > 0,05$). Dans tous les cas, la phase de latence est de 2 heures. En ce qui concerne les compétitions, on voit qu'il n'y a pas de différences significatives ($P > 0,05$) entre les *Bacillus* en culture pure et en compétition. Par contre, on remarque une différence significative ($P < 0,05$) de 2 log ufc/mL entre les *Listeria* en culture pure et en compétition allant de 3 à 5 log ufc/mL. De plus, il existe une différence significative ($P < 0,05$) entre la croissance de *Listeria* en compétition avec agitation et la croissance de *Listeria* en compétition sans agitation, cette différence est d'environ 2 log ufc/mL. On retient de cette expérimentation que l'exclusion compétitive est efficace dans cette situation à partir de la huitième heure d'étude (soit à $T = 8$), et que l'inhibition de *L. monocytogenes* est plus importante lorsque le milieu est agité.

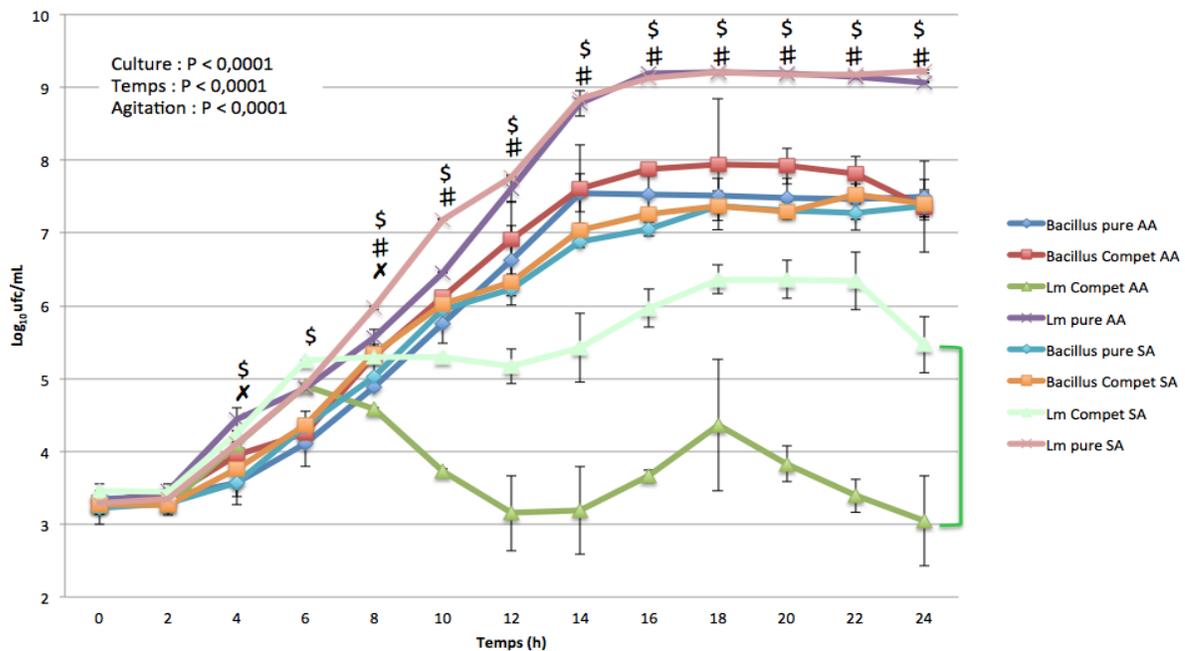


Figure 9 Courbes de croissance à 30°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL.

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, *Lm* pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, *Lm* Compet = compte bactérien spécifique au le cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

La figure 10 présente les résultats des pH des solutions des courbes de croissance dans les mêmes conditions que la figure 9. Le pH reste stable pendant 12 heures puis diminue. En culture pure, le pH de *Bacillus* diminue jusqu'à se stabiliser vers 6,5. Pour *Listeria* en culture pure, le pH chute plus fortement pour atteindre 5,5 avec agitation et 5,2 sans agitation. La barre violette reliant les deux courbes violette et rose sur le coté de la figure 10 illustre cette différence significative ($P < 0,05$). En compétition (une seule donnée pH à cause du milieu commun pour la compétition), il n'y a pas de différence significative entre les valeurs avec ou sans agitation. De plus il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre les valeurs de pH de *Bacillus* en culture pure et des valeurs de pH du milieu en compétition, ces deux se stabilisent à 6,5. Si l'on compare les figures 9 et 10, on remarque que lorsque les courbes de croissances des bactéries atteignent plus de 6,5 log ufc/mL après 12 h d'expérimentation, le pH diminue. Cette baisse de pH suggère qu'une activité métabolique des souches dans le milieu de croissance a bel et bien eu lieu. Le constat sur la différence significative des courbes de pH entre *Listeria* et *Bacillus* en culture pure évoqué plus haut nous fait remarquer que la capacité de production d'acide est plus importante chez *Listeria* que chez *Bacillus*. De plus, cette même capacité de

production d'acide est plus forte sans agitation qu'avec agitation chez *Listeria* en culture pure (toujours illustré par la barre violette figure 10). Le fait qu'en compétition le pH demeure plus élevé que pour *L. monocytogenes* en culture pure suggère que l'activité de cette dernière est réduite en compétition ou bien que les composés de dégradations produit par *Bacillus* ont un pouvoir tampon ralentissant la chute de pH.

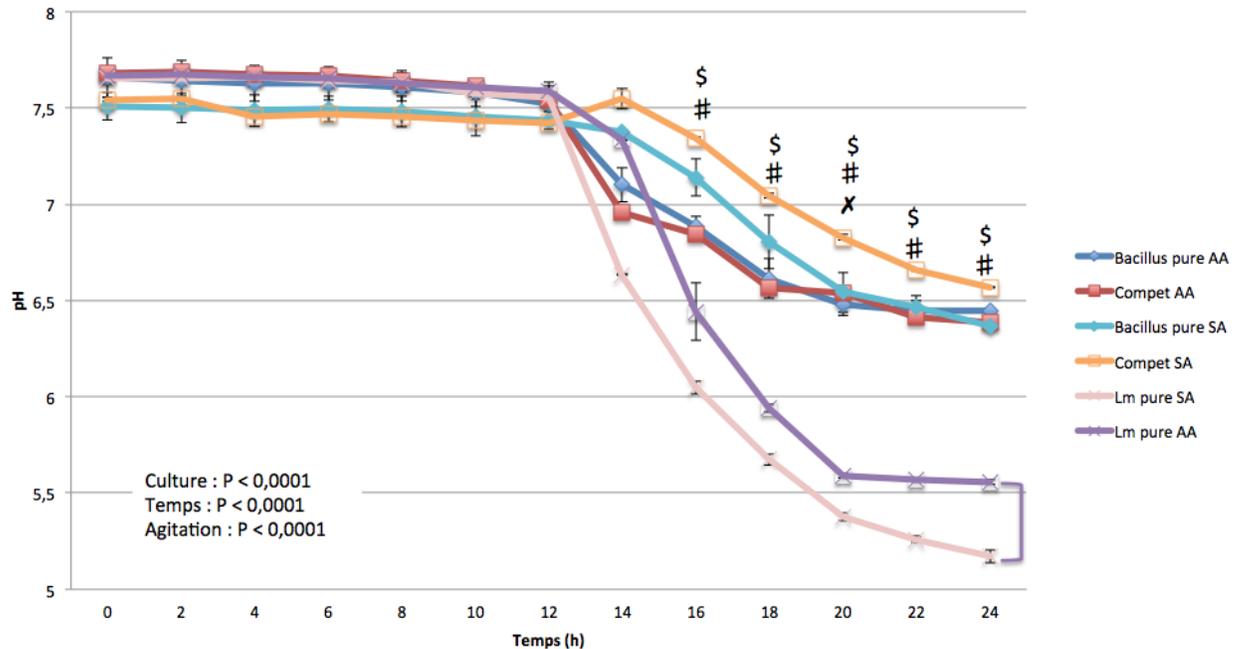


Figure 10 Suivi de l'évolution du pH à 30°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, x = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

1.1.2. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

La figure 11 présente les croissances à 30°C aux concentrations du consortium de *Bacillus* avec matrice détergente à 5 log ufc/mL et de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL. On s'aperçoit rapidement de l'importante différence significative ($P < 0,05$) qui existe entre les valeurs de *Listeria* en culture pure et en compétition. Par exemple après 12 heures de culture, les valeurs en culture pure sont de 9 log ufc/mL alors qu'en compétition elles ne sont que de 7,2 log ufc/mL. De plus, *Listeria* en compétition avec une concentration initiale de 5 log ufc/mL met 10 heures de plus pour atteindre la phase stationnaire.

Pour *Bacillus*, les comptes en culture pure et en compétition ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$), sauf aux temps 2, 4 et 18. Ces cultures atteignent leur phase exponentielle après 14 heures alors que cette valeur n'est que de 2 heures pour les *Listeria*. L'inhibition des *Listeria* n'est donc pas causée ici par la croissance des *Bacillus*, on suggère que la matrice détergente a un effet sur le cocktail de *Listeria*, ce qu'il nous faudra démontrer (tableau 10 et figure 35 au point 3). Ce retard de croissance des *Bacillus* est probablement provoqué par un effet d'inhibition de la matrice du produit (pas assez dilué pour permettre une bonne croissance), donc moins d'inhibition de *Listeria* dans ces conditions d'inoculation forte. Le retard de croissance de *Listeria* est probablement explicable par les mêmes paramètres.

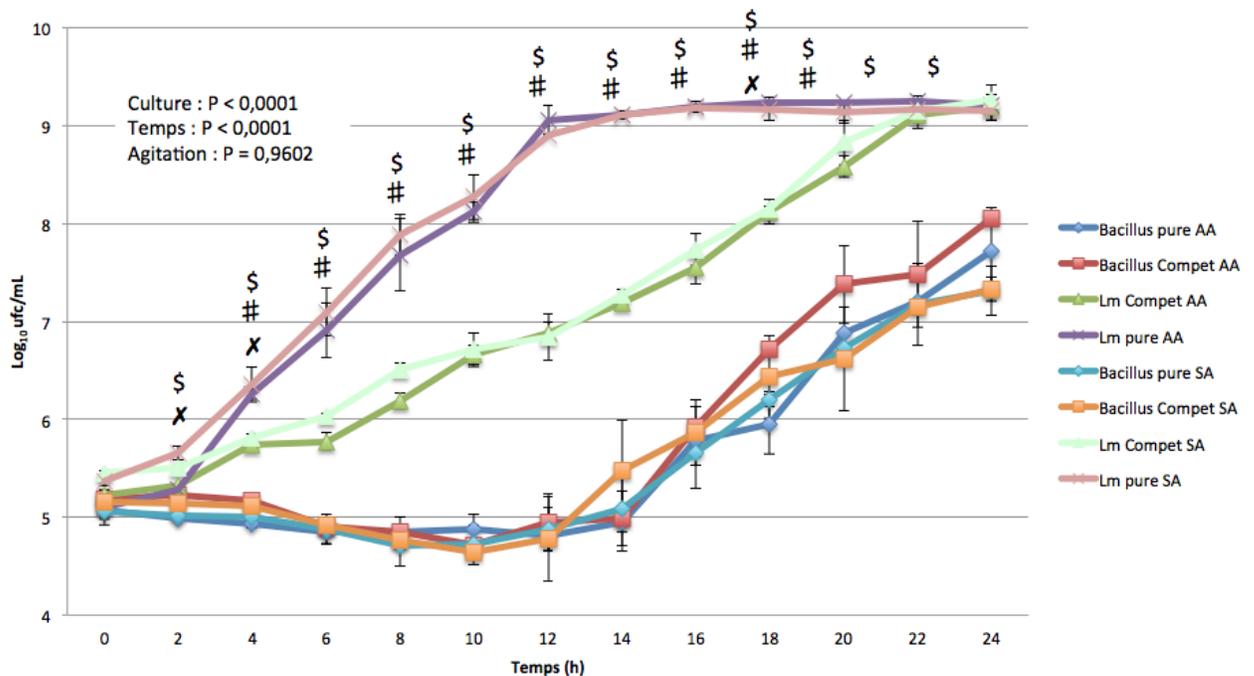


Figure 11 Courbes de croissance à 30°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L.*

monocytogenes, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien spécifique au le cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

En ce qui concerne l'évolution du pH à 30°C pour l'étude dans ces mêmes concentrations, on remarque que sur la figure 12, les valeurs de pH lors de la compétition sont significativement différentes de celles de *Bacillus* en culture pure, de celles de *Listeria* en culture pure et les valeurs de pH en compétition avec agitation (6,1) sont différentes de celles sans agitation (5,4); voir barre orange sur figure 12. Pour *Bacillus* en culture pure, les valeurs avec et sans agitation ne sont pas statistiquement différentes ($P > 0,05$), ces dernières avoisines une valeur de pH de 7,4; ce qui est proche de la valeur initiale (7,5).

De leurs côtés, les valeurs de pH pour le cocktail de *Listeria* en culture pure sont différentes significativement ($P < 0,05$) de celles avec agitation (5,55) et sans agitation (5,20), illustrées par la barre violette. Ce constat a déjà été noté à la figure 10. La chute de pH est plus rapide chez *Listeria*, soit après 8 heures de culture, alors que pour la compétition, la chute se produit après 16 heures, ce qui suggère un métabolisme plus lent.

Les valeurs de pH nous servent ici d'indicateur, et auront le même rôle dans les autres expérimentations. On remarque donc l'activité métabolique importante dans les milieux où *Listeria* est en culture pure, modérée dans les milieux en compétition et faible pour les milieux de croissance de *Bacillus* en culture pure. Ces constatations suggèrent que dans le milieu pour cette compétition, l'activité de *Listeria* est plus forte que celle de *Bacillus* ce qui tend à confirmer les résultats des courbes de croissances à la figure 11.

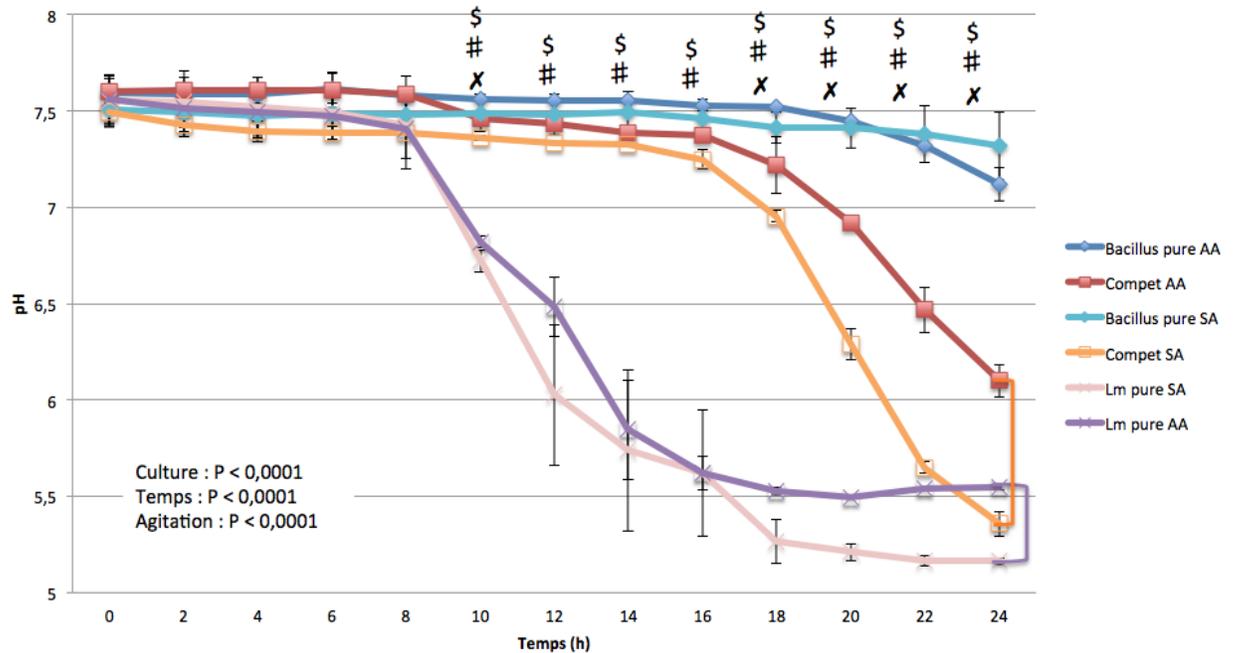


Figure 12 Suivi de l'évolution du pH à 30°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage (P < 0,05).

1.1.3. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Dans cette situation, les concentrations initiales ne sont plus identiques, mais ici, à la figure 13, le consortium bactérien commence avec un inoculum à 2 log ufc/mL de moins que le cocktail de *Listeria* (*Bacillus* à 3 log ufc/mL et *Listeria* à 5 log ufc/mL). On remarque qu'il n'y a pas de différence significative entre les croissances de *Bacillus* en culture pure et en compétition, quelle que soit l'importance de l'agitation ($P > 0,05$). Pour cette espèce, la phase de latence est de 2 heures.

Ce qui saute aux yeux, c'est la différence significative ($P < 0,05$) entre les courbes de *Listeria* en culture pure et en compétition à partir de 6 heures de croissance. On remarque que les courbes de *Listeria* en compétition atteignent un maximum de 7 à 7,3 log ufc/mL après 10 heures de croissance pour diminuer rapidement et se stabiliser à 5,1 log ufc/mL pour la courbe avec agitation et à 6,1 log ufc/mL sans agitation. Il existe donc après 24 heures de croissance une différence de 1 log ufc/mL entre les courbes AA et SA de *Listeria* en compétition. Mais plus important, il existe une différence de 3 log ufc/mL entre la courbe sans agitation de la culture pure (9,1 log ufc/mL) et celle en compétition (6,1 log ufc/mL). Cette différence est encore plus marquée sur les courbes avec agitation de la culture pure de *Listeria* (9,1 log ufc/mL) et celle en compétition (5,1 log ufc/mL) : cette différence est de 4 log ufc/mL. L'exclusion compétitive exercée par le consortium de *Bacillus* est donc efficace dans cette situation.

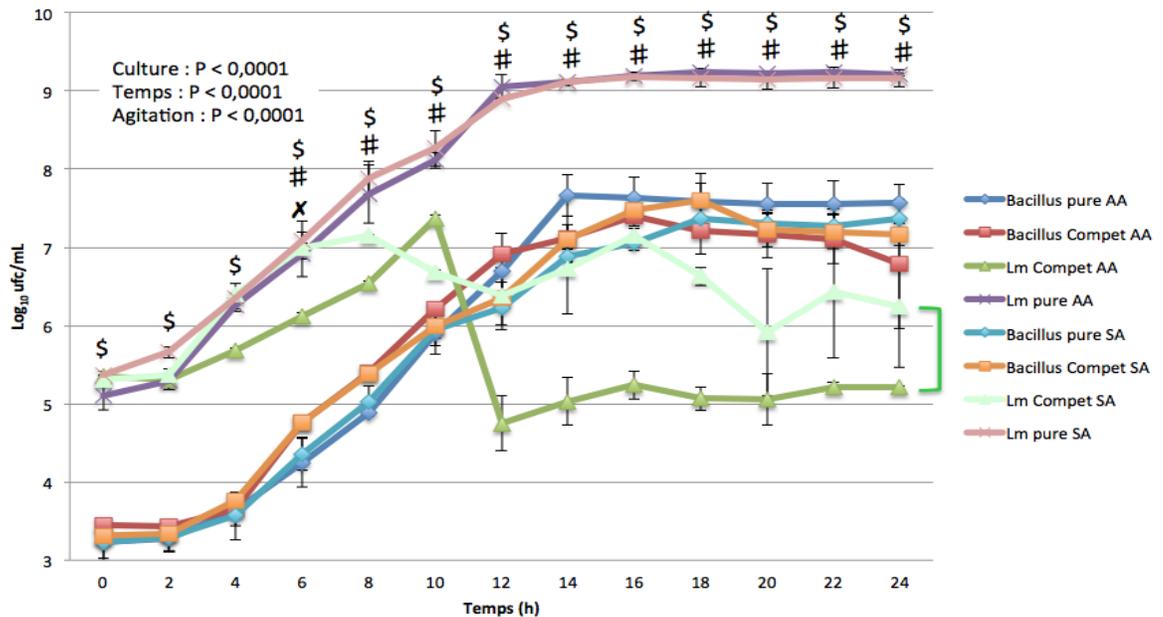


Figure 13 Courbes de croissance à 30°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L.*

monocytogenes, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien spécifique au le cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

La figure 14 présente donc les valeurs de pH des cultures de la figure 13. De nouveau, il existe une différence significative entre les données pH de *Bacillus* et *Listeria* en culture pure à partir de 10 heures d'expérimentation ($P < 0,05$). Les valeurs finales de ces deux espèces en culture pure diffèrent d'une unité de pH. Dans cette situation, il n'existe que rarement des différences significatives entre les valeurs de *Bacillus* en culture pure et la compétition, seuls les temps 10, 12 et 18 montrent une différence entre ces valeurs. La valeur de pH finale des courbes de *Bacillus* en culture pure et de la compétition est proche de 6,4 et n'est pas considérée comme significativement différente ($P > 0,05$). Il est possible que dans un cas où l'oxygène serait en plus grande disponibilité (utilisation d'ermeneyer de 125 mL par exemple) ces différences auraient été beaucoup plus marquées car le consortium aurait été beaucoup plus compétitif.

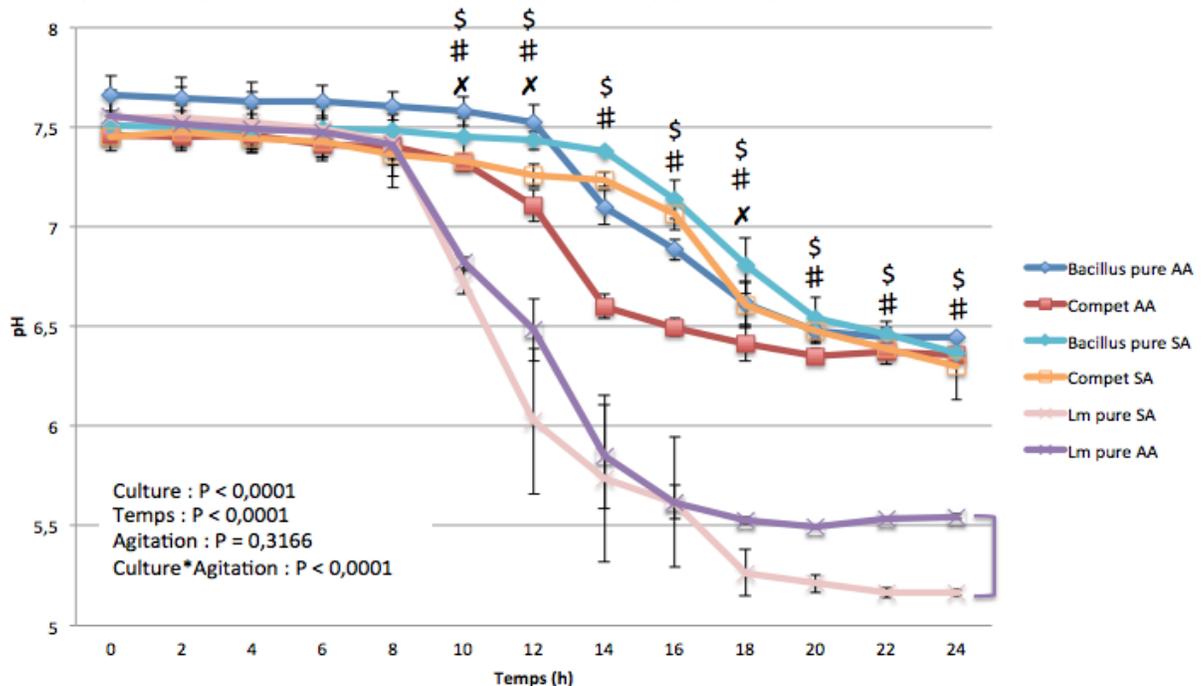


Figure 14 Suivi de l'évolution du pH à 30°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

1.1.4. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Cette fois-ci, c'est le consortium bactérien qui est en concentration initiale 100 fois plus élevée que celle du cocktail de *Listeria* (B5-L3; figure 15). Ce dernier présente de très légères différences significatives (X) à $P < 0,05$ entre sa croissance en culture pure et en compétition au début (temps T0 et T2) et en fin de croissance aux temps 14, 18, 22 et 24. La phase de latence est à nouveau de 12 heures, probablement causée par la présence en concentration suffisante de la matrice détergente. Il n'y a toujours pas de différence significative entre les données AA et SA de *Listeria* en culture pure : phase de latence de 2 heures, phase exponentielle de 2 à 14 heures et phase stationnaire à 9 log ufc/mL. Par contre, même s'il n'existe pas de différence entre les courbes AA et SA de *Listeria* en compétition, il existe une différence significative entre les courbes de *Listeria* en culture pure et en compétition. En effet après 24 heures, les courbes de *Listeria* en compétition n'ont toujours pas atteint leur phase stationnaire et finissent à 7 log ufc/mL pour les courbes avec et sans agitation. Ici, la croissance du cocktail de *Listeria* est inhibée, mais à cause de la croissance tardive du consortium de *Bacillus* dans ce même milieu, il n'est pas impossible que l'effet observé soit celui de la matrice détergente principalement.

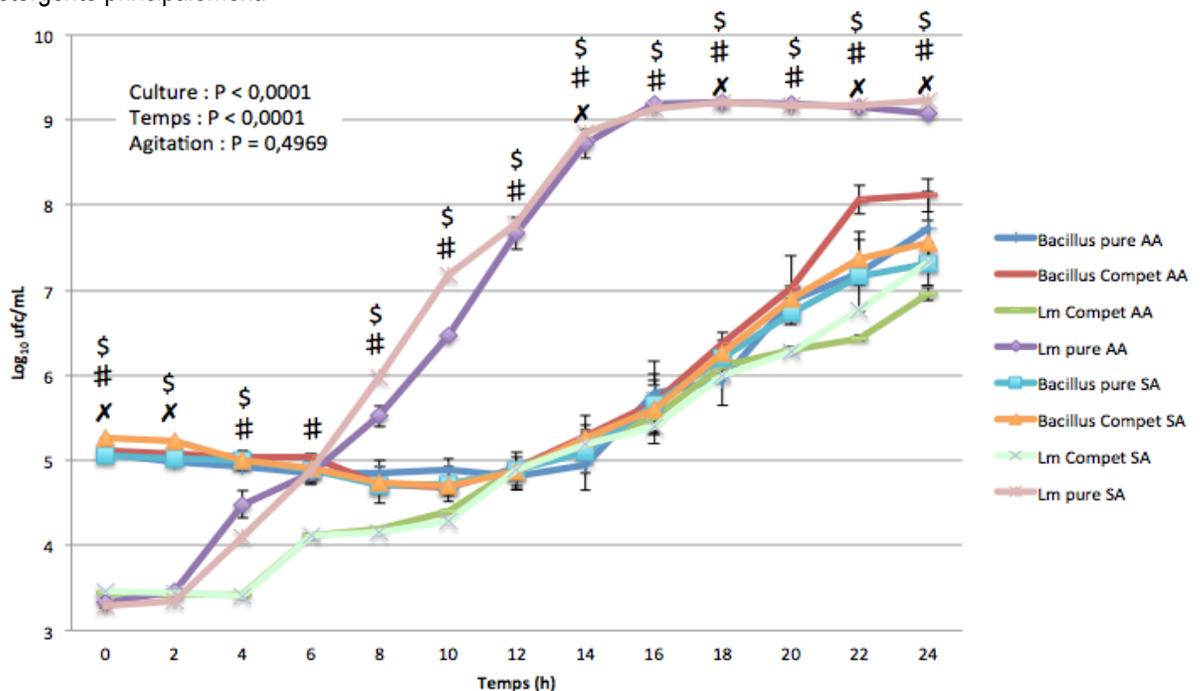


Figure 15 Courbes de croissance à 30°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien spécifique au le cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en

culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

D'après la figure 16, le pH de la culture de *Bacillus* diminue très faiblement en 24 heures pour ne régresser que de 0,3. Par contre, on observe une différence significative des valeurs de pH de la culture de *Bacillus* en culture pure et de la compétition à partir de la 22^{ème} heure ($P < 0,05$). On remarque également que les pH AA et SA de la compétition évoluent différemment à partir de cette même 22^{ème} heure pour finir après 24 heures avec une différence de pH de 0,5 (barre orange). On retrouve la différence significative des pH de *Listeria* en culture pure AA et SA à partir de 14 heures de croissance (barre violette), le pH final de la solution AA est de 5,6 alors que celle SA est de 5,2. Finalement, ce graphique illustre la différence significative ($P < 0,05$) existante entre la culture en compétition et la culture pure de *L. monocytogenes*, la différence de pH entre ces deux cultures est de 1,5 après 24 heures de croissance. Ces résultats confirment l'inhibition des *Listeria* lors de la compétition. Le produit commercial est efficace dans tous les cas à l'étude à 30°C, même si la cause de cette inhibition est probablement partagée entre l'exclusion compétitive exercée par le consortium bactérien de *Bacillus* et l'inhibition possible qu'effectue la matrice détergente.

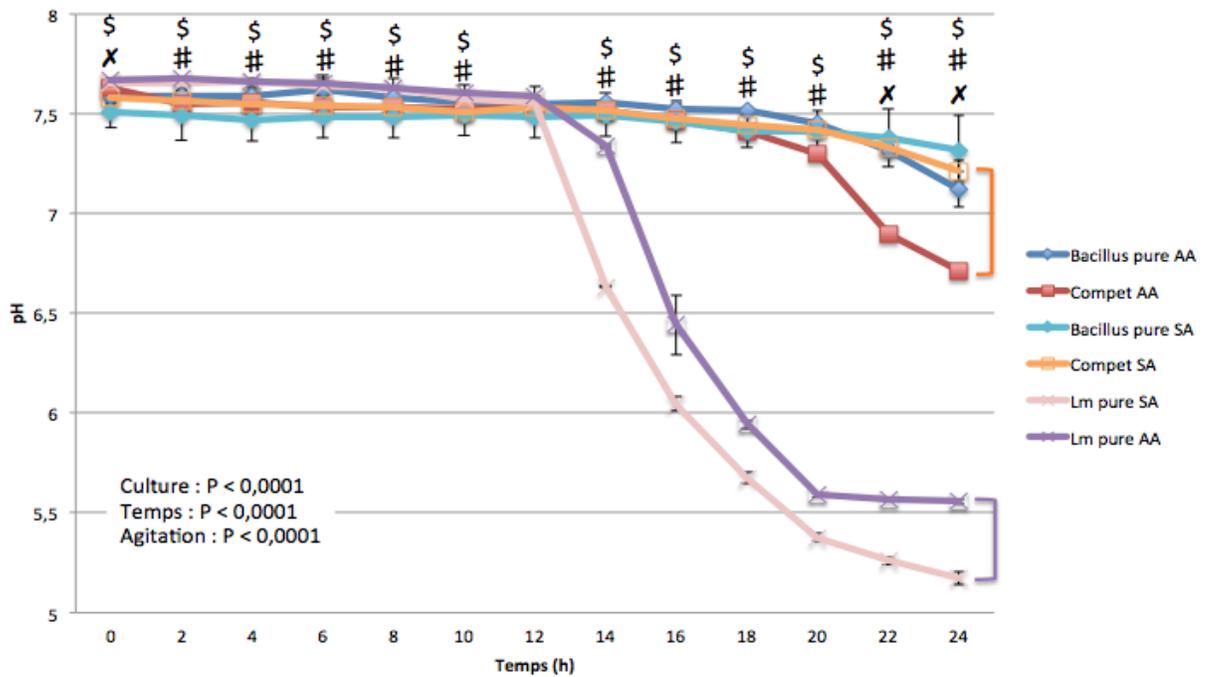


Figure 16 Suivi de l'évolution du pH à 30°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

1.2. Croissance à 20°C

1.2.1. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

La figure 17 illustre cette fois-ci les croissances à 20°C. On remarque qu'il n'y a pas de différence entre les cultures de *Bacillus* en compétition et celle en culture pure, il n'y a pas non plus de différence entre avec et sans agitation ($P > 0,05$). De plus, pour *Bacillus*, la phase de latence est de 8 heures à 20°C et non plus de 2 heures comme à 30°C, et la phase stationnaire est atteinte après 48 heures et non 14 heures comme à 30°C. Il y a une absence de différence des comptes bactériens du cocktail de *Listeria* en culture pure et en compétition entre 2 et 24 heures de croissance. Mais à partir de 32 heures, cette différence apparaît entre ces comptes ($P < 0,05$). De plus, il existe d'après ce graphique une différence significative entre les comptes de *Listeria* en compétition avec agitation et sans agitation à partir de la 32^{ème} heure de culture ($P < 0,05$) : les comptes sans agitation sont supérieurs d'environ 3 log ufc/mL (ecart-type important) par rapport à ceux avec agitation. Le facteur agitation a donc un impact sur l'efficacité de l'exclusion compétitive exercé par le consortium de *Bacillus*. Lorsque le milieu est agité, l'efficacité de l'exclusion est renforcée, et la croissance du cocktail de *Listeria* est inhibée : le produit commercial est donc efficace dans ces conditions. L'inhibition causée par l'agitation a également été notée à 30°C, la différence des comptes du cocktail de *Listeria* en compétition était alors de 2,5 log ufc/mL après 24 heures. Cette inhibition est comparable, mais le temps nécessaire pour arriver à la même inhibition, soit 3 log ufc/mL environ est de 32 heures de plus (56 heures à 20°C moins 24 heures à 30°C) lorsqu'on diminue la température de 10°C.

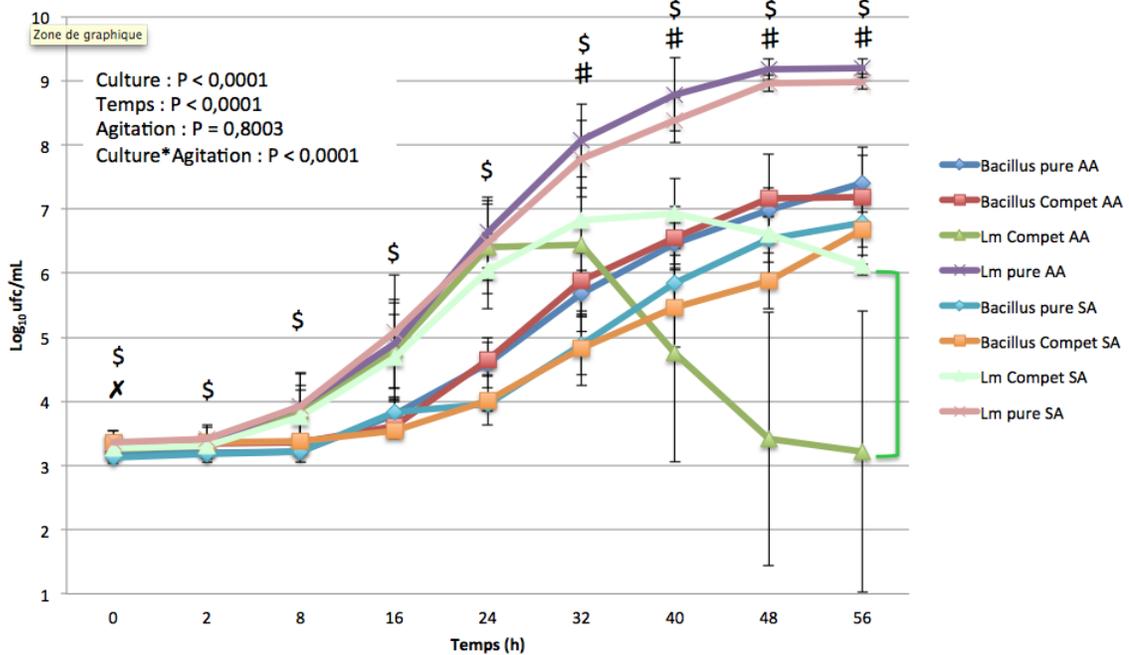


Figure 17 Courbes de croissance à 20°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien spécifique au le cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage (P < 0,05).

Dans le cas du suivi pH à la figure 18, on s'aperçoit qu'il existe une différence entre le pH du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition à partir de 48 heures. Cette différence est de 0,8 unité de pH entre chaque type d'agitation à 56 heures (pour AA : on a un pH à 7,5 en culture pure, et un pH de 6,7 en compétition; pour SA : on a un pH à 7,3 en culture pure et un pH de 6,5 en compétition). Les pH de la compétition sont également différents de ceux de *Listeria* en culture pure, eux-mêmes différents de ceux de *Bacillus* en culture pure (P < 0,05).

Hormis pour *Listeria* en culture pure, il n'y a pas de différence de l'effet de l'agitation (P < 0,05). La différence entre les données pH AA et SA de *Listeria* en culture pure n'est significative qu'à 56 heures : cette différence est de 0,5 unité (barre violette). Ces données peuvent illustrer l'inhibition des *Listeria* causée par exclusion compétitive.

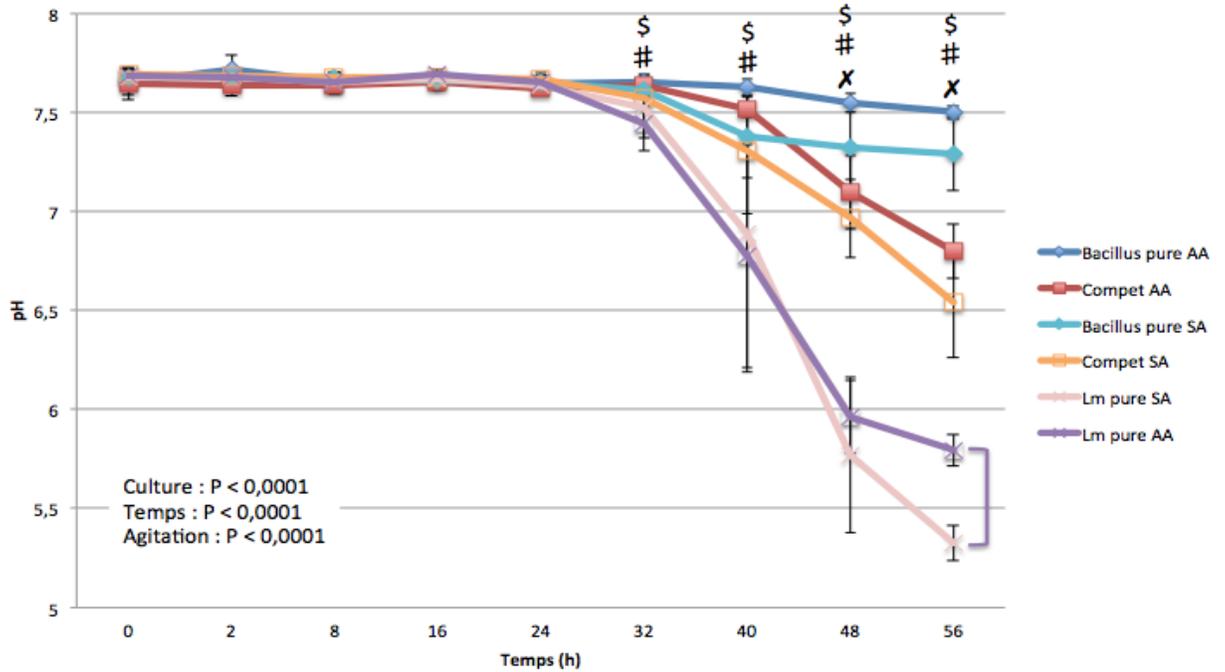


Figure 18 Suivi de l'évolution du pH à 20°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

1.2.2. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Lors d'une compétition du consortium bactérien de *Bacillus* à 5 log ufc/mL et du cocktail de *Listeria* à 5 log ufc/mL, on voit rapidement que les courbes de croissance de l'ensemble des *Bacillus* (en culture pure et en compétition, AA et SA) sont stables et que les comptes bactériens de ces espèces n'évoluent pas. Le résultat le plus important ici est l'absence de croissance autant des *Listeria* que du consortium de *Bacillus* en compétition. Les concentrations de chacun demeurent égales à la concentration d'origine de 5 log ufc/mL. Il y a toutefois une différence allant jusqu'à 4 log ufc/mL après 56 heures d'incubation, entre les comptes de *Listeria* en compétition et en culture pure à partir de 8 heures de culture et ce autant avec que sans agitation. Finalement on observe aussi qu'il existe une différence entre les comptes en culture pure de *Bacillus* et les comptes en culture pure de *Listeria monocytogenes* à partir de 2 heures d'incubation ($P < 0,05$). Dans cette situation, il y a une inhibition de la croissance de *Listeria* lors de la compétition. Si l'on compare ces résultats à l'évolution de la compétition dans les mêmes concentrations à 30°C, on voit que la température a un effet sur la capacité de *Bacillus* de croître en l'inhibant alors que *Listeria* en culture pure atteint sa capacité maximale de croissance dans ce milieu (soit 9 log ufc/mL). A 5 log ufc/mL, et à 20°C, la température et la matrice ont un effet combiné sur le consortium de *Bacillus* en empêchant leur croissance. Or ici *Listeria* en compétition est inhibé également, comme la température ne peut pas à elle seule l'expliquer, il doit s'agir de l'effet matrice.

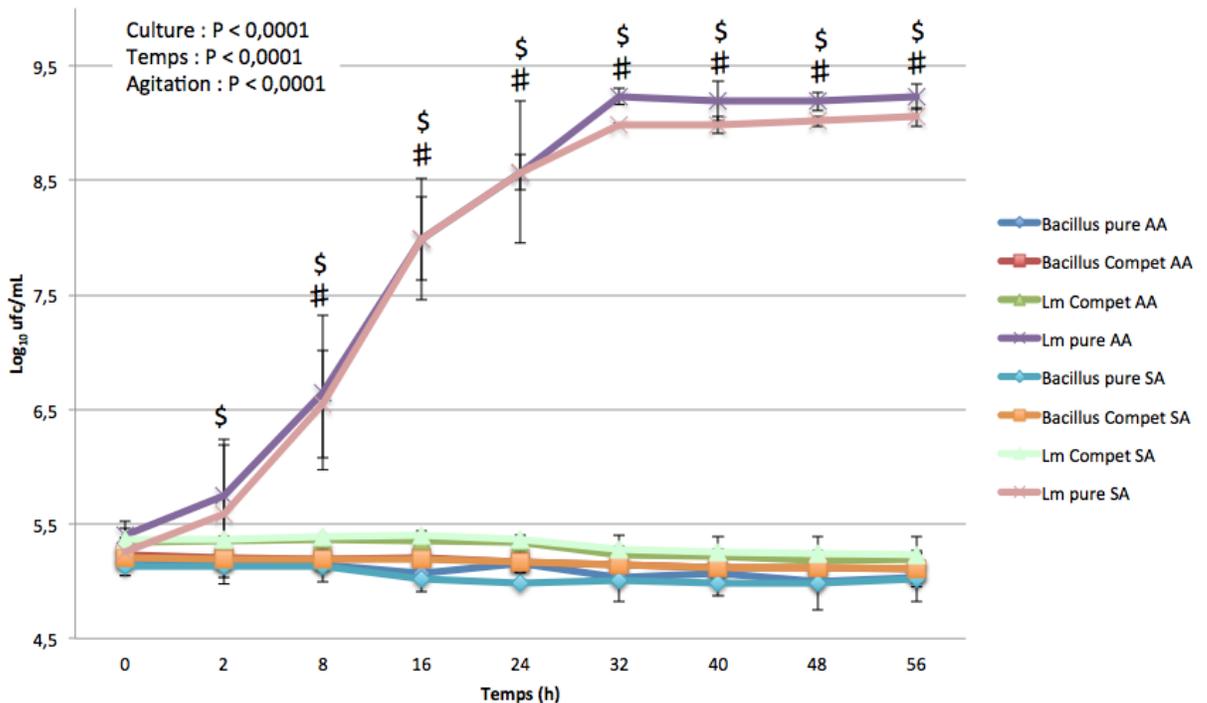


Figure 19 Courbes de croissance à 20°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien spécifique au cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, \times = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

Les informations principales extraites de la figure 20 sont les courbes de pH du consortium de *Bacillus* en culture pure et les courbes de pH du même consortium en compétition qui n'évoluent pas dans le temps, elles conservent leurs valeurs de pH initiales de 7,6. Ce qui n'est pas le cas à 30°C. Seules les valeurs de pH (AA et SA) du cocktail de *Listeria* en culture pure diminuent. On observe une différence significative entre les courbes de *Listeria* en culture pure et celles de *Bacillus* en culture pure et entre les courbes de *Listeria* en culture pure et *Listeria* en compétition après 24 heures de culture (# et \$). Il existe également une différence significative ($P < 0,05$) entre les deux courbes AA et SA des *Listeria* en compétition à partir de la 40^{ème} heure qui finit par provoquer une différence de 0,3 unité de pH à la fin de l'expérience, soit 56 heures (barre violette). Dans les conditions à l'étude, la température, le taux d'inoculation élevé pour le consortium de *Bacillus* ainsi que la présence de la matrice détergente est tel qu'il pourrait prévenir la germination des spores de *Bacillus* et par conséquent toute activité métabolique mesurable. Il semble que le cocktail de *Listeria* en compétition aussi soit complètement inhibé puisqu'il n'y a aucun abaissement du pH.

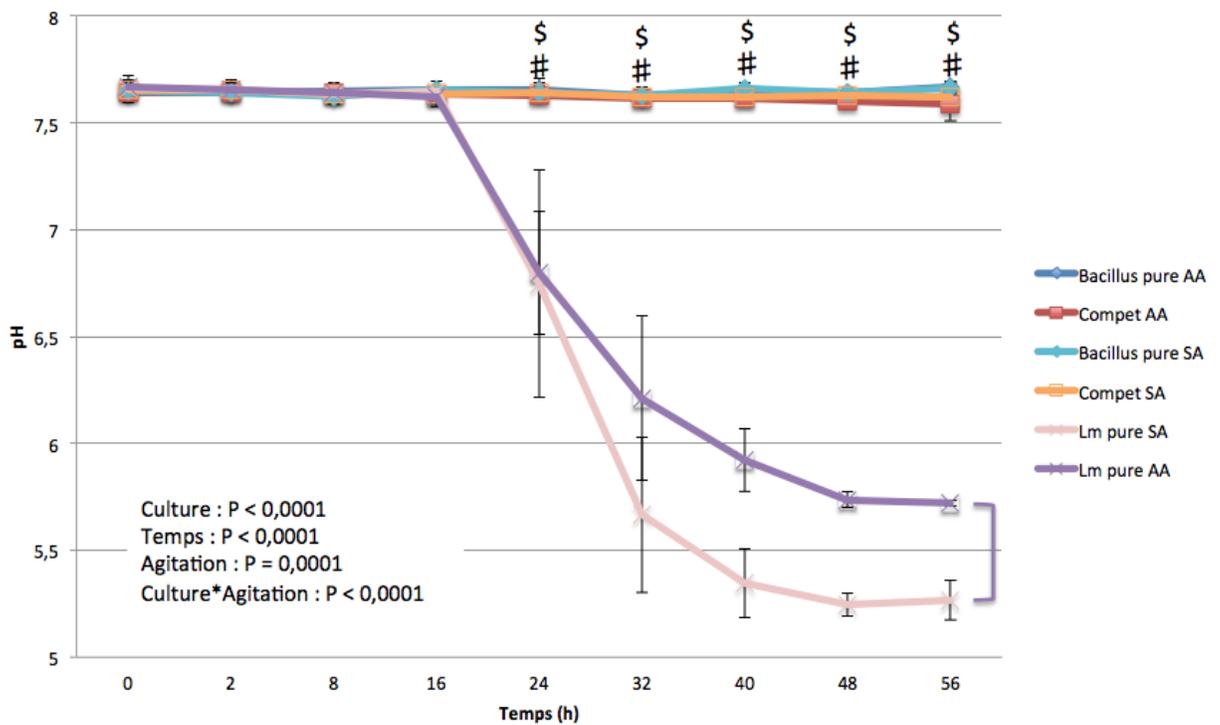


Figure 20 Suivi de l'évolution du pH à 20°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, χ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

1.2.3. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

La figure 21 présente les résultats de l'étude à 20°C avec deux concentrations initiales différentes où le consortium de *Bacillus* est 100 fois moins concentré que le cocktail de *Listeria*. On remarque que les comptes de *Bacillus* en compétition sont inférieurs à ceux en culture pure ($P < 0,05$) et que le maximum à log 7 ufc/mL est atteint après que la phase stationnaire des cultures pures soit atteinte comparativement à 30°C (figure 13). Ainsi, la température de 20°C semble moins favorable pour *Bacillus* que pour le cocktail de *Listeria* à un point tel où les comptes de *Listeria* en compétition rejoignent ceux des cultures pures suggérant que, dans ces conditions, *Bacillus* n'est plus en mesure d'exercer une exclusion compétitive sur *Listeria*. Après 32 heures d'incubation, il existe une différence entre les comptes du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux en compétitions, et qu'elle n'arrête pas de s'accroître jusqu'à atteindre 2 log ufc/mL à 56 heures. On observe également un effet significatif ($P < 0,05$) de l'agitation sur les courbes de *Bacillus* en compétition avec et sans agitation après 24 heures de culture : cette différence est de 1,2 log ufc/mL après 56 heures d'incubation, les comptes du consortium de *Bacillus* avec agitation est plus important que sans agitation. On observe donc ici que ni le consortium bactérien (croissance trop lente), ni la matrice détergente (concentration trop faible) ne peuvent permettre d'inhiber le cocktail de *Listeria* ce qui était le cas à 30°C. Une diminution de 10°C a donc eu un effet sur la capacité du consortium de *Bacillus* à réaliser une compétition sur le cocktail de *Listeria*.

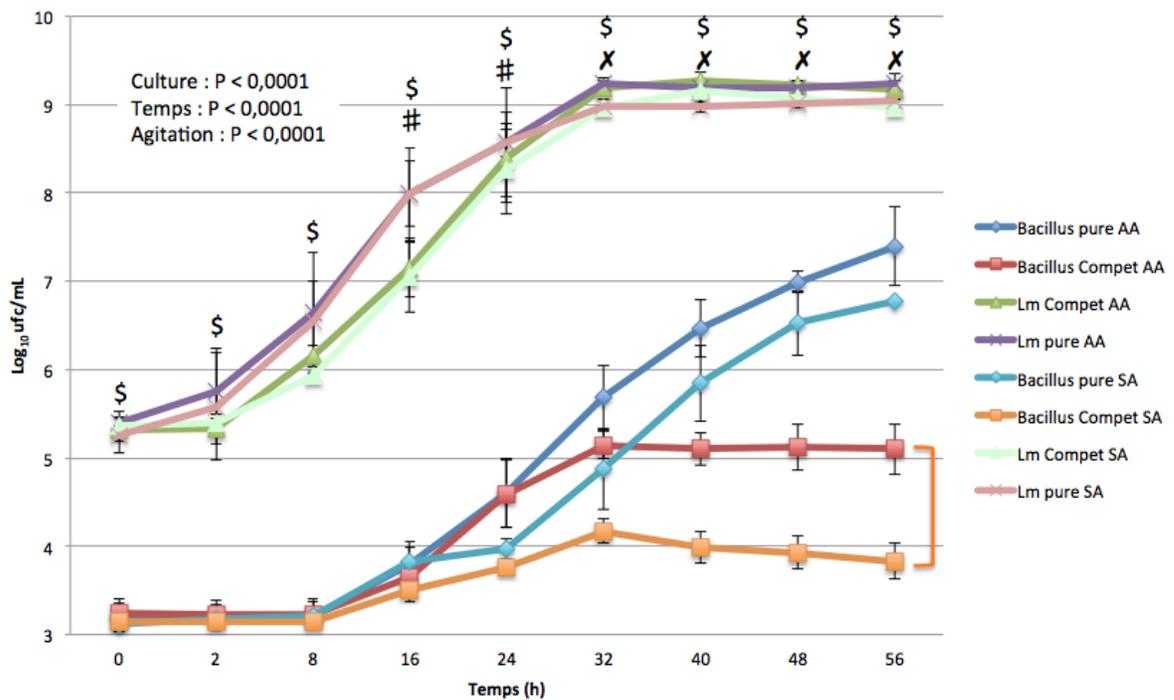


Figure 21 Courbes de croissance à 20°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien spécifique au le cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage (P < 0,05).

Les valeurs de pH de la figure 22 révèlent en premier lieu qu'il n'y a pas de différence significative (P < 0,05) entre les courbes de *Listeria* en culture pure et en compétition mais l'effet de l'agitation est significatif, les cultures sans agitation on un pH plus bas (P < 0,05). Si l'on compare ces deux mêmes situations à celles à 30°C (figure 14), on observe des différences significatives (P < 0,05) entre les valeurs de pH de *Listeria* en culture pure et en compétition et ce avec ou sans agitation. On en conclut que la température a un effet significatif et négatif sur l'activité métabolique des *Bacillus* faisant en sorte que l'exclusion compétitive ne peut s'établir dans ces conditions expérimentales.

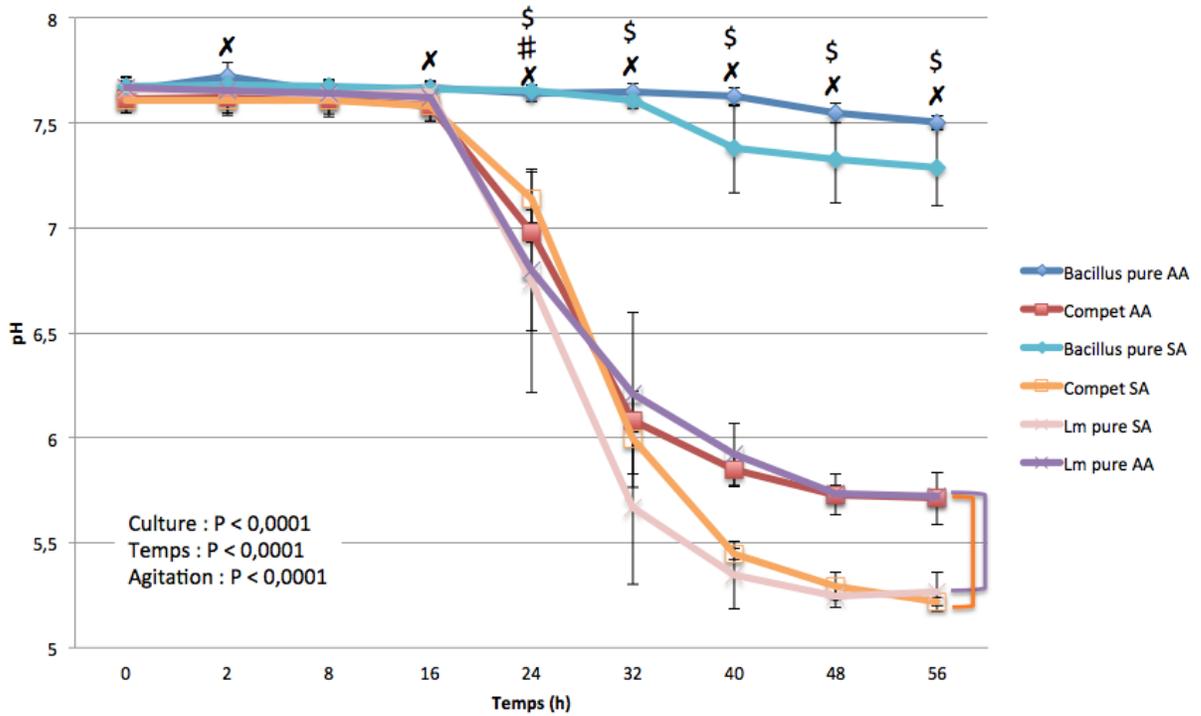


Figure 22 Suivi de l'évolution du pH à 20°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

1.2.4. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

On remarque à la figure 23 qu'il n'y a aucune croissance du consortium de *Bacillus* en compétition, il y a tout de même une différence significative entre les comptes bactériens du cocktail de *Listeria* en culture pure et les comptes de *Listeria* en compétition ($P < 0,05$). En effet, les comptes de *Listeria* en compétition restent identiques aux comptes initiaux, soit 3,4 log ufc/mL. Il en va de même pour la croissance des *Bacillus*, que ce soit en culture pure ou en compétition, les comptes restent sensiblement fidèles à la concentration en début d'expérience, soit 5,2 log ufc/mL, comme au point précédent (*Bacillus* à 3 log ufc/mL) on constate une croissance, on en déduit que la matrice détergente inhibe le consortium de *Bacillus*. De plus, l'agitation n'a aucun effet dans ces conditions sur la croissance des organismes ($P = 0,21$). Il y a donc une inhibition de *Listeria*, mais comme les comptes consortium de *Bacillus* n'ont pas augmenté dans le temps, il n'est pas évident que le maintien des comptes de *Listeria* à la concentration initiale soit le fruit d'une exclusion compétitive, il n'est pas impossible que l'effet observé soit dû à la matrice détergente qui pourrait être encore en concentration suffisante pour exercer une inhibition sur les deux organismes. Comme le cocktail de *Listeria* en compétition dans les mêmes concentrations mais à 30°C a réussi à croître, on déduit qu'en diminuant de 10°C le milieu, les *L. monocytogenes* perdent possiblement la capacité à résister à la matrice détergente.

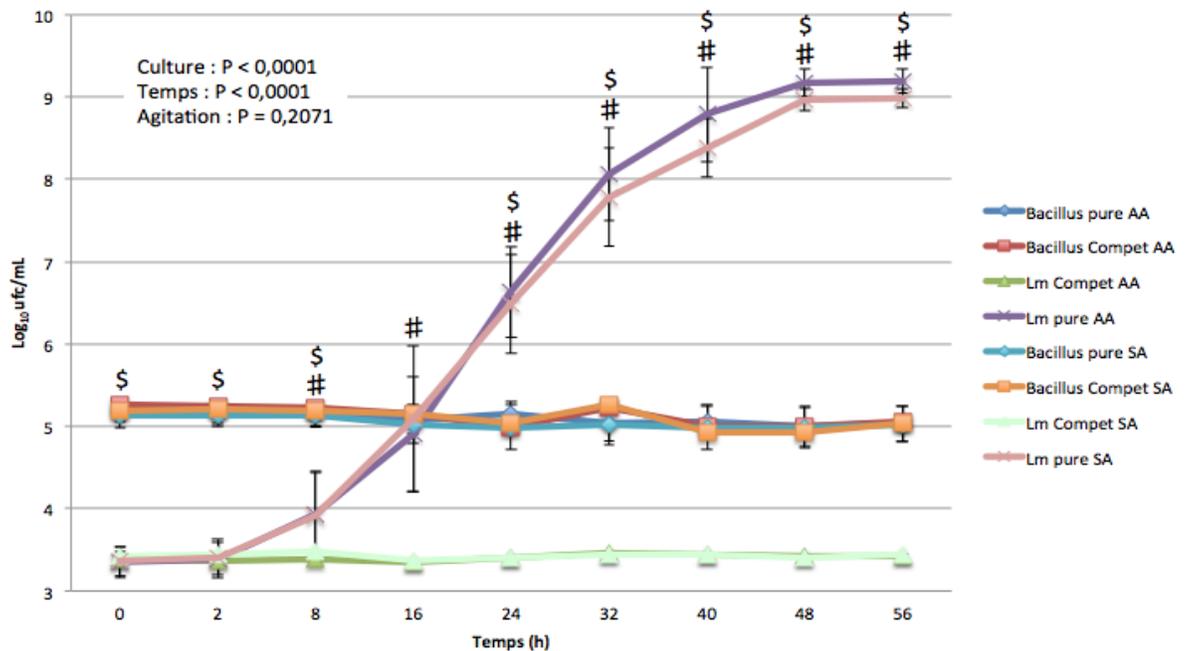


Figure 23 Courbes de croissance à 20°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien spécifique au le cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en

culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

La figure 24 révèle qu'il n'y a aucune évolution du pH pour les courbes de *Bacillus* et pour la compétition. Il n'y a également aucun effet significatif ($P > 0,05$) de l'agitation pour ces deux conditions ce qui suggère que l'activité métabolique des cellules étaient minimales dans ces conditions. Ces résultats sont différents de ceux à 30°C. À cette température plus élevée, on observe une légère diminution du pH du consortium de *Bacillus* (jusqu'à 7,3) et de la compétition (jusqu'à 6,7). Par contre, on remarque une diminution du pH de la culture pure de *Listeria*, ce qui implique une différence avec la culture de *Bacillus* et la compétition à partir de la 32^{ème} heure. On observe également un effet de l'agitation pour *Listeria* avec une différence de pH de 0,5 entre la culture avec et sans agitation. Ces résultats de pH confirment ceux des courbes de croissance : il y a une inhibition de l'activité des *Listeria* en compétition par rapport à ceux en culture pure, sans être dû à l'exclusion compétitive. Pour *Listeria* en culture pure, les résultats observés ici sont similaires aux observations à 30°C.

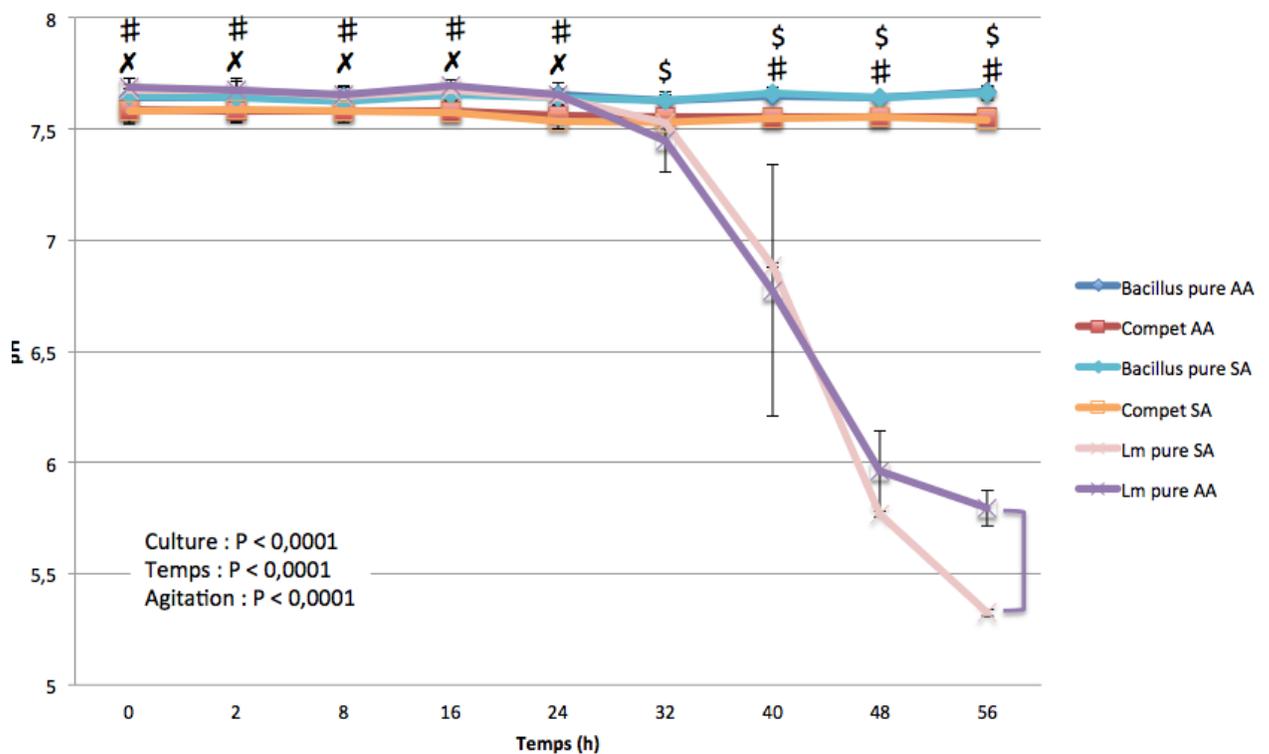


Figure 24 Suivi de l'évolution du pH à 20°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

1.3. Croissance à 10°C

1.3.1. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

À la figure 25 on remarque l'absence de croissance du consortium de *Bacillus* en compétition et en culture pure à 10°C qui restent au niveau de la concentration initiale de $3,1 \pm 0,2$ log ufc/mL. Contrairement à 30°C et 20°C, on n'observe aucune différence significative ($P > 0,05$) entre *Listeria* en culture pure et *Listeria* en compétition à 10°C avec ou sans agitation. Cela signifie bien que l'exclusion compétitive est un échec, et qu'il n'y a pas d'inhibition de *L. monocytogenes* dans cette situation fort possiblement en raison de l'absence de croissance de *Bacillus*. Par contre, et ce pour la première fois dans la compétition Ba3-Lm3, il existe une différence significative ($P < 0,05$) due à l'agitation entre les comptes de *Listeria* aux jours 5, 6 et 7 (barres verte et violette) ce qui prouve que le cocktail de *Listeria* aussi rencontre des difficultés. Le caractère psychrotrophe de *L. monocytogenes* lui confère donc un avantage et lui permet de croître à 10°C contrairement aux souches de *Bacillus* qui sont mésophiles. Il y a un effet de la température entre 30°C, 20°C et 10°C, (figures 9, 17 et 25) et plus la température est basse, moins l'inhibition du cocktail de *Listeria* est important.

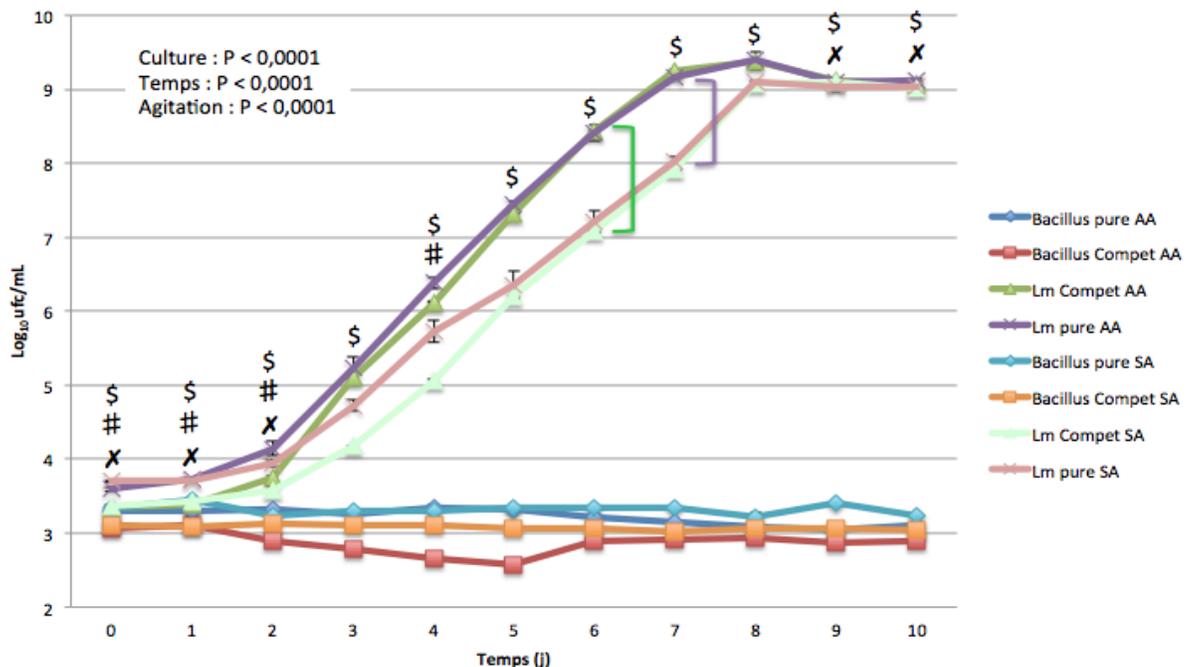


Figure 25 Courbes de croissance à 10°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien

spécifique au cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

Le suivi de pH à la figure 26 révèle, qu'avec ou sans agitation, le pH de la culture reste stable pour le consortium de *Bacillus* avec ou sans agitation alors que pour les cultures en compétition ou de *Listeria* en culture pure le pH diminue significativement ($P < 0,05$). On remarque tout de même l'effet de l'agitation ($P < 0,05$) pour le cocktail de *Listeria* entre la culture pure et la compétition (barres violette et orange). Quelque soit la température, lorsque l'activité métabolique du cocktail de *Listeria* est maximale, les valeurs minimales de pH atteignent 5,7 avec et 5,3 sans agitation.

On observe également en comparant les données de pH de la compétition *Bacillus* à 3 log ufc/mL et *Listeria* à 3 log ufc/mL pour les trois températures (figures 10, 18 et 26) que plus la température baisse, plus le pH de la solution en compétition s'éloigne des valeurs de pH du consortium de *Bacillus* en culture pure pour se rapprocher de celles du cocktail de *Listeria* en culture pure. On remarque donc que plus la température baisse, moins le rôle joué par les *Bacillus* dans les phénomènes d'exclusion est important.

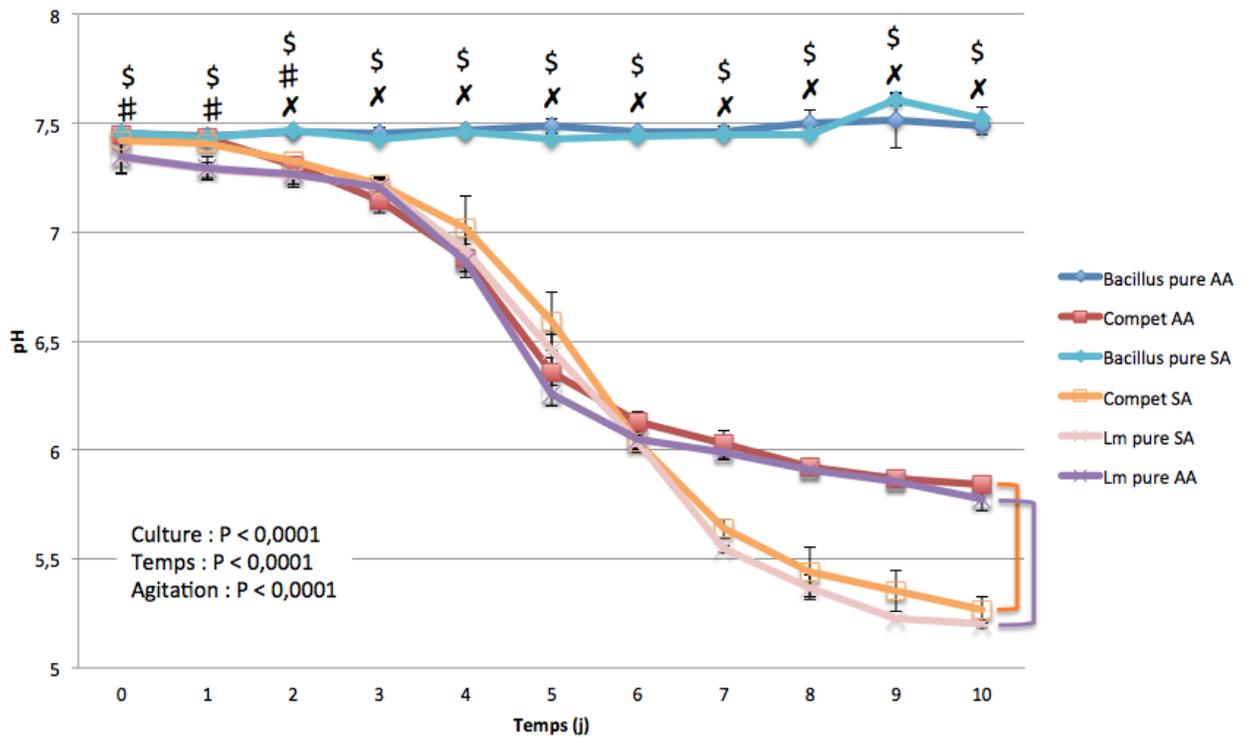


Figure 26 Suivi de l'évolution du pH à 10°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage (P < 0,05).

1.3.2. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

À la figure 27, la diminution des comptes bactériens pour le cocktail de *Listeria* en compétition est évidente et atteint près d'un log, comparativement à la concentration initiale avec et sans agitation de 5 log ufc/ml pour les deux groupes bactériens. Lorsque le consortium de *Bacillus* et le cocktail de *Listeria* sont tous deux à une concentration initiale de 3 Log ufc/ml *Listeria* arrivait à croître, suggérant un effet des constituants de la matrice du produit industriel qui sont plus dilués lorsque le consortium de *Bacillus* est à 3 log ufc/ml. Deuxièmement on remarque également que les dénombrements pour les *Bacillus* en culture pure et en compétition restent stables à $5,3 \pm 0,2$ log ufc/mL, soit la concentration initiale (comme observé à 20°C). Les cultures de *Bacillus*, en culture pure et en compétition, ne sont pas significativement différentes entre elles ($P > 0,05$), mais sont différentes ($P < 0,05$) quant au dénombrement de *Listeria* en culture pure et en compétition en tous temps. Ainsi, les comptes de *Listeria* en cultures pures sont différents ($P < 0,05$) de ceux en compétitions pour chaque temps d'échantillonnage. À 10°C, Les *Listeria* en compétitions (AA et SA) perdent 1 log ufc/mL en 5 jours et n'arrivent pas à croître jusqu'au jour 10 (fin de l'expérimentation). L'inhibition du cocktail de *Listeria* est donc efficace mais n'est fort probablement pas provoquée par exclusion compétitive. Il est probable que la matrice détergente soit responsable de l'efficacité du produit commercial. L'effet combiné de la température et de la présence de la matrice détergente exerce une répression marquée sur les souches de *Listeria*.

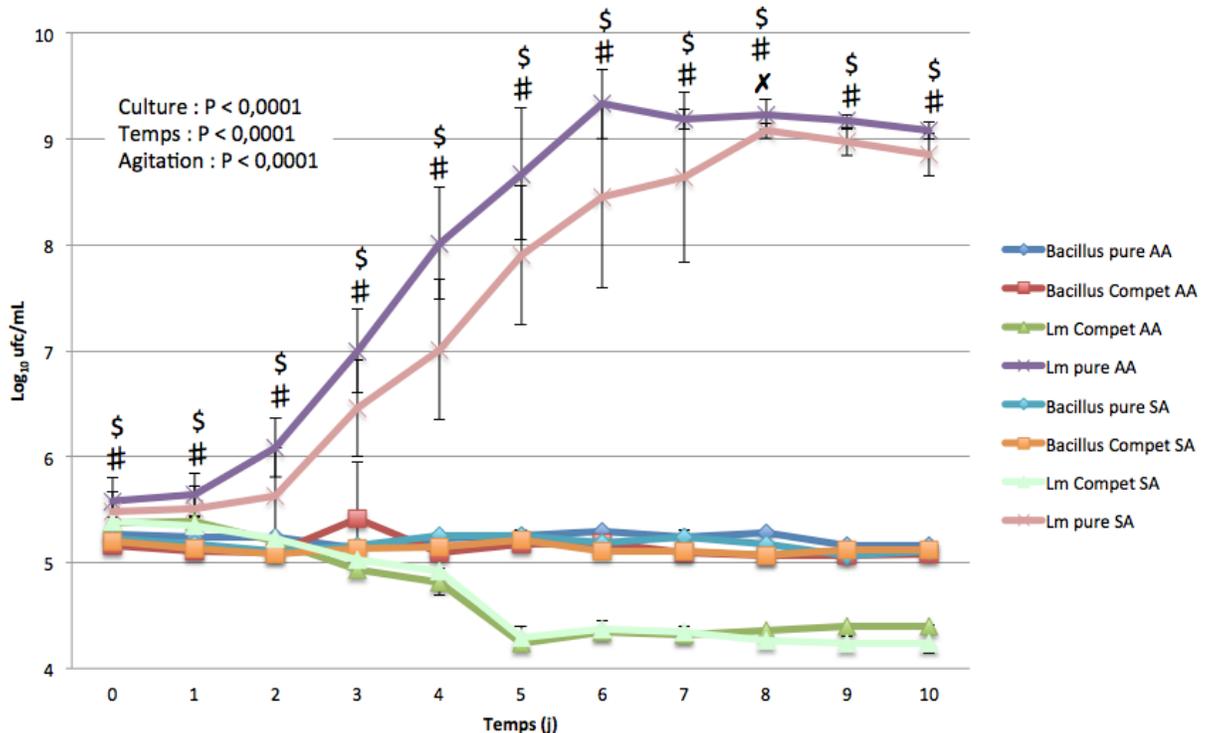


Figure 27 Courbes de croissance à 10°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien spécifique au cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, * = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage (P < 0,05).

En observant la figure 28, on remarque que les valeurs de pH n'évoluent pas dans le temps pour les cultures de *Bacillus* en culture pure et en compétition (P > 0,05). Par contre, à partir de 4 jours d'incubation, les valeurs de pH de *Bacillus* ne sont pas différentes des valeurs de la compétition car elles n'évoluent pas significativement. Par contre, toujours après 4 jours, les valeurs de pH de *Listeria* en culture pure sont significativement différentes de celles de *Bacillus* et de la compétition. Le produit commercial est efficace, mais l'activité métabolique très faible des courbes de *Bacillus* réfute ici l'hypothèse d'une exclusion compétitive. En observant les figures 12, 20 et 28, on remarque que l'activité métabolique de la compétition diminue, ce qui explique l'inhibition des *Listeria*, la matrice semble être responsable, ce qui confirme les observations des courbes de croissances.

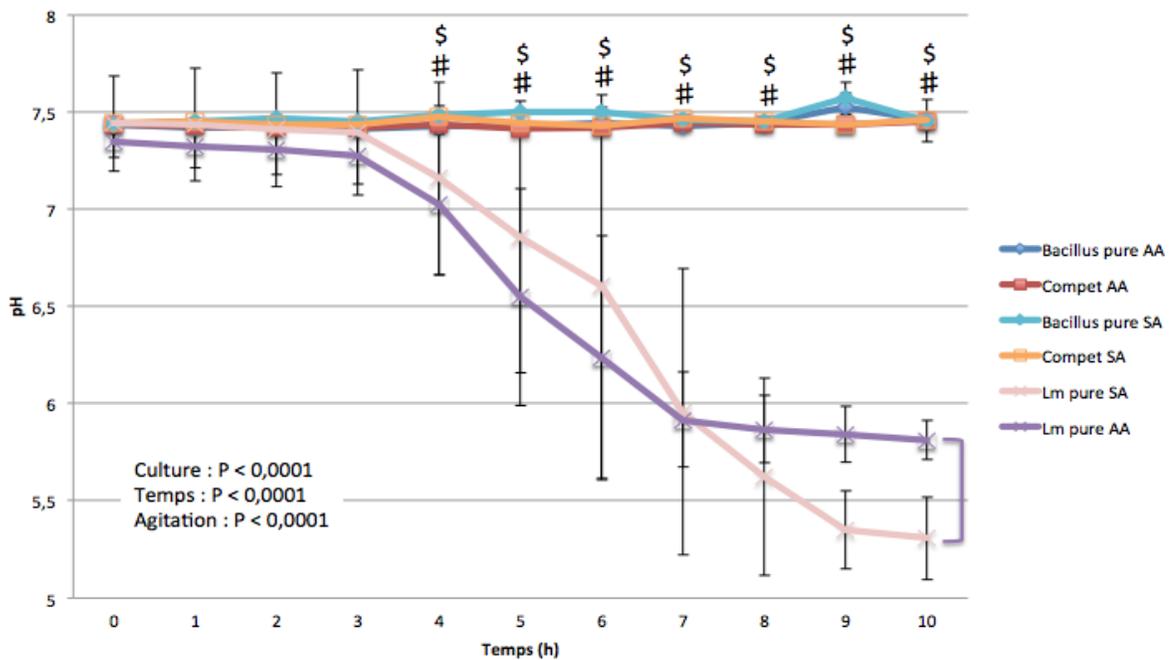


Figure 28 Suivi de l'évolution du pH à 10°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du

cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, χ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

1.3.3. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

La figure 29 confirme à nouveau l'absence de croissance pour les cultures de *Bacillus* à 10°C, comme à la figure 25. Ici encore, la dilution du produit commercial pour obtenir une concentration des *Bacillus* à 3 log ufc/ml permet la croissance des souches de *Listeria* en compétition. Ainsi, on remarque les dénombrements de *Listeria* (culture pure et compétition) sont significativement différentes de celles pour les *Bacillus* (en culture pure et en compétition), comme à 20°C ($P < 0,05$). Il n'y a pas de différence significative de l'agitation entre les comptes de *Listeria* avec et sans agitation en culture pure et *Listeria* avec et sans agitation en compétition ($P > 0,05$). On remarque cependant une différence significative entre les valeurs de *Listeria* en compétition et en culture pure à 1, 2 et 3 jours d'étude : il pourrait s'agir d'erreur de manipulation. On n'observe à partir de la figure 29 aucune inhibition du cocktail de *Listeria* en compétition. Il n'y a pas d'exclusion compétitive ni d'interaction antimicrobienne entre *Bacillus* et *Listeria* car aucune croissance de *Bacillus* n'est observée. De plus, on peut en conclure qu'il n'y a pas d'effet de matrice détergente. Or, on suppose que la matrice peut avoir un effet lorsque le produit est dilué pour arriver à une concentration finale du consortium de *Bacillus* à 5 log ufc/mL. Ici nous sommes à 3 log ufc/mL, il se peut donc que le produit ait été trop dilué pour que la matrice ait un effet sur *Listeria*, cette question est étudiée au point 3. La phase de latence de *Listeria* est de 1 journée à 10°C, alors qu'elle n'est que de 2 heures à 30°C et à 20°C. Cette observation est vraie pour l'ensemble des compétitions à l'étude. La température a donc bien un effet sur la croissance ($P < 0,05$).

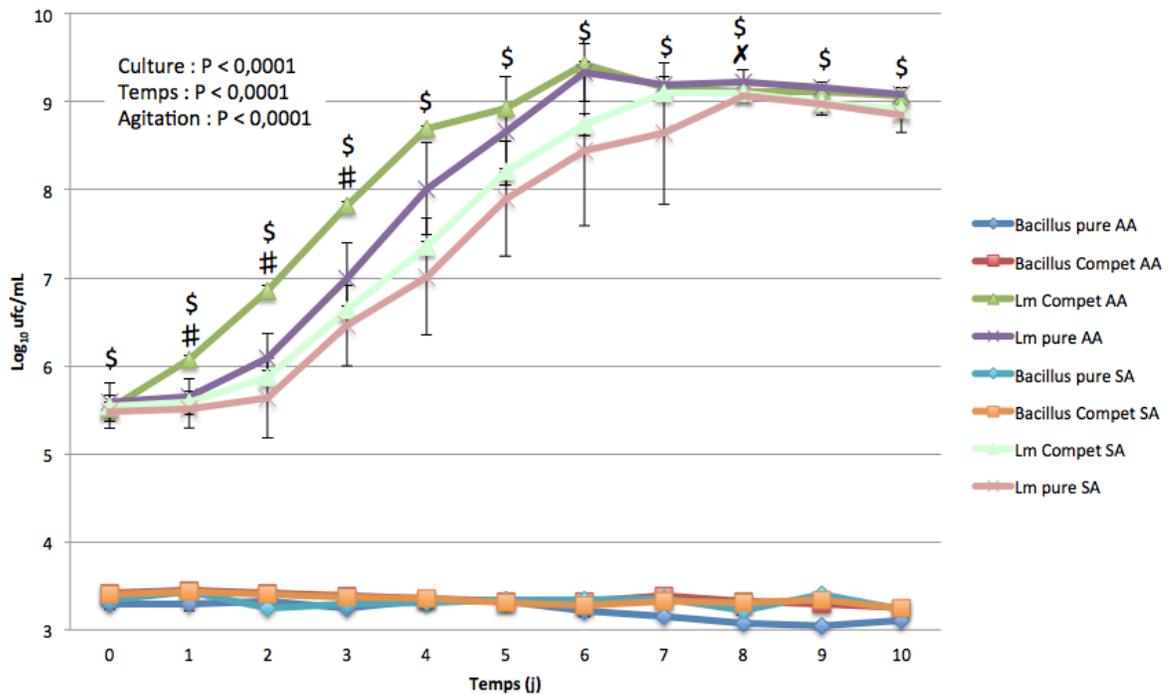


Figure 29 Courbes de croissance à 10°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compét = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compét = compte bactérien spécifique au cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

Les valeurs de pH pour les différentes cultures à 10°C lorsque le consortium de *Bacillus* est à 3 Log ufc/mL et le cocktail de *Listeria* à 5 Log ufc/mL sont présentées à la figure 30, les valeurs de pH à 20°C sont présentées figure 22 et celles de 30°C à la figure 14. L'absence de variations du pH pour les cultures pures de *Bacillus* avec ou sans agitation confirme l'absence de croissance et d'activité métabolique à 10°C pour ces cultures. De fait, à ces concentrations cellulaires, seul le pH à 30°C a diminué dans le temps pour les cultures pures de *Bacillus* avec et sans agitation. Tout comme à 20°C, les valeurs de pH des cultures en compétition et en culture pure pour *Listeria*, avec ou sans agitation, diminuent significativement dans le temps. À 10°C, on observe un effet significatif de l'agitation pour les cultures en compétition ($P < 0,05$; barre violette) et les cultures pures de *Listeria* ($P < 0,05$; barre orange). La différence de pH entre *Listeria* avec et sans agitation est de 0,5 (identique à 20°C), alors qu'elle atteint 1,1 entre les pH de la compétition avec et sans agitation pour les cultures en compétition (cette différence est de 0,5 à 20°C).

Comme pour la compétition consortium de *Bacillus* à 3 log ufc/mL et cocktail de *Listeria* à 3 log ufc/mL à 10°C, la température diminue l'efficacité de l'exclusion compétitive en diminuant l'activité métabolique du consortium de *Bacillus* causé probablement par l'absence de germination des cultures de *Bacillus* devenant donc des cultures inactives. A l'inverse du phénomène recherché, il se pourrait que le cocktail de *Listeria* exerce une exclusion compétitive sur le consortium de *Bacillus*.

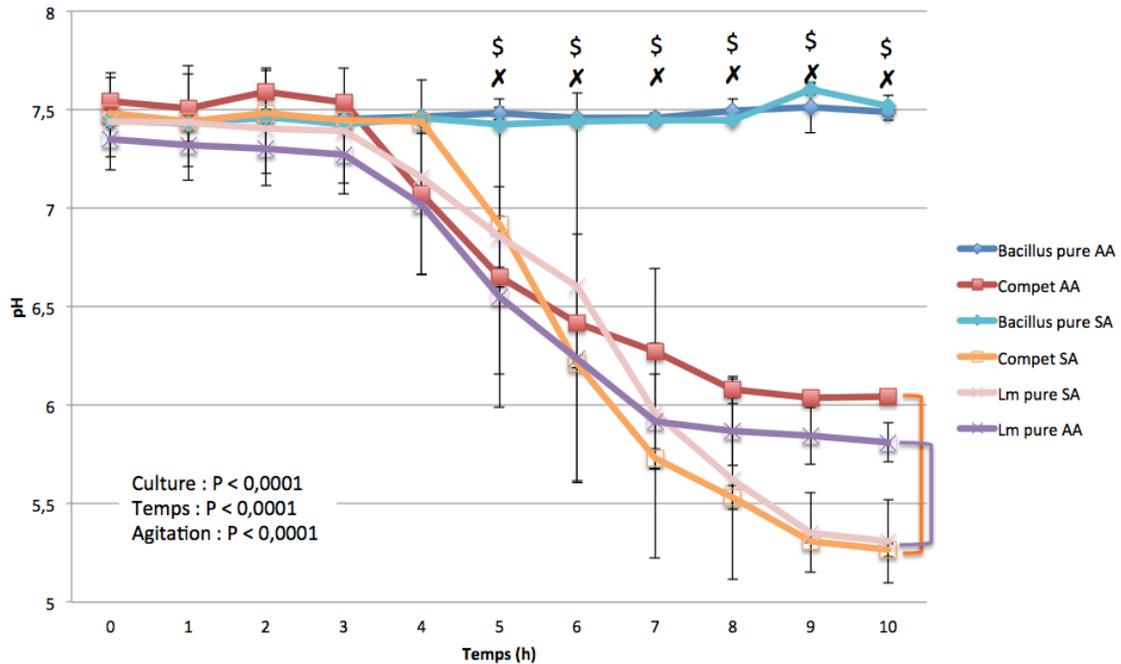


Figure 30 Suivi de l'évolution du pH à 10°C du consortium de *Bacillus* initialement à 3 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$)

1.3.4. Évolution de la croissance en compétition du consortium de *Bacillus* à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Lorsque le produit commercial est dilué afin que le consortium de *Bacillus* soit à une concentration initiale de 5 log ufc/mL et 100 fois supérieure à celle du cocktail de *Listeria* (3 log ufc/mL) l'effet sur les comptes de *Listeria* en compétition est drastique malgré l'absence de croissance des *Bacillus* (figure 31). En compétition, les dénombrements des *Listeria* diminuent sous le seuil de détection (soit 1,7 log ufc/mL) après 4 et 5 jours d'incubation à 10°C avec et sans agitation, respectivement. La procédure d'enrichissement effectuée au jour 10 se révèle toutefois positive pour la présence de *Listeria*. La figure 31 révèle également une différence significative ($P < 0,05$) pour les *Listeria* en culture pure et en compétition, et ce dès le premier jour de l'étude.

Il n'existe pas de différence entre les dénombrements de *Bacillus* en culture pure et en compétition. Aux mêmes concentrations, il n'y a pas de croissance à 20°C, mais les dénombrements de *Bacillus* en culture pure

ou en compétition gagne de 2-3 log ufc/mL à 30°C. Lorsqu'elle baisse, la température inhibe donc la croissance de *Bacillus*. On en retient que l'inhibition de *Listeria* est maximale dans les conditions du consortium de *Bacillus* est de 5 log ufc/mL et le cocktail de *Listeria* est de 3 log ufc/mL à 10°C. Par contre cette inhibition n'est pas causée par l'exclusion compétitive, en raison de l'absence de croissance du consortium de *Bacillus*. C'est possiblement la matrice détergente qui provoque la décroissance du microorganisme pathogène, donc les composants sont plus efficaces car *L. monocytogenes* doit y être plus sensible à 10°C. Ce phénomène est identique et plus marqué que pour la compétition lorsque le consortium de *Bacillus* est de 5 log ufc/mL et le cocktail de *Listeria* également de 5 log ufc/mL à 10°C.

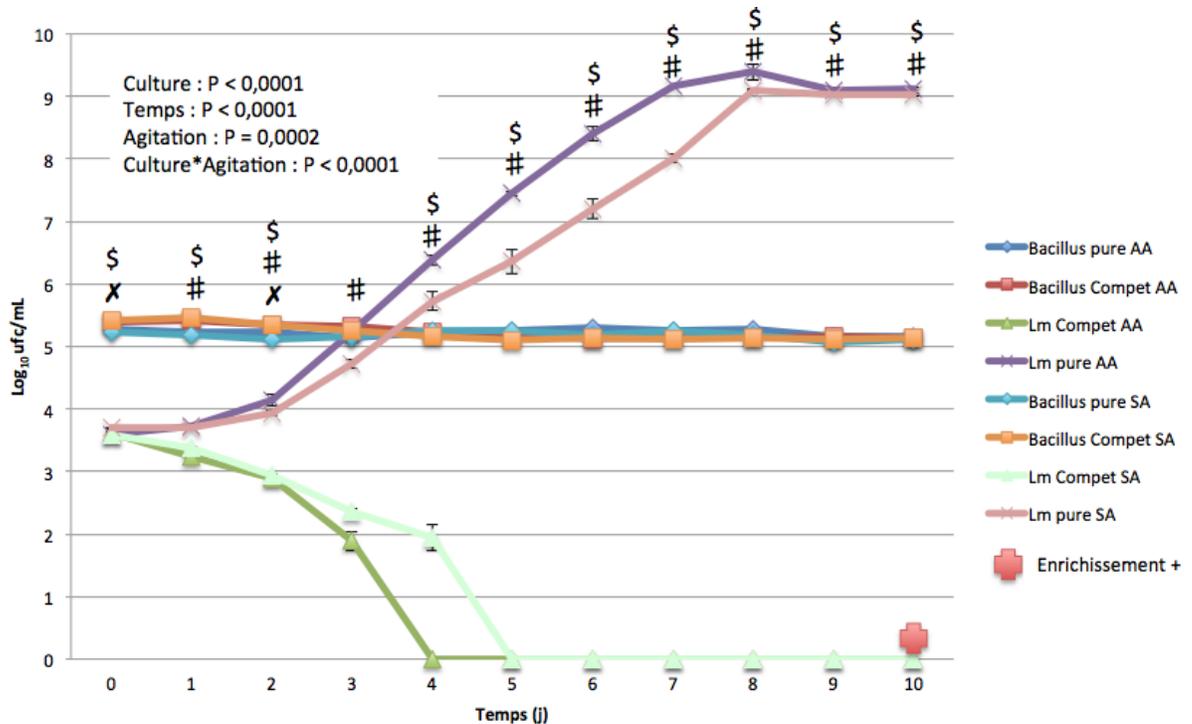


Figure 31 Courbes de croissance à 10°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = compte bactérien du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = compte bactérien du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, Lm Compet = compte bactérien spécifique au le cocktail de *L. monocytogenes* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, SA = sans agitation, X = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$), et Enrichissement + = présence de *L. monocytogenes* après enrichissement des échantillons (Lm Compet AA et Lm Compet SA) après 10 jours de croissance.

La figure 32 présente le pH des cultures incubées à 10°C lorsque le consortium de *Bacillus* est à une concentration initiale de 5 log ufc/mL et le cocktail de *Listeria* à 3 log ufc/mL. Seul le pH des cultures pures de

Listeria avec et sans agitation diminue dans le temps en accord avec l'absence de croissance observée à la figure 30. Ces profils de pH sont similaires à ceux observés à 20°C aux mêmes concentrations. En effet, il n'existe pas de différences significatives ($P > 0,05$) entre les courbes de *Bacillus* en culture pure et celles de la compétition car les valeurs de pH restent identiques à la valeur initiale, soit $7,5 \pm 0,2$. On observe, comme à 20°C et 30°C un effet significatif de l'agitation, ici à partir du 7^{ème} jour de culture pour les cultures pures de *Listeria* (barre violette). Les valeurs de pH finales pour les *Listeria* en cultures pures, avec ou sans agitation sont toutes inférieures à 6 peu importe la température indiquant que la croissance de *Listeria* ait ralenti sans toutefois être supprimée aux températures testées. Le manque d'activité métabolique suggère que l'exclusion compétitive n'est pas la cause de la décroissance des *Listeria* et que l'agitation modifie l'état physiologique des bactéries du cocktail de *L. monocytogenes*.

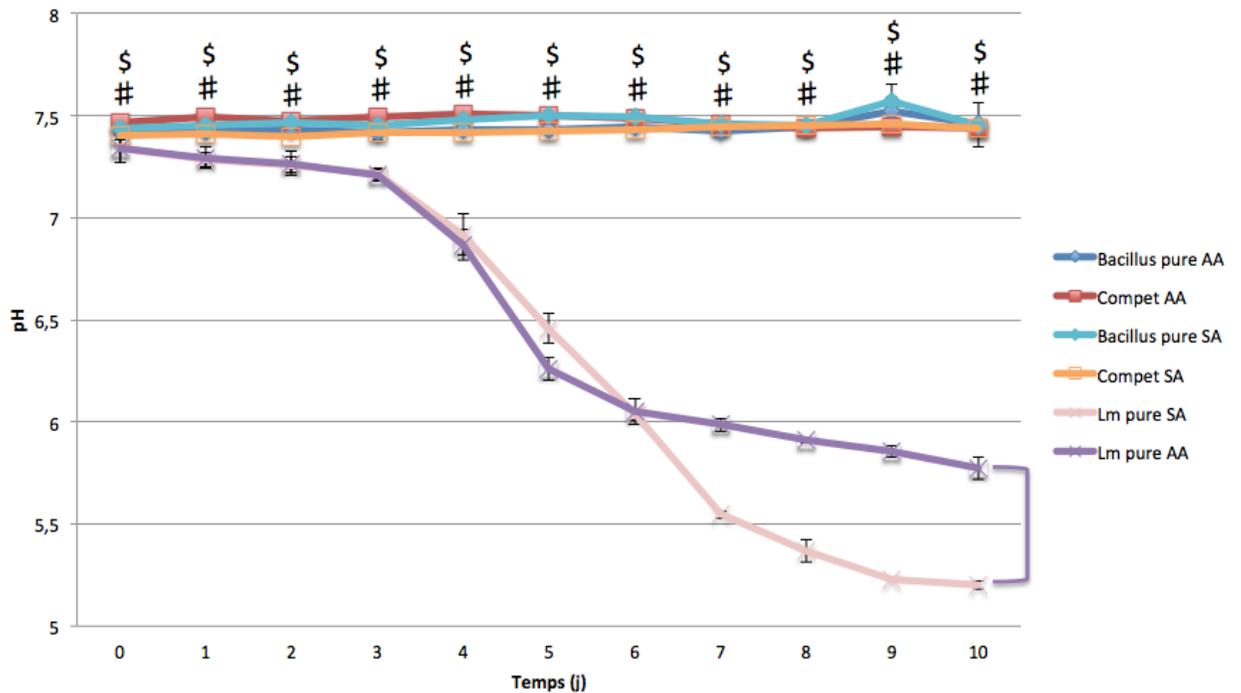


Figure 32 Suivi de l'évolution du pH à 10°C du consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 3 log ufc/mL

Avec *Bacillus* pure = valeurs de pH du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en culture pure, Compet = valeur de pH de la compétition du consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) et du cocktail de *L. monocytogenes*, Lm pure = valeurs de pH du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure, AA = avec agitation, SA = sans agitation, χ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, # = différence significative entre les valeurs du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure et en compétition au même temps d'échantillonnage, et \$ = différence significative entre les valeurs du consortium de *Bacillus* en culture pure et ceux du cocktail de *L. monocytogenes* en culture pure au même temps d'échantillonnage ($P < 0,05$).

2. Taux de croissance

Le tableau 7, ci-dessus est une synthèse de l'ensemble des taux de croissance des courbes cellulaires apparaissant dans les figures 9 à 32. Il permet d'illustrer les conclusions proposées dans le point 1 traitant des courbes de croissances. En observant les taux de croissance des bactéries en culture pure, on remarque que ceux de *Bacillus* (Ba3) sont respectivement de $41,6 \pm 6,5 \text{ m}^{-1}$ (avec agitation; AA) et de $58,3 \pm 3,6 \text{ m}^{-1}$ (sans agitation; SA) à 30°C, de $173,5 \pm 20,6 \text{ m}^{-1}$ (AA) et de $203 \pm 2,6 \text{ m}^{-1}$ (SA) à 20°C et qu'à 10°C, l'absence de croissance ne permet pas de calculer ce taux. On en conclut que la température a un effet significatif sur les taux de croissance de *Bacillus* (Ba3) en culture pure ($P < 0,05$). Ce phénomène est identique pour le cocktail de *Listeria* en culture pure lorsque celui-ci est à une concentration initiale de 3 ufc/mL et de 5 log ufc/mL.

Tableau 7 Taux de croissance à 30, 20 et 10°C du consortium de *Bacillus* et du cocktail de *Listeria* en culture pure et en compétition

Concentration initiale (log ufc/mL)		Taux de croissance (min)					
		30°C		20°C		10°C	
En culture pure		AA	SA	AA	SA	AA	SA
3	<i>Bacillus</i> (Ba3)	41,6 ± 6,5	58,3 ± 3,6	173,5 ± 20,6	203 ± 2,6	AC	AC
	<i>Listeria</i> (Lm3)	40,1 ± 3,4	38,6 ± 0,6	118,5 ± 15,9	117,1 ± 10,1	436,1 ± 65,3	527,6 ± 24,1
5	<i>Bacillus</i>	59,1 ± 0,9	57,6 ± 2,8	AC	AC	AC	AC
	<i>Listeria</i>	52,4 ± 2,4	55,9 ± 1,6	132,4 ± 20,1	111 ± 28,7	461,4 ± 72,7	581,4 ± 53,5
En compétition <i>Bacillus</i> - <i>Listeria</i>							
3 - 3	<i>Bacillus</i>	43 ± 5,9	57,4 ± 1,5	169,3 ± 7,1	216,7 ± 9,3	AC	AC
	<i>Listeria</i> (Ba3-Lm3)	IN	IN	115,3 ± 17,6	154,6 ± 30,7	374,7 ± 2,9	448,8 ± 11,3
5 - 5	<i>Bacillus</i>	53,4 ± 1,5	77,6 ± 18,7	AC	AC	AC	AC
	<i>Listeria</i>	99,1 ± 15,1	102,4 ± 2,1	AC	AC	DE	DE
3 - 5	<i>Bacillus</i>	51,5 ± 3,5	61,9 ± 0,2	22,7 ± 81,1	353,2 ± 10,5	AC	AC
	<i>Listeria</i>	IN	IN	135,1 ± 30,5	137,9 ± 48,2	470,8 ± 23,3	615,3 ± 83,6
5 - 3	<i>Bacillus</i>	65,8 ± 1,8	88,3 ± 2,8	AC	AC	AC	AC
	<i>Listeria</i>	112,7 ± 2,1	95 ± 2,8	AC	AC	DE	DE

Avec *Bacillus* = consortium de *Bacillus* (avec matrice), *Listeria* = cocktail de *L. monocytogenes*, AA = avec agitation, SA = sans agitation, AC = absence de croissance cellulaire, IN = inhibition du cocktail de *Listeria* en compétition (AA et SA) par rapport aux cultures pures, et DE = décroissance cellulaire et $41,6 \pm 6,5$ = Moyenne ± Ecart type standard.

Toujours en culture pure, on observe une différence ($P < 0,05$) entre les taux de croissance à 30°C du cocktail de *Listeria* lorsque la concentration initiale est de 3 log ufc/mL et lorsque la concentration est de 5 log ufc/mL, soit respectivement de $40,1 \pm 3,4 \text{ m}^{-1}$ (AA) et de $38,6 \pm 0,6 \text{ m}^{-1}$ (SA) à 30°C, de $52,4 \pm 2,4 \text{ m}^{-1}$ (AA) et de $55,9 \pm 1,6 \text{ m}^{-1}$ (SA). Cette différence peut certainement être causée par la concentration de l'inoculum initial et peut résulter d'un effet de communication cellulaire et plus spécifiquement d'un effet de quorum sensing.

L'absence de croissance (AC) de *Bacillus* (Ba3) en culture pure à 10°C semble être provoquée par une température trop basse, alors que en ce qui concerne l'AC de *Bacillus* (Ba5) en culture pure à 20°C, cette inhibition peut provenir de l'effet de la matrice détergente. *Bacillus* (Ba5) en culture pure à 10°C ne croît pas car il est possible qu'une synergie en l'effet matrice et une température trop basse en soit la cause. Ceci n'est pas le cas pour *Listeria*, la matrice détergente n'étant pas présente en culture pure, seule la température a un effet sur le taux de croissance des souches ($P < 0,05$).

En considérant la compétition Ba3-Lm3 à 30°C, on remarque que le cocktail de *Listeria* est inhibé (IN), quelque soit l'agitation. Or à 20°C, les *Listeria* ont un taux de croissance de $115,3 \pm 17,6 \text{ m}^{-1}$ (AA) et de $154,6 \pm 30,7 \text{ m}^{-1}$ (SA) et se rapproche des valeurs de *Bacillus*, soit respectivement de $169,3 \pm 7,1 \text{ m}^{-1}$ (AA) et de $216,7 \pm 9,3 \text{ m}^{-1}$ (SA) mais sans atteindre les comptes observés en culture pure. À 32h toutefois, les dénombrements de *Listeria* en compétition et sous agitation chutent pour revenir à un niveau équivalent à la concentration initiale. Enfin à 10°C, le taux de croissance des *Listeria* est plus faible qu'à 20°C, respectivement de $374,7 \pm 2,9 \text{ m}^{-1}$ (AA) et de $448,8 \pm 11,3 \text{ m}^{-1}$ (SA) mais celui de *Bacillus* est nul par absence de croissance; causée probablement, comme en culture pure, par une température trop froide pour permettre la germination des spores. Le caractère psychrotrophe de *L. monocytogenes* lui permet de mieux dominer en phase exponentielle de croissance.

En observant cette fois-ci la compétition Ba5-Lm5, on remarque que le modèle d'évolution en fonction de la température est différent car le consortium de *Bacillus* et le cocktail de *Listeria* ne sont capables de se développer qu'à 30°C, avec toutefois un retard de croissance important pour les *Bacillus* de 12 heures. De plus, on remarque que les taux de croissance (min) en compétition sont bien plus longs à ceux en culture pure ce qui est pas normal. À 30°C, pour le cocktail de *Listeria*, les taux de croissance sont respectivement de $99,1 \pm 15,1 \text{ m}^{-1}$ (AA) et de $102,4 \pm 2,1 \text{ m}^{-1}$ (SA) en compétition alors qu'ils sont de $52,4 \pm 2,4 \text{ m}^{-1}$ (AA) et de $55,9 \pm 1,6 \text{ m}^{-1}$ (SA) en culture pure. En plus de l'effet probable de la température, il est plausible que la matrice détergente rende toute croissance difficile (figures 19 et 27) ou du moins retardée pour générer une phase de latence plus ou moins long en fonction de l'organisme (figure 11).

A chaque température, le modèle des taux de croissance de Ba3-Lm5 suit celui de Ba3-Lm3. De même, le modèle de Ba5-Lm5 suit celui de Ba5-Lm3. Cela peut être expliqué par la différence entre le couple (Ba3-Lm5/ Ba3-Lm3) et le couple (Ba5-Lm5/ Ba5-Lm3) de la présence de la matrice détergente qui à partir de 20°C empêche toute croissance (figures 19 et 23). Cette matrice va même jusqu'à inhiber la croissance de *Listeria* (décroissance cellulaire : DE) à 10°C dans les conditions Ba5-Lm5 et Ba5-Lm3 (figures 27 et 31).

2. Interactions microbiennes

2.1. Les interactions *Bacillus/Listeria*

Afin de déterminer si les inhibitions de croissance observées pourraient être associées à la production de substances inhibitrices sécrétées dans le milieu, comme des bactériocines par exemple, un test d'inhibition par diffusion a été utilisé. Les résultats des interactions/inhibitions entre les différentes souches de *Bacillus* et de *Listeria* sont présentés dans le tableau 8. On peut remarquer qu'aucune souche de *Listeria* n'est capable d'inhiber la croissance d'aucune souche de *Bacillus sp.* constituant le consortium, et qu'il n'existe aucune interaction négative des souches de *Listeria* entre elles, que ce soit de l'espèce *innocua* ou *monocytogenes*. Par contre, on remarque que non seulement certaines souches de *Bacillus* sont capables d'inhiber certaines souches de *Listeria*, mais elles sont également capables de s'inhiber entre-elles suggérant que la constitution du consortium mériterait d'être revue. Par exemple on remarque que B1 (*Bacillus licheniformis*) et B6 (*B. subtilis*) sont aptes à concurrencer les autres souches de *Bacillus*, en plus d'inhiber la croissance de certaines souches de *Listeria*, comme L13 et L14, qui sont des *L. monocytogenes* et donc des bactéries pathogènes. Ce sont les souches B1Co (*Bacillus pumillis*) et B6 qui possèdent le plus gros potentiel d'inhibition contre les *Listeria* avec des zones d'inhibition supérieures à 20 mm dans certains cas comme présenté à la figure 33 ci-dessous. Le *Bacillus* B6 est également capable d'exercer une pression importante sur un autre *Bacillus* (B1Co), en révélant une zone d'inhibition de 18 mm.

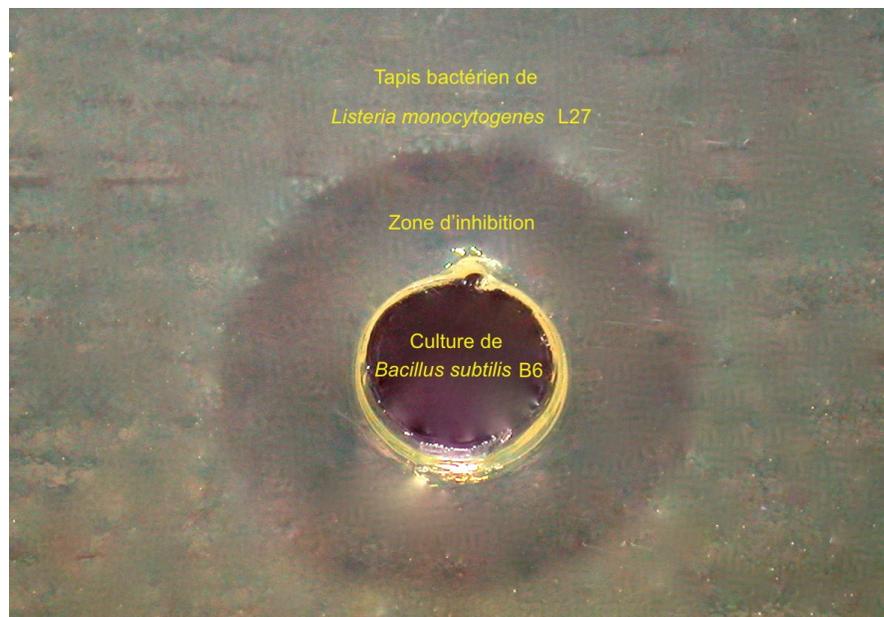


Figure 33 Zone d'inhibition d'une culture de *Bacillus subtilis* (B6) sur *Listeria monocytogenes* (L27).

On peut donc affirmer que les souches de *Bacillus subtilis* sont capables d'inhiber la croissance de certains *Listeria*, (comme certaines souches de *L. monocytogenes*). Les souches de *B. pumillus* (B1Co), et de *B. licheniformis* (B1) ont également cette capacité, mais avec moins d'efficacité. Les souches B1 Ci, B3 et B6 contenues dans le produit commercial sont donc les meilleurs inhibiteurs des *L. monocytogenes*. Par contre, pour une action contre *L. monocytogenes*, les souches 2 et 5 ont moins d'intérêt du point de vue de leur capacité à sécréter des substances inhibitrices.

Tableau 8 Interactions entre *Bacillus/Listeria*

Souches dans puits (productrices)	Souches sur tapis bactérien (sensibles)																	
	B1	B1Co	B1Cl	B2	B3	B5	B6	<i>L. innocua</i>	L8a	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L22	L26	L27
B1	NA	-	-	9,3	7,1	10,0	9,2	10,7	-	15,2	-	-	-	12,2	13,1	-	-	-
B1Co	-	NA	-	-	-	-	-	19,2	13,2	13,1	16,1	16,2	13,0	14,3	14,0	13,1	19,2	20,0
B1Cl	12,2	-	NA	-	-	-	-	13,2	15,0	16,2	18,1	12,0	15,1	16,2	16,0	15,0	-	17,1
B2	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	14,0	-	-	NA	-	-	8,6	12,1	13,1	16,1	13,1	14,1	11,1	13,0	12,3	12,3	15,8
B5	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	12,2	18,1	8,1	-	-	-	NA	21,0	21,0	16,2	20,0	16,1	15,2	16,1	15,0	17,0	17,0	17,2
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L8a	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-
L10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-
L11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-
L12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-
L13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-
L14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-
L22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-
L26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-
L27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA

Les zones d'inhibition sont en mm. NA : Non applicable. - : Pas de zone d'inhibition.

2.2. Effet de la filtration, centrifugation, neutralisation et de la protéinase

Sans avoir la prétention d'avoir caractérisé complètement la nature des inhibitions observées au tableau 7, certaines analyses nous permettent de démontrer que la baisse du pH ne serait pas le seul élément à considérer pour expliquer l'inhibition observée (tableau 9). En neutralisant la culture de B1 (pH = 7,0), on observe tout de même des zones d'inhibition contre les deux souches de *L. monocytogenes* équivalentes à celles observées avant neutralisation, soit respectivement de 12,2 mm contre 12,1 mm dans le cas de l'étude avec L14.

On observe également que la solution non filtrée de B1 (B1-SNF) ne parvient pas à inhiber la croissance de B2, B3, B5 et B6 contrairement à ce qui a été observé au tableau 9 avec la culture fraîche, alors que ce même échantillon (B1-SNF), arrive à inhiber L12 et L14 avec respectivement une zone d'inhibition de 10,5 et 12,1 mm. Comme B1 est capable d'inhiber L12 et L14 dans le tableau 9 (ligne cellulaire ϕ), et qu'on remarque que dans le tableau 8, les souches de *Bacillus* sont plus résistantes que celles de *Listeria*, les zones d'inhibition étant respectivement de 7,1 mm (B3) et de 13,1 mm (L14), on en conclut que l'effet inhibiteur du culot (soit échantillon centrifugé) est plus important que celui de la solution cellulaire n'ayant subi aucun traitement (ϕ).

Tableau 9 Effet de différents traitements de centrifugation, neutralisation et filtration sur l'inhibition des souches.

Souches dans le puits	Traitement	Souches sur tapis bactérien					
		B2	B3	B5	B6	L12	L14
B1	SNF	-	-	-	-	10,5	12,1
	SF	-	-	-	-	-	-
	SNFN	-	-	-	-	11,1	12,2
	SFN	-	-	-	-	-	-
	ϕ	9,3*	7,1*	10,0*	9,2*	11,2*	11,2*
	C	10,2	9,5	13,1	11,2	12,0	13,2
B6	SNF	NE	NE	NE	NE	9,5	7,2
	SF	NE	NE	NE	NE	-	-
	SNFN	NE	NE	NE	NE	10,3	8,1
	SFN	NE	NE	NE	NE	-	-
	ϕ	NE	NE	NE	NE	10,8*	11,2*
	C	NE	NE	NE	NE	11,1	12,2

SNF : Solution non filtré ; SF : Surnageant filtré ; SNFN : Solution non filtré et neutralisé ; SFN : Surnageant filtré et neutralisé ; ϕ : culture cellulaire non modifiée ; C : culot. * : Effet protéinase K ; NE : Non évalué ; - : Pas de zone d'inhibition.

Par ailleurs, on remarque à la figure 34 que, lorsqu'on ajoute les 5 μL de protéinase K prêt du puits, la zone d'inhibition est inexistante du côté de cet ajout alors qu'elle est présente de l'autre côté où la protéinase K n'a pas été ajoutée. Ceci confirme la nature protéique de la substance inhibitrice produite par *B. licheniformis* (B1). Ce constat est également vrai pour *B. subtilis* (B6), contenu dans le produit commercial (* = effet protéinase, tableau 9).

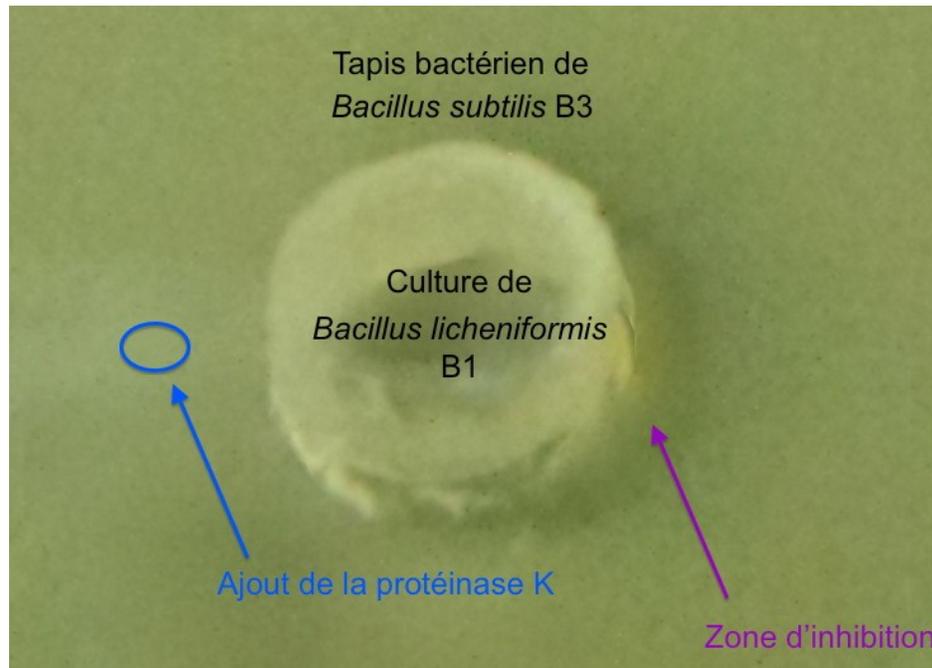


Figure 34 Photographie du puits rempli par *Bacillus licheniformis* (B1) et de son interaction sur le tapis bactérien de *Bacillus subtilis* (B3). On rajoute de la protéinase K sur le côté gauche du puits.

3. Effet de la matrice détergente

3.1. Résistance à la matrice détergente

L'action inhibitrice de la matrice détergente uniquement sur les souches de *L. monocytogenes* constituant le cocktail est présentée au tableau 10. On remarque que à 30°C, seule la matrice non-diluée à un effet inhibiteur sur les 5 souches, et que leur zone d'inhibition varie peu (de 24,1 à 25,1 mm). Sachant que le produit commercial montre une concentration en consortium de *Bacillus* de $2,4 \cdot 10^7$ ufc/mL, il est dilué 100 fois pour atteindre la concentration de 5 log ufc/mL et 10 000 fois pour atteindre 3 log ufc/mL, ces résultats suggèrent que la matrice ne peut avoir qu'un effet limité sur les inhibitions observées à 30°C.

En observant ce même tableau présentant les zones d'inhibition de la matrice détergente sur les différentes souches de *L. monocytogenes* à 20°C, on observe une zone d'inhibition avec un facteur de dilution de 10 fois (7,82 à 11,67 mm) et que d'autre part, la zone d'inhibition du produit non-dilué est plus importante à 20°C qu'à 30°C (32,02 versus 24,1 pour la souche 11 par exemple). L'effet matrice est donc plus important à 20°C qu'à 30°C. Il est donc envisageable que, à une concentration de 5 log ufc/mL (correspondant à une dilution à 100 fois), même sans être observable à l'œil nu (zone d'inhibition), cette matrice puisse inhiber la croissance de *L. monocytogenes*, sans être létale et expliquer l'absence de croissance et l'inhibition des cultures bactériennes obtenus pour les compétitions *Ba5-Lm5* et *Ba5-Lm3* à 20°C (figures 27 et 31).

Dans le cas de l'étude à 10°C, on voit que la matrice détergente provoque une zone d'inhibition lorsque le produit est non-dilué et lorsqu'il est dilué dix fois. Comme dans le cas précédent, on remarque que les zones d'inhibition sont plus grandes à 10°C qu'à 20°C (24,15 mm à 10°C contre 11,67 mm à 20°C pour la souche 11 à la dilution 10 fois du produit commercial). Comme à 20°C, à 10°C, la matrice détergente peut inhiber à 100 fois, comme les valeurs de la zones d'inhibition à 10°C sont plus importantes qu'à 20°C, on peut expliquer la décroissance du cocktail de *L. monocytogenes* dans les compétitions *Ba5-Lm5* et *Ba5-Lm3* à 10°C (figures 27 et 31).

D'après les résultats du tableau 10, la matrice détergente ne pourrait pas inhiber la croissance bactérienne en compétitions lorsque la concentration du consortium est initialement de 3 log ufc/mL. En effet, une telle concentration implique une dilution de la matrice de 10 000 fois, ce qui plutôt important pour que les composés actifs restant puissent avoir un effet sur les compétitions *Ba3-Lm3* ou *Ba3-Lm5* quelque soit la température ou l'agitation du milieu.

Tableau 10 Zone d'inhibition (mm) de la matrice détergente sur les souches du cocktail de *Listeria monocytogenes*

Température (°C)	Facteur de dilution du produit commercial	Zone d'inhibition (mm)				
		Souche de <i>Listeria monocytogenes</i>				
		11	12	13	14	22
30	0 X	24,1	21,6	21,1	21,1	25,1
	10 X	0	0	0	0	0
	100 X	0	0	0	0	0
	1000 X	0	0	0	0	0
	10 000 X	0	0	0	0	0
20	0 X	32,0	31,1	29,6	28,7	30,2
	10 X	11,7	9,7	8,6	8,1	7,8
	100 X	0	0	0	0	0
	1000 X	0	0	0	0	0
	10 000 X	0	0	0	0	0
10	0 X	50,2	48,6	46,7	49,1	41,6
	10 X	24,2	22,2	21,1	23,2	19,7
	100 X	0	0	0	0	0
	1000 X	0	0	0	0	0
	10 000 X	0	0	0	0	0

3.2. Persistance de la matrice détergente

En continuant le dénombrement des bactéries en compétition au-delà de 56 heures d'étude (prolongement de la figure 19), on remarque qu'il y a apparition d'une croissance après 96 heures pour le cocktail *Listeria* et après 120 heures pour le consortium de *Bacillus* suite à une dégradation potentielle des ingrédients actifs de la matrice détergente dans le temps et également possiblement de l'acquisition par le consortium de *Bacillus* d'une résistance à la matrice détergente au cours du temps. C'est donc que la matrice détergente a le pouvoir d'inhiber la croissance des deux types de bactéries, elle a donc un effet bactériostatique et agit jusqu'à dénaturation.

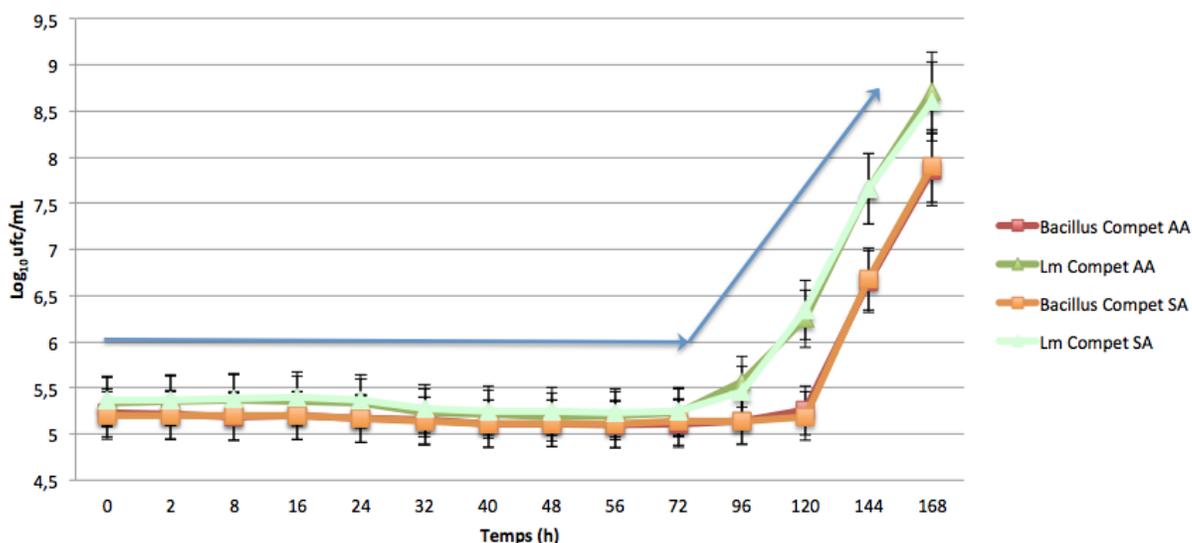


Figure 35 Persistance de la matrice détergente lors de la compétition à 20°C entre le consortium de *Bacillus* initialement à 5 log ufc/mL et du cocktail de *L. monocytogenes* à 5 log ufc/mL

Avec *Bacillus* Compet = compte bactérien spécifique au consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente) en croissance en compétition avec le cocktail de *Listeria*, Lm Compet = compte bactérien spécifique au le cocktail de *Listeria* en croissance en compétition avec consortium de *Bacillus* (avec matrice détergente), AA = avec agitation, et SA = sans agitation.

Discussions

1. Effets des conditions à l'étude sur le comportement des cultures microbiennes

La comparaison des résultats de croissance des consortiums bactériens et de *L. monocytogenes* seul et en compétition correspondant aux études à 30°C prouve l'efficacité du produit commercial à inhiber la croissance de *L. monocytogenes* et à exercer une exclusion compétitive dans ces conditions. Au niveau des compétitions *Ba3-Lm3* et *Ba3-Lm5*, la croissance en compétition de *Bacillus* permet d'inhiber la croissance de *Listeria* par rapport à la culture pure de plus de 2 log ufc/mL sans agitation et de plus de 3 log ufc/mL avec agitation. Le format d'essai des tubes Falcons de 15 mL pourrait être insuffisant pour permettre une aération optimale de la croissance du consortium de *Bacillus* et permettre une meilleure exclusion compétitive de ce consortium sur le cocktail de *L. monocytogenes* en utilisant un volume de milieu de 6 mL au lieu des 10 mL étudiées ici. Il s'agit donc bel et bien d'une exclusion compétitive exercée par *Bacillus subtilis*, où la matrice détergente est trop diluée pour avoir un impact sur la croissance des bactéries (d'après les résultats du tableau 10). L'exclusion compétitive exercée par *Bacillus sp.* sur *L. monocytogenes* a déjà été prononcée en partie par l'enquête de Weatherill. (2009) : parmi les seize bactéries pouvant réduire la croissance de *Listeria monocytogenes*, trois d'entre elles ont la capacité d'inhiber de 3 log ufc/mL le développement du microorganisme pathogène. Parmi ces trois bactéries se trouve une bactérie particulièrement intéressante soit, *Bacillus subtilis*, dont la souche a été nommée CCL9 et qui semble agir de façon efficace dans la lutte contre cet organisme pathogène en industrie agroalimentaire. Cependant, on remarque également que pour les compétitions *Ba5-Lm5* et *Ba5-Lm3* à 30°C, la phase de latence de *Bacillus* est de 14 heures (figures 11 et 15). Or à ce moment, les *Listeria* ont déjà évolué en nombre, mais sans pouvoir atteindre les valeurs de la culture pure, on en déduit donc qu'un autre phénomène d'inhibition que l'exclusion compétitive exercée par *Bacillus sp.* peut contribuer à l'inhibition de la croissance de *Listeria*. D'après les informations reçues de la compagnie sur la composition du produit, et les résultats du tableau 10 sur la présence de la matrice détergente à une dilution 100 fois, il faut prendre en considération l'effet de la matrice détergente dans ces conditions (*Ba5-Lm5* et *Ba5-Lm3*) à 30°C. Ainsi les résultats de ces compétitions et du tableau 10 suggèrent qu'il ne s'agit pas seulement d'exclusion compétitive dans ces deux cas. De plus à cette température, l'efficacité de l'exclusion compétitive (*Ba3-Lm3* et *Ba3-Lm5*) où la réduction est de 2,5 log ufc/mL avec agitation et 3 log ufc/mL sans agitation (figures 9 et 13) est plus importante que l'effet de la matrice détergente (*Ba5-Lm5* et *Ba5-Lm3*) avec une inhibition allant jusqu'à 1,5 log ufc/mL, quelque soit l'agitation (figures 11 et 15). Cependant, bien que le tableau 10 illustre l'effet de la matrice sur le microorganisme pathogène, un témoin de culture du cocktail de *Listeria* avec la matrice détergente seule (sans consortium de *Bacillus*) aurait permis de distinguer l'effet de la dite matrice par rapport à la compétition. On peut également conclure sur l'effet positif de l'agitation sur l'efficacité à inhiber *Listeria*, illustré dans les conditions (*Ba3-Lm3* et *Ba3-Lm5*). D'après Piggot. (2009), cela est provoqué par une meilleure croissance de *B. subtilis* : bien qu'en condition anaérobie, cette bactérie utilise le nitrate (ou le nitrite) comme accepteur final d'électron, il est plus productif pour elle d'utiliser l'oxygène (en condition aérobie donc) comme accepteur final d'électron lui permettant ainsi d'économiser de l'énergie (L'adénosine-5'-triphosphate, ou ATP) et de l'utiliser pour se multiplier plus rapidement, d'où l'importance d'une oxygénation adéquate et de la

remarque sur l'étude d'un rapport optimal entre volume de milieu (permettant d'effectuer l'ensemble des dénombrements) et l'air contenu dans le Falcon : le passage à l'erlenmeyer pour une oxygénation efficace est à envisager.

Lorsqu'on observe l'évolution des résultats de la compétition *Ba3-Lm3* dans les trois conditions de température, on remarque que les taux de croissance de *Bacillus* diminuent jusqu'à prendre une valeur nulle à 10°C (absence de croissance), ce qui peut expliquer la réduction de l'effet inhibiteur de l'exclusion compétitive. Plus la température devient froide, moins *Bacillus* arrive à croître, illustré au tableau 7 (dans les cas où une croissance existe), et plus *Listeria* arrive à prendre le dessus de la compétition car *L. monocytogenes* est psychotrope alors que *Bacillus* est mésophile, ayant une température maximale de croissance à 50°C, une température optimale à 40°C et une température minimale de croissance à 10°C, si sous forme de spore à l'état initial (Gun Phae *et al.*, 1990 ; Gounot, 1991 ; Rudolf et Scherer, 2001). Ce phénomène s'appliquerait également lors de la compétition *Ba3-Lm5* où la perte du pouvoir d'inhibition suit le profil mésophile de *Bacillus*. On remarque même à la figure 21 un effet inverse soit une exclusion compétitive exercée cette fois-ci par *Listeria* sur *Bacillus*. Bien que *B. subtilis* ait la capacité de se développer à 10°C (Zhao, 2006), cette bactérie, sous forme de spores dans le produit commercial (pour résister à la matrice) ne germe pas à 10°C et donc ne peut pas se multiplier (Nichols *et al.*, 1995). Cette absence de croissance explique également les résultats de pH de *Bacillus* qui n'évoluent plus et qui restent stable à une valeur proche de $7,5 \pm 0,2$.

Lorsqu'on observe les résultats de la compétition *Ba5-Lm3* à 30°C, on remarque qu'il existe une différence significative entre les comptes de *Listeria* en culture pure et de *Listeria* en compétition, et cela après 4 heures d'incubation. Or à ce moment, et jusqu'à la 14^{ème} heure, il n'y a aucune croissance des *Bacillus*, dans ce cas, il est fort probable d'après les résultats du tableau 10 que l'effet observé sur la croissance de *Listeria* soit celui de la matrice détergente. Un témoin avec la matrice sans bactéries aurait permis de confirmer cette hypothèse. On remarque également que plus la température diminue, plus l'effet inhibiteur probable de cette matrice détergente est important (figures 15, 23 et 29) où l'inhibition atteint respectivement 1,5 log ufc/mL à 30°C, 6 log ufc/mL à 20°C et finalement de presque 9 log ufc/mL à 10°C. Ces résultats suggèrent donc que *L. monocytogenes* est sensible à la matrice détergente contenue dans le produit commercial et que plus la température d'incubation diminue, plus la sensibilité de la bactérie à la matrice augmente, l'activité métabolique de *L. monocytogenes* n'est pas suffisamment élevée pour qu'il puisse se défendre rapidement et efficacement contre l'agression par les détergents jusqu'à permettre une quasi-élimination de l'organisme dans le milieu de culture à 10°C. Cette synergie entre l'effet de la température et l'effet de la matrice détergente provoque une perte progressive de résistance, ce qui a déjà été observé par Gill et Landers (2003). C'est le principe que l'on exploite pour l'effet barrière (Leinster, 2000). Ce phénomène est également observé lors de la compétition *Ba5-Lm5*, mais est moins marqué à cause de la concentration initiale de *Listeria* plus importante de 2 log ufc/mL qui diminue l'effet de la matrice détergente. En effet, pour une concentration identique de molécules détergentes, la concentration de cibles (bactéries du consortium de *Bacillus* et du cocktail de *Listeria*) a augmenté, l'efficacité de la matrice diminue donc (Gill et Landers, 2003). Les figures 11, 19 et 27 montrent qu'à 30°C, le temps d'incubation du cocktail de *Listeria* en compétition pour atteindre la phase stationnaire est de 22 heures alors qu'elle n'est que de 12 heures en culture pure, qu'à 20°C, l'inhibition des *L. monocytogenes* en compétition en fin d'expérimentation est de 4 log ufc/mL par rapport aux valeurs en culture pure et qu'à 10°C, cette différence est de 5 log ufc/mL.

Si l'on se penche sur les résultats du tableau 7, on remarque que ces taux de croissance, lorsque les concentrations initiales à l'étude sont de 3 log ufc/mL et de 5 log ufc/mL pour une même bactérie en culture pure (que se soit *Listeria* ou *Bacillus*) et dans les mêmes conditions de température et d'agitation, sont différents. La matrice détergente ayant un effet bactériostatique sur la croissance du consortium de *Bacillus*, en empêchant les spores de germer dans un milieu qu'elles ne considèrent pas comme favorable à la croissance. Comme l'effet de la matrice détergente (étant d'origine chimique) devrait s'épuiser avec le temps (voir discussion point 3.2), une explication plausible pour expliquer que si la concentration augmente alors que le taux de croissance diminue est l'effet du quorum sensing. D'après Miller et Bassler (2001), grâce à cette communication, les cellules peuvent limiter ou stopper leur croissance mais également réguler l'expression de facteurs de virulence et former des biofilms (cas de *L. monocytogenes*). Ce phénomène, type spécifique de quorum sensing a déjà été observé par Dunne *et al.* (2008) et se traduit par des échanges inter-cellulaires en réponse aux signaux environnementaux et permet la régulation de l'expression des gènes en fonction de l'évolution de la densité de la population cellulaire en adoptant de nouveaux comportements par accumulation de molécules chimiques, appelées auto-inducteurs (des oligopeptides chez les gram positif, ici *B. subtilis* et *L. monocytogenes*).

L'intérêt des mesures de pH est de pouvoir confirmer une activité métabolique dans les différentes conditions expérimentales. On observe bien à la figure 10 par exemple, que la compétition suit les valeurs de pH de *Bacillus*, ce qui supporte les valeurs des courbes de croissance en compétition de la figure 9, où *Bacillus* est dominant. Au contraire, le pH en compétition de la figure 26 suggère que la compétition *Ba3-Lm3* à 10°C est dominée par *Listeria* (figure 25) car le pH en compétition tend à reproduire celui de la culture pure de *Listeria*. De plus, on observe chez *Listeria*, un effet de l'agitation sur le pH. Lorsque le milieu est agité, la valeur de pH est plus élevée soit 5,7 avec agitation et 5,3 sans agitation (*Ba3-Lm3* à 10°C, figure 26). Cette différence s'explique par le mode de production d'énergie de la bactérie. Celle-ci, lorsque limitée en oxygène (milieu non agité et limité au cours du temps) peut utiliser une voie métabolique en anaérobiose. D'après Prescott *et al.* (2003), ce changement métabolique à cause du manque d'oxygène augmente la production d'acide lactique, ce qui fait diminuer le pH de la culture et explique le résultat observé à la figure 26. Lorsqu'il y a croissance de *Listeria*, il y a toujours cet effet significatif de l'agitation sur le pH. De même, quel que soit la température à l'étude, le pH final de *Listeria* est toujours identique, dans le cas où *Listeria* arrive à atteindre la phase stationnaire. La dépendance des *Bacillus* sur le nitrate et le glucose pour être compétitif en condition anaérobie est introduit par Nijburg (1998). Cette étude démontre que *B. licheniformis* est incapable d'être compétitif avec *P.s fluorescens*. En effet, ce dernier augmente sa croissance au détriment de l'autre car il est capable de réduire les nitrites avec l'acétate et de l'utiliser comme source de carbone et que *P. fluorescens* a une plus grande affinité pour les nitrates et le glucose.

Enfin, l'utilisation d'autres microorganismes peut être envisagée pour lutter efficacement contre *L. monocytogenes*, il s'agit des phages, et plus particulièrement des phages A511 et P100 qui, d'après Dortet *et al.* (2009) seraient très efficaces pour contrôler la contamination de ce microorganisme pathogène dans les fromages et sur les équipements agroalimentaires où ce microorganisme pathogène est présent et en croissance. D'après l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA ; 2013), l'utilisation de ce phage (LIXTEX™ P100 dans le commerce) est soumise à « une lettre de non-objection » et est efficace entre 1°C et 37°C, ce qui correspond aux températures à l'étude et aux variations dans les drains d'industrie agroalimentaire. De plus, la découverte des nouvelles technologies comme l'utilisation du plasma froid (courant électrique dans un mélange gazeux) sous pression atmosphérique qui s'est révélée efficace pour

détruire un biofilm en milieu hospitalier (Alkawareek *et al.*, 2012) peut s'avérer être une technologie applicable dans les drains d'industrie agroalimentaire.

2. Interactions microbiennes

Les résultats des interactions microbiennes suggèrent que les souches de *B. subtilis* sont capables d'inhiber la croissance de certaines *Listeria*, incluant les souches de *L. monocytogenes* constituant le cocktail à l'essai. Les souches de *B. pumillus*, et de *B. licheniformis* ont également cette capacité, mais avec moins d'efficacité. Les souches B1 CI, B3 et B6 contenues dans le produit commercial sont donc les meilleurs inhibiteurs des *L. monocytogenes*, conclusion tirée du tableau 8 au point 2.

D'après les résultats présentés au tableau 9 et les travaux de Anilkumar *et al.* (2010), on peut affirmer que la substance inhibitrice est de nature protéique car, la protéinase K, une enzyme de la famille des protéases est capable de la dégrader, ce qui est illustré à la figure 34. En effet, la protéinase dégrade la substance inhibitrice produit par B1 et B6 observé au tableau 9 en coupant les liaisons peptidiques ce qui inactive cette substance et qui suggère que l'activité inhibitrice observée lors du test d'inhibition de croissance en milieu solide pourrait être de nature protéique ou comporter des éléments de nature protéique. Il est très important que la goutte de 5 μ L de protéinase ne soit pas introduite directement dans le puits, car au lieu de dégrader la substance inhibitrice qui se répand dans la gélose, elle inactiverait directement les bactéries en croissance, et l'observation serait erronée. Chez *Bacillus subtilis*, la surfactine, une molécule signal du quorum-sensing, induit la phosphorylation de la protéine régulatrice Spo0A. D'après Piggot (2009), en fonction de son degré de phosphorylation, celle-ci conduit à une synthèse accrue d'EPS accompagnée de la production de deux toxines (Skf et Sdp). Dans un biofilm, les cellules qui synthétisent les bactériocines provoquent la mort et la lyse de leurs congénères sensibles. L'augmentation en nutriments qui en résulte favorise les cellules productrices d'EPS et donc le développement du biofilm. L'exposition d'un biofilm de *B. subtilis* à des composés microbiens entraîne une réponse similaire de la population (Lopez *et al.*, 2009). Ce processus de mort cellulaire, apparenté à du cannibalisme et modulant le développement du biofilm, semble donc correspondre à un mécanisme de défense (Engelberg-Kulkaa *et al.*, 2006). En plus de la production d'une protéine ayant un effet antimicrobien, certaines souches de *B. subtilis* peuvent inhiber les *L. monocytogenes* par production d'antimicrobiens. La production de ces antimicrobiens est destinée à améliorer la compétitivité de l'organisme producteur dans un milieu aux ressources limitées (Marahiel *et al.*, 1993), ce qui est le cas dans notre étude d'exclusion compétitive.

Dans cette optique, l'étude de Zhao *et al.* (2004) porte sur la lutte contre l'établissement d'un biofilm de *L. monocytogenes* sur des plaques en acier inoxydable. L'intérêt de leur étude vient de leur hypothèse : ils estiment que la température d'incubation peut influencer la capacité à compétitionner. Dans cette étude, c'est une exclusion compétitive réalisée d'une part sur l'utilisation des nutriments présents dans le milieu Tryptic Soy Broth (TSB), et d'autre part, sur la capacité d'inhiber, via la production de métabolites agissant comme antimicrobien contre *L. monocytogenes*. L'ensemble des microorganismes utilisés (bactéries et levures) ont été isolés à partir de drains d'industries agroalimentaires. Il en résulte que plusieurs bactéries ont la capacité d'inhiber *L. monocytogenes*, et ce, à différentes températures, ce qui correspond à la réalité des drains d'industrie agroalimentaire. Vu le profil psychotrope de *Listeria*, ceci est très intéressant : à 4°C, l'une de ces bactéries est *Lactococcus lactis subsp. lactis* C-1-92. Par contre, c'est également pour la production de bactériocine, la nisine Z inactivée par protéinase K (Olasupo *et al.*, 1999; Servin, 2004), que *Lactococcus lactis* BFE 1500 peut être un compétiteur efficace contre *L. monocytogenes*. Bien que cette bactérie soit non-

sporulée, la production de bactériocine permet de croire que *B. subtilis*, également producteur de bactériocines inactivées par protéinase K, a toutes les chances d'être aussi efficace contre *L. monocytogenes*. En effet, elle produit l'iturine (Peyroux, 1973), et accessoirement, la bacillomycine (Besson et al., 1977) et la mycosubtiline (Peyroux et al., 1976).

L'utilisation de ce produit commercial dans le but d'exercer une compétition contre *L. monocytogenes*, il serait sage d'optimiser le produit en retirant les souches B2 et B3, n'ayant d'après le tableau 8, aucune capacité à inhiber le microorganisme pathogène. De plus la souche B6 serait à échanger, à cause de son inhibition d'une part sur B1Cl (souche du produit commercial ayant un effet contre les *Listeria*) et d'autre part sur B1Co, car justement B1Co est la souche conseillée à intégrer dans le produit commercial. Cela me semble être un bon choix car B1Co a, d'après les résultats du tableau 8, la même efficacité que B6 contre les souches de *L. monocytogenes*. Le produit commercial sera constitué à la base de souches de *Bacillus* n'ayant aucune interaction néfaste entre elles, soit les souches B1Co (*B. pumillus*), B1Cl et B3 (*B. subtilis*). Toutefois rien n'empêche d'ajouter de nouvelles souches à ce nouveau consortium par l'étude de nouvelles bactéries disponibles à L'Université Laval, chez notre associé commercial ou d'autres partenaires.

3. Effet de la matrice détergente

3.1. Résistance à la matrice détergente

Ces expériences récapitulées dans le tableau 10 démontrent que la matrice détergente a un effet létal sur *L. monocytogenes* lorsqu'elle n'est pas diluée, quelle que soit la température. Ceci dit, l'efficacité à tuer le microorganisme pathogène diminue avec la dilution de la matrice; la matrice n'est plus létale lorsqu'elle est diluée 100 fois (ce qui correspond à la dilution nécessaire au produit commercial pour que la concentration du consortium bactérien atteigne la concentration initiale à l'étude de 5 log ufc/mL). En ce qui concerne la concentration initiale de 3 log ufc/mL, il est fort probable que la matrice détergente soit trop diluée pour être efficace (cela correspond à une dilution de 10 000 fois). Mais la sensibilité des souches du cocktail de *L. monocytogenes* augmente avec la température (figure 10). L'augmentation de la sensibilité à un antimicrobien, couplée avec un autre facteur tel que la température ou la pression, est un principe théorique illustré par Allion (2004), ce qui valide ces constats. À 20 et 10°C, la matrice détergente a un effet létal à une dilution de 10X, ce qui suggère qu'elle a un effet inhibiteur à une dilution de 100X, ce qui explique les résultats des compétitions *Ba5-Lm5* et *Ba5-Lm3* à 20 et 10°C (figures 19, 23, 27 et 31). En conditions réelles, le produit commercial est à introduire dilué de moitié dans chaque drain ce qui correspond à une concentration d'environ 7 log ufc/mL. En prenant en compte l'ensemble des facteurs présents dans le drain pouvant encore diluer le produit commercial (voir points 2.2 et 2.3 de la bibliographie) même après nettoyage, on comprend que la concentration en industrie de la matrice commerciale peut rapidement diminuer et que donc, son utilisation seule ne peut pas entièrement réduire la contamination bactérienne présente dans les drains.

3.2. Persistance de la matrice détergente

La matrice étant d'origine chimique (dont la composition exacte m'est inconnue), à pH neutre, elle agit jusqu'à épuisement. C'est ce que l'on remarque pour les *Bacillus* à la figure 11 (*Ba5-Lm5*, 30°C) et ce qui est confirmé par la figure 35. Contrairement au cas des *L. monocytogenes*, chez *B. subtilis*, la matrice n'agit pas comme bactéricide, elle empêche sa croissance. En effet les spores de *B. subtilis* ne semblent pas reconnaître le milieu concentré de la matrice détergente comme propice à son développement, ce qui provoque un retard de croissance jusqu'à ce que la matrice se dissipe et puisse germer et se développer. Dès lors, une fois que la matrice est totalement épuisée, tous les facteurs, soit les effets de: l'agitation, la température, la concentration initiale de l'inoculum et des interactions microbiennes de nature protéique, agissent en synergie afin de permettre au produit commercial d'inhiber la croissance de *L. monocytogenes*; il s'agit de l'effet barrière décrit par Leinster (2000), qui aboutit aux bases de l'exclusion compétitive (Lunden, 2003).

Conclusion

Cette étude a donc démontré que le produit commercial est efficace pour exercer une exclusion compétitive sur la croissance de *L. monocytogenes in vitro* notamment à 30°C. Puisque les expériences ont été réalisées en milieu BHI, sans restriction nutritionnelle, le potentiel de la souche pour exercer une exclusion compétitive est bien réel du moment que les souches de *Bacillus* sont en mesure de croître et de se développer. L'efficacité observée dans les différents traitements est provoquée par l'effet vraisemblablement combiné du cocktail de cinq souches de *B. subtilis spp.* et de la matrice détergente. Les résultats ont également exposé les limites de cette technologie. Les profils de croissance des souches en compétition démontrent que la température doit permettre le développement des *Bacillus* pour qu'ils soient efficaces. En effet, sans la présence constante de la matrice détergente, *L. monocytogenes* a la capacité de se développer à 10°C, ce qui représente une mauvaise réfrigération. La concentration initiale du produit introduit dans le drain est primordiale, car s'il est trop dilué, la matrice ne pourrait pas avoir d'effet significatif sur *L. monocytogenes*, et la concentration initiale de *B. subtilis spp.* pourrait ne pas suffire à prévenir le développement et la formation de biofilm par cet organisme pathogène. Il est préférable d'utiliser ce type de produit de façon préventive avant même les premiers signes de contamination avec une réponse adaptée (optimisation des souches du produit commercial pour être ciblé contre une seule espèce pathogène, sans effet d'interactions entre les souches d'intérêt). Cela dans l'objectif de favoriser une efficacité optimale du consortium bactérien, d'éviter l'adhésion des cellules de *L. monocytogenes* sur la surface des équipements ou des drains et ultimement prévenir qu'un biofilm ne se forme, ce qui est nettement plus difficile à inhiber après sa constitution.

Ces travaux ont apporté une compréhension supplémentaire sur la capacité de maîtriser la croissance de *L. monocytogenes* par l'exclusion compétitive exercée par des bactéries du groupe *B. subtilis*. Ces résultats justifient donc l'utilisation de ces souches contre différentes souches de *L. monocytogenes*. Les phénomènes associés à cette inhibition sont complexes et demandent à être étudiés plus à fond dans une nouvelle étude *in vitro* avant de pouvoir prétendre à l'utilisation *in vivo*. Dans un premier temps, il suffira de prendre plusieurs mesures de température de drain en industrie notamment de produits carnés et laitiers comme le fromage, pour évaluer s'ils atteignent au Québec constamment la température de 10°C et de récupérer plusieurs échantillons de liquide de drain d'usine alimentaire en activité (laitière et de production carnée) afin d'étudier leur composition en nutriment et microbiologique et d'adapter la composition ainsi que la concentration du consortium en conséquence et de se rapprocher de la réalité industrielle. Ultimement, une fois les données ci-dessus collectées, un drain expérimental peut être constitué en laboratoire afin d'étudier les réactions de plusieurs produits de manière sécuritaire (facilement décontaminable et sans mettre en danger le consommateur) et pratique (expérimentation en tout temps et en continu) pour enfin proposer une solution fiable à la menace de *L. monocytogenes* en industrie agroalimentaire.

Bibliographie

- Aase B., Sundheim, G., Langsrud, S. et Rorvik, L.M. 2000. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 62:57-63.
- ACIA., 2013. Mise en oeuvre de la Politique de Santé Canada sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger. Dans : Aliment. <http://www.inspection.gc.ca/aliments/poisson-et-produits-de-la-mer/inspection-des-produits/poisson-listeria/fra/1338572158747/1338572678417> page consulté le 25 septembre 2013.
- Aarnisalo, K., S. Salo, H. Miettinen, M.-L. Suihko, G. Wirtanen, T. Autio, J. Lundén, H. Korkeala et Sjöberg. A.-M. 2000. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety* 20:237-250.
- Aarnisalo, K., Tallavaara, K., Wirtanen, G., Majjala, R. et Raaska, L. 2006. The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food Control* 17:1001-1011.
- Aguilar, M., Saez, J., Llorens, M. 2005. Improvement of coagulation–flocculation process using anionic polyacrylamide as coagulant aid. *Chemosphere* 58:47-56.
- Alkawareek, M. Y., Algwari, Q. Th., Lavery, G., Gorman, S. P., Graham, W. G., O'Connell, D. et Gilmore B. F. 2012. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Atmospheric Pressure Non-Thermal Plasma. *PLoS One*. 7:e44289.
- Allion, A. 2004. Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires.
- Altekruse, S.F., Street, D.A., Fein, S.B. et Levy, A.S. 1995. Consumer knowledge of food-borne microbial hazards and food handling practices. *Journal of Food Protection*. 59:287–294.
- Anderson, G. G. et O'Toole, G. A. 2008. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322:85-105.
- Anilkumar, R. K. et Shanmugasundaram, M. 2010. Design, synthesis and inhibitory effect of pentapeptidyl chloromethyl ketones on proteinase K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18:8383–8387.
- Barbeyrac (de), B. 2002, Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. *Médecine et Science Sélection*. John Libbey Eurotext. Paris. France. 468 p.
- Benka-Coker, M. et Ojioro, O. 1995. Effect of slaughterhouse wastes on the water quality of Ikpoba river, Nigeria. *Bioresource Technology* 52:5-12.
- Besson, F. Peyroux, F. Michel G. et Delcambe, L. 1977. Structure de la bacillomycine L, antibiotique de *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* 77:61–67.

- Beumer, R.E. et Giffel, M.C. 1999. Pathogens in domestic kitchens, facts and fiction. In: Tuijellars, A.C.T., Samson, R.A., Rombouts, F.M., Notermans, S. (Eds.), *Food Microbiology and Food safety into the next Millennium*. Zest, The Netherlands, pp. 345–347.
- Bohdziewicz, J. et Sroka, E. 2005. Integrated system of activated sludge reverse osmosis in the treatment of the wastewater from the meat industry. *Process Biochemistry* 40:1517–1523.
- Borucki, M. K., Peppin J. D., D. White, F. Loge et D. R. Call. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7336–7342.
- Branger, A. 2009. Applications pratiques et dirigées. Manuel pour les élèves. Ouvrage sélectif. *Educagri éditions*. Dijon. France. 137 p.
- Buchanan, R.L., Smith, J.L. et Long, W. 2000. Microbial risk assessment: dose–response relations and risk characterization. *International Journal of Food Microbiology* 58:159–172.
- Buchanan, R. E. et N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th edition. *Williams & Wilkins Co*. Baltimore. USA. 16:593-596.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. et Garcia-Fernandez, M.C. 2001. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* 65:75–82.
- Carpentier, B. et Chassaing, D. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology* 97:111-122.
- Charlton, K. M. et Garcia M. M. 1977. Spontaneous listeric encephalitis and neuritis in sheep: Light microscopic studies. *Veterinary Pathology* 14:297-313.
- Chavant, P. 2002 *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* 68:728–737.
- Cogan, T.A., Bloomfield, S., Humphrey, T.J., 2001. *Campylobacter* and *Salmonella* contamination levels on hands and kitchen surfaces following the preparation of raw chicken in domestic kitchens and after cleaning. Annual Symposium of the Society for Applied Microbiology, Swansea.
- Compaoré, C. S., Nielsen, D. S., Ouoba, L. I.I., Berner, T. S., Nielsen, K. F., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Ouédraogo, G. A., Jakobsen, M. et Thorsen, L. 2013. Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from *Bikalga*, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seed fermented condiment. *International Journal of Food Microbiology* 162:297-307.
- Conner, D. E., Brackett, R. F., et Beuchat, L. R. 1986. Effect on temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Applied and Environmental Microbiology* 52:59-63.
- Connor, J., Yule, W., Herbert, S. et Kavanagh, B. 1983. The value of activated sludges derived from abattoir wastes in chicken diets. *Agricultural Wastes* 6:235-248.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. et Lappin-Scott, H. M. 1955. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49 :711-745.

- Cotoni, L. 1942. A propos des bacteries dénommées *Listeria*: rappel d'une observation ancienne de méningite chez l'homme. *Annals of Microbiology* 68:92-95.
- Cournoyer, M. S. 1996. Sanitation and stabilization of slaughter-house sludges through composting. Proceedings of the Canadian Meat Research Institute Technology. Ontario: Canadian Meat Research Institute. Symposium, pages 1-7.
- Cousens, L. P. et Wing, E. J. 2000. Innate défenses in the liver during *Listeria* infection. *Immunological Reviews*. 174:150-159.
- Cunningham, F. 1976. Using dehydrated poultry waste in poultry rations – a review. *Agriculture Environ.* 3:69-76.
- Dalton, C. B., Austyin, C. C., Sobel, J., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Graves, L. M., Swaminathan, B., Proctor, M. E. et Griffm, P. M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *The New England Journal of Medicine* 336:100-105.
- Demirel, B., Yenigun, O. et Onay, T. T. 2005. Anaerobic treatment of dairy wastewaters – a review. *Process Biochemistry* 40:2583-2595.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms : microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8:881-890.
- Donnelier, V. 1993. Le froid dans les abattoirs : hygiènes, technique et technologie, Thèse Médecine vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France. 122 p.
- Dortet, L., Veiga-Chacon, E. et Cossart, P. 2009. *Listeria monocytogenes*. Encyclopedia of Microbiology. pages 182-198.
- Doyle, M. P. 2001. Food Microbiology, fundamental and frontiers (Second edition). ASM Press, Washington DC. USA. pages 383-410.
- Drenkard, E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection* 5:1213-1219.
- Dunny, G. M., Brickman, T. J. et Dworkin, M. 2008. Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *Bioessays*. 30:296-298.
- Dupuis, C., Tardif, R. et Verge, J. 2002. Hygiène et salubrité dans l'industrie laitière. Pages 135-138 dans Vignola, C. L. Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses Internationales Polytechnique, Montréal, Qc, Canada.
- Dykes, G.A. 2003. Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. *International Journal of Food Microbiology* 85:301–306.
- Elissalde N. 2001. Évaluation des risques sanitaires liés à la valorisation agronomique des boues de stations d'épuration. Thèse de Médecine vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes, France. 413 p.
- Embarek, P. K. B. 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafood: a review. *International Journal of Food Microbiology* 23:17–34.

- Engelber-Kulka, H., Amitai, S. Kolodkin-Gal, I. et Hazan, R. 2006. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLOS Genetique* 2:e135.
- Farber, J. M. et Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55:476-511.
- Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. et Reingold, A. L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine* 312:404-407.
- Flemming, H. C. et Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623-633.
- Fransen, N., Van den Elzen, A., Urlings, H. et Bijker, P. 1994. Pathogenic micro-organisms in slaughterhouse sludge – a survey. *International Journal of Food Microbiology* 33:245–256.
- Fuchs, W., Binder, H., Mavrias, G. et Braun, R. 2003. Anaerobic treatment of waste- water with high organic content using a stirred tank reactor coupled with a membrane filtration unit. *Water Research* 37:902-908.
- Garcia, A., Esteban, M., Marquez, M. et Ramos, P. 2005. Biodegradable municipal solid waste: characterization and potential use as animal feedstuffs. *Waste Management* 25:780-787.
- Garriga, M., Aymerich, M. T., Costa, S., Monfort, M. et Hugas, M. 2002 Bacteriocin synergism through bacteriocins and high pressure in a méat model System during storage. *Food Microbiology*. 19:509-518.
- Gause, G.F. 1934. The struggle for existence. MD : Wiliams & Wilkins, Baltimore, USA. 192 pages.
- Gellin, B. G. et Broome, C. V. 1989. Listeriosis. *JAMA*. 261:1313-1320.
- George, S. M., Lund, B. M. et Brocklehurst, T. F. 1988. Effects of pH, temperature on *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 6:153-156.
- Gill, C. O. et Landers, C. 2003. Microbiological effects of carcass decontaminating treatments at four beef packing plants. *Meat Science* 65:1005-1011.
- Gill, D. A. 1933. Circling disease: A meningoencephalitis of sheep in New Zealand. *The Veterinary Journal* 89:258-270.
- Giovannacci, I., Ragimeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendevre, J.-L., Carlier, V. et Ermel, G. 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology* 53:127-140.
- Goulter, R. M., Gentle, I. R. et Dykes, G. A. 2009. Issues in dertermining factors influencing bacterial attachment: a review using of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Letters in Applied Microbiology* 49:1-7.
- Gounot, A-M. 1991. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *Journal of Applied Microbiology* 71 :386-397.
- Gravani, R. 1999. Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities. In: Ryser, E.T., Marth, E.H.

- (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd Edition. Marcel Dekker, New York, pp. 657–709.
- Gray, M. L. et Killinger, A. H. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews* 30:309-382.
- Guillier, L. 2005. Variabilité des temps de latence cellulaires de *Listeria monocytogenes* en fonction des stress subis et des conditions de re-croissance. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France.
- Guiraud, J-P. 2003. Microbiologie agroalimentaire. Dunod. Paris. France. 652 p.
- Gun Phae, C., Shoda, M. et Kubota, H. 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 69:1-7.
- Hardin, G. 1960. The Competitive Exclusion Principle. *Science, New Series*, 131:1292-1297.
- Herau, V. 2003. Risque sanitaire microbiologique lié aux effluents d'abattoirs : comparaison d'une synthèse bibliographique avec une étude de terrain. Thèse de Médecine vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse, Toulouse, France.
- Ho, J. L., Shands, K. N., Friedland, G., Eckind, P. et Fraser, D. W. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection by environmental stresses. *Infection and Immunity* 63:4595-4599.
- Holah, J. T., Taylor, J. H., Dawson, D. J. et Hall, K. E. 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 92:111-120.
- Huss, H. H., Jørgensen, L. V. et Vogel, B.F. 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods *International Journal of Food Microbiology* 62:267-274.
- Jams, L. S. et Larry, L. M. 1986. Partial characterization of the genetic basis for sucrose metabolism and nisin production in *Streptococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 51:57-64.
- Jian, T. et Zhang, X. 1999. Bioprocessing for slaughterhouse wastewater and its computerized control and supervisory system. *Resources, Conservation and Recycling* 27:145-149.
- Jurado, R. L., Farley, M. M., Pereira, E., Harvey, R. C, Schuchat, A., Wenger, J. D. et Stephens, D. S. 1993. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 17:224-227.
- Jensen, A., Frederikson, W. et Gerner Smidt, P. 1994. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-90. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 26:171-178.
- Kathariou, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection* 65:1811–1829.
- Katla, T., Naterstad, K., Vancanneyt, M., Swings, J. et Axelsson, L. 2003. Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin P A-1, and nisin. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4431-4437.
- Kirisits, M. J. et Parsek, M. R. 2006. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signaling to build biofilm

communities, *Cellular Microbiology* 8:1841-1849.

Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P., et De Vos, W. M. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24:895-904.

Knabel, S. J. 1995. Food borne illness, role of home in food handling practices. *Journal of Food Technology* 49:119-131.

Kosseva, M. R., Kent, C.A. et Lloyd, D. R. 2001. Thermophilic bioremediation of whey: Effect of physico-chemical parameters on the efficiency of the process. *Biotechnology Letters*. 23:1675-1679.

Kosseva, M. R., Kent, C. A. et Lloyd, D. R. 2003 Thermophilic bioremediation strategies for a dairy waste. *Biochemical Engineering Journal* 15:125-130.

Kosseva, M. R. 2009. Management and Processing of Food Wastes. *Advances in Food and Nutrition Research* 58:57-136.

Lamont, R. J., Posdethwaite, R. et MacGowan, A. P. 1988. *Listeria monocytogenes* and its role in human infection. *Journal of Infection* 17:7-28.

Larpent, J. P. 2000. *Listeria*. Édition Tec et Doc, Paris, France. 165 p.

Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55:181-186.

Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C, Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P., Weaver, R. et Broome, G. C. 1988. Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine* 319:823-828.

Lopez, D., Vlamakis, H., Losick, R. et Kolter, R. 2009. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 74:609-618.

Lorber, B. 1997. Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases* 24:1-11.

Lou, Y. et Yousef, A. E. 1999. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In E. T. Ryser and E. H. Martin (eds.) *Listeria, listeriosis and food safety*, 2nd éd. Marcel Dekker Inc., New York, N. Y. pages 131-224.

Lunden, J. M., Autio, T. J., Sjöberg, A.-M. et Korkeala H. J. 2003. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in Meat and Poultry Processing Plants. *Journal of Food Protection* 66:2062-2069.

Lunden, J. M. 2004. Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants. Veterinary Medicine University of Helsinki, Helsinki, Finland. 60 p.

Macia, M. D., Blanquer, D., Toghres, B., Sauleda, J., Perez, J. L. et Olivier, A. 2005. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:3382-3386.

Mah, T. F. et O'Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in*

Microbiology 9:34-39.

- Mahoney, M. et Henriksson, A. 2003. The effect of processed meat and meat starter cultures on gastrointestinal colonization and virulence of *Listeria monocytogenes* in mice. *International Journal of Food Microbiology* 84:255-261.
- Marahiel, M. A., Nakano, M. M. et Zuber, P. 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular Microbiology* 5:631-636.
- Marco, A. J., Altamira, J., Prats, N., Lopez, S., Dominguez, L., Domingo, M. et Briones, V. 1997. Pénétration of *Listeria monocytogenes* in mice by the oral route. *Microbial Pathogenesis*. 23:255-263.
- McArthur, R.H. 1958. Population ecology of some warblers of northeastern coniferous forests. *Ecology* 39:599-619.
- McCarthy, S.A. 1997. Incidence and survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood products. *Journal Food Protection* 60:372-376.
- McDonnell, G. et Russell, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12:147-79.
- McLauchlin, J. et Low, C. 1994. Primary cutaneous listeriosis in adults: An occupational disease of veterinarians and farmers. *Veterinary Research* 135:615-617.
- Miettinen, M. K., Björkroth, K. J. et Korkeala, H. J. 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 46:187-192.
- Miller, M. B., et Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55:165-99.
- Milohanic, E., R. Jonquières, P. Glaser, P. Dehoux, C. Jacquet, P. Berche, P. Cossart et Gaillard J.-L. 2004. Sequence and binding activity of the autolysin-adhesin Ami from epidemic *Listeria monocytogenes* 4b. *Infection and Immunity* 72:4401-4409.
- Montañez-Izquierdo, V. Y., Salas-Vázquez, D. I. et Rodríguez-Jerez, J. J. 2012. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control* 23:470-477.
- Moreto, T. et Langsrud, S. 2004. Review article. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1:107-121.
- Moroni, O. 2007. Contribution à l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Listeria monocytogenes* : analyse *in vitro* et étude *in vivo* des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse de doctorat. Université Laval, Québec, QC, Canada.
- Mortlock, M. P., Peters, A. C. et Griffith, C. J. 1999. Food hygiene and hazard analysis critical control point in the United Kingdom Food Industry: Practices, Perceptions, and Attitudes. *Journal of Food Protection* 62:786-792.
- Murray, E. G. D., Webb, R. E. et Swann, M. B. R. 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed *Bacillus Bacterium monocytogenes* (n.

- sp.). *Journal of Pathology and Bacteriology* 29:407-439.
- Mylonakis, E., Hohmann, E. L. et Calderwood, S. B. 1998. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. *Medicine* 77:313-336.
- Nambi, J., Mbugua, P. et Mitaru, B. 1992. Nutritive evaluation of dried poultry excreta as a feed ingredient for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 37:99-109.
- Nichols, D. S., Nichols, P. D. et McMeekin, T. A. 1995. Ecology and physiology of psychrophilic bacteria from Antarctic saline lakes and ice-sea. *Science Progress* 78:311-348.
- Nijburg, J.W. 1998. Competition for nitrate and glucose between *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus licheniformis* under continuous or fluctuating anoxic conditions. *Microbial Ecology* 26:345-356.
- Norrung, B., Andersen, J.K. et Schlundt, J. 1999. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *International Journal of Food Microbiology* 53:195-203.
- Nyfeldt, A. 1929. Etiologie de la mononucleose infectieuse. *Compte Rendu Société de Biologie* 101:590-592.
- Ojeniyi, B., Wegener, H.C., Jensen, N.E. et Bisgaard, M. 1996. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products, epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. *Journal of Applied Bacteriology* 80:395-401.
- Olasupo, N. A., U. Schillinger, A. Narbad, H. Dodd, and W. H. Holzapfel. 1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. *International Journal of Food Microbiology* 53:141-152.
- Parsek, M. R. et Greenberg, E. P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology* 13:27-33.
- Peel, M., Donachie, W. et Shaw, A. 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *Journal of General Microbiology* 134:2171-2178.
- Peyroux, F. 1973. Isolement de l'acide 3-amino 12methyl trétradecanoïque et de l'acide 3-amino 12methyl tridecanoïque à partir de l'iturine, antibiotique de *Bacillus subtilis*. Tetrahedron. Pergamon Press, Oxford, Great Britain. pages 3455-3459.
- Peyroux, F., Michel, G. et Delcambe, L. 1976. Structure de la mycosubtiline, antibiotique isolé de *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* 63:391-398.
- Piggot, P. J. 2009. *Bacillus subtilis*. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Elsevier, San Diego, CA. USA. pages 45-56.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein D. A. 2003. Microbiologie. 2^e édition. Traduction de la 5^e édition américaine par C. – M. Bacq-Calberg et J. Dusart. De Boeck, Bruxelles, Belgique. 1137 p.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein D. A. 2010. Microbiologie. 3^e édition. De Boeck, Bruxelles, Belgique. 1216 p.

- Pruss, B. M., Besemann, C., Denton, A. et Wolfe, A. J. 2006. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 188:3731-3739.
- Râcz, P., Tenner, K. et Méro, E. 1972. Expérimental *Listeria enteritis*. An electron microscopic study of the epithelial phase in expérimental *Listeria* infection. *Laboratory Investigation* 26:694-700.
- Reading, N. C., et Sperandio, V. 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 1:1-11.
- Russell, J. 1986. Irrigation of primary treated and anaerobically treated meat-processing wastes onto pasture: lysimeter trials. *Agricultural Wastes* 18:257-268.
- Rocourt, J. 1996. Risk factors for listeriosis. *Food Control* 7:195-202.
- Rogers, H. W., Callery, M. P., Deck, B. et Unanue, E. R. 1996. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *Journal of Immunology* 156:679-684.
- Rudolf, M. et Scherer, S. 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* 63:91-98.
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W, Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. et Broome, C. V. 1983. Epidemic listeriosis: Evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 30:203-206.
- Schuchat, A., Swaminathan, B. et Broome, C. V. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4:169-183.
- Seeliger, H. P. R. et Hohne, K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergan, T et Norris J. R. (eds), *Methods in Microbiology*, Vol. 13:31-49, Academic Press, London. UK. pages 31-49.
- Seeliger, H. P. R. et Jones, D. 1986. *Listeria*. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (P. H. A. Sneath, N. S. Mair, N. E. Sharpe, and J. G. Holt, eds.),. Williams & Wilkins, Baltimore. USA. pages 1235-1245.
- Servin, A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28:405-440.
- Shineman, T.L. et Harrison, M.A. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* on different muscle tissues. *Journal of Food Protection* 57:1057-1062.
- Slutsker, L. et Schuchat, A. 1999. Listeriosis in humans. In: Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds.), *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, 2nd Edition. Marcel Dekker, New York. USA. pages. 75-96.
- Sofos, J. N., Kochevar, S. L., Bellinger, G. R., Buege, D. R., Hancock, D. D., Ingham, S. C., Morgan, J. B., Reagan, J. O. et Smith, G. C. 1999. Sources and Extent of Microbiological Contamination of Beef Carcasses in Seven United States Slaughtering Plants. *Journal of Food Protection* 62:140-145.
- Sroka, E., Kamfliskib, W. et Bohdziewicz, J. 2004. Biological treatment of meat industry wastewater. *Desalination* 162:85-91.

- Storz, G. et Hengge-Aronis, R. 2000. Bacterial stress response. First Edition, ASM Press. Washington, USA, 485p.
- Strevett, K. A. et Chen, G. 2003. Microbial surface thermodynamics and applications. *Research in Microbiology* 154:329-335.
- Swaminathan, B. 2001. Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers, 2nd Ed. Edited by M. P. Doyle et al. ASM Press, Washington, D.C. USA. 18:383-410.
- Tagg, J.-R., Dajani, A.S. et Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-Positive *Bacteria*. *Journal of Bacteriology* 3:722-756.
- Taormina, P. J. et L. R. Beuchat. 2001. Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2555–2563.
- Taulo, S., Wetlesen, A., Abrahamsen, R., Kululanga, G., Mkakosya, R. et Grimason, A. 2008. Microbiological hazard identification and exposure assessment of food prepared and served in rural households of Lungwena, Malawi. *International Journal of Food Microbiology* 125:111-116.
- Thassitou, P. K. et Arvanitoyannis, I. S. 2001. Bioremediation: A novel approach to food waste management. *Trends Food Science and Technology* 12:185–196.
- Tilney, L. G. et Portnoy, D. A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *Journal of Cell Biology*. 109:1597-1608.
- Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M. et Beynen, A.C. 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics - a comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 96:219–233.
- Tompkin, R. B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, 65:709-725.
- Uhtil, S., Jaksic, S., Petrak, T., Medic, H. et Gumhalter-Karolyi, L. 2004. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. *Food Control*, 15:213-216.
- Uldry, P. A., Kuntzer, T., Bogousslavsky, J., Regli, F., Miklossy, J., Bille, J., Francioli, P. et Janzer, R. 1993. Early symptoms and outcome of *Listeria monocytogenes* rhombencephalitis: 14 adult cases. *Journal of Neurology* 240: 235-242.
- Urbaniak, M. et Sakson, G. 1999. Preserving sludge from meat industry waste waters through lactic fermentation. *Process Biochemistry* 34:127-132.
- Valdimarsson, G., Einarsson, H., Gudbjornsdottir, B. et Magnússon, H. 1998. Microbiological quality of Icelandic cooked-peeled shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* 45:157–161.
- Vásquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domfnguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. et Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14:584-640.

- Wheatherill, S. 2009. Rapport de l'Enquêteur sur l'écllosion de listériose de 2008, Gouvernement du Canada, Ottawa, Canada. 178 p.
- Wilkinson, J. M. 1999. Silage and animal health. *Natural Toxins* 7:221-232.
- Zhao, T., M. P. Doyle. et P. Zhao. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 70:3996-4003.
- Zhao, T. 2006. Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3314-3320.
- Zheng, G. et Slavik, M. F. 1999. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Letters in Applied Microbiology* 28:363-367.
- Zobell, C. 1943. The effet of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* 46:39-56.

Annexe A : Calcul du taux de croissance (Prescott et al., 2003)

Tout d'abord, il nous faut calculer le nombre de génération dans la phase exponentielle de la courbe de croissance d'après la formule :

$$n = (\log N_t - \log N_0) / 0,301$$

Avec :

n = nombre de générations

N_t = nombre de cellules au temps t

N_0 = nombre de cellule au temps 0

On détermine ensuite le temps de génération à partir du nombre de génération comme suit :

$$g = \frac{T}{n}$$

Avec :

g = temps de génération en heure ou minute (temps requis pour que la population double)

T = temps écoulé entre N_t et N_0 en heure ou minute

n = nombre de générations

Finalement on trouve le taux de croissance par la relation :

$$\mu = 1/g$$

Avec :

μ = taux de croissance h^{-1} (nombre génération à l'heure)

g = temps de génération

Annexe B : Données des courbes de croissance en culture pure.

Ba pure Ba3 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,35	3,22	0,21	0,22
2	3,37	3,29	0,18	0,16
4	3,57	3,57	0,19	0,31
6	4,11	4,35	0,32	0,21
8	4,88	5,03	0,01	0,19
10	5,75	5,95	0,26	0,21
12	6,62	6,22	0,48	0,21
14	7,55	6,89	0,27	0,09
16	7,53	7,05	0,26	0,09
18	7,51	7,37	0,23	0,20
20	7,48	7,31	0,27	0,12
22	7,47	7,27	0,29	0,23
24	7,49	7,36	0,24	0,19

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Lm pure Lm3 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,30	3,29	0,06	0,10
2	3,45	3,35	0,02	0,10
4	4,44	4,11	0,16	0,03
6	4,87	4,90	0,04	0,02
8	5,56	5,97	0,13	0,02
10	6,46	7,18	0,01	0,01
12	7,61	7,77	0,19	0,00
14	8,78	8,85	0,17	0,00
16	9,19	9,14	0,00	0,02
18	9,20	9,21	0,00	0,01
20	9,19	9,17	0,02	0,01
22	9,15	9,17	0,00	0,01
24	9,07	9,22	0,01	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba pure Ba5 30°C

Temps (h)	Log(10)		EC	
	AA	SA	AA	SA
0	5,07	5,06	0,03	0,08
2	4,99	5,02	0,03	0,05
4	4,93	5,00	0,01	0,11
6	4,86	4,88	0,14	0,15
8	4,85	4,71	0,14	0,21
10	4,88	4,72	0,15	0,20
12	4,81	4,88	0,16	0,22
14	4,95	5,09	0,10	0,44
16	5,78	5,65	0,16	0,36
18	5,95	6,20	0,30	0,08
20	6,88	6,72	0,02	0,13
22	7,21	7,17	0,02	0,42
24	7,72	7,31	0,44	0,25

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Lm pure Lm5 30°C

Temps (h)	Log(10)		EC	
	AA	SA	AA	SA
0	5,10	5,37	0,18	0,05
2	5,29	5,66	0,04	0,07
4	6,26	6,36	0,05	0,18
6	6,91	7,09	0,28	0,24
8	7,68	7,89	0,37	0,21
10	8,11	8,27	0,10	0,23
12	9,06	8,90	0,15	0,02
14	9,11	9,11	0,04	0,04
16	9,19	9,18	0,06	0,01
18	9,24	9,17	0,01	0,12
20	9,23	9,14	0,01	0,12
22	9,24	9,16	0,01	0,13
24	9,21	9,16	0,02	0,11

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba pure Ba3 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,21	3,12	0,14	0,09
2	3,19	3,17	0,15	0,07
8	3,21	3,21	0,16	0,03
16	3,80	3,83	0,26	0,16
24	4,60	3,96	0,39	0,12
32	5,68	4,88	0,36	0,46
40	6,46	5,85	0,32	0,43
48	6,99	6,52	0,12	0,36
56	7,40	6,78	0,44	0,01

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Lm pure Lm3 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,35	3,36	0,19	0,18
2	3,38	3,41	0,22	0,22
8	3,92	3,92	0,53	0,51
16	4,90	5,09	0,69	0,89
24	6,63	6,49	0,55	0,60
32	8,07	7,78	0,57	0,60
40	8,79	8,39	0,58	0,36
48	9,17	8,96	0,16	0,13
56	9,20	8,98	0,15	0,11

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba pure Ba5 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,19	5,13	0,14	0,15
2	5,17	5,13	0,14	0,13
8	5,15	5,13	0,16	0,12
16	5,07	5,03	0,17	0,24
24	5,15	4,99	0,15	0,27
32	5,04	5,01	0,21	0,24
40	5,07	4,98	0,19	0,26
48	5,00	4,98	0,25	0,25
56	5,03	5,02	0,21	0,22

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Lm pure Lm5 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,40	5,26	0,13	0,21
2	5,75	5,58	0,49	0,61
8	6,65	6,54	0,67	0,47
16	7,99	7,99	0,37	0,53
24	8,57	8,57	0,62	0,16
32	9,23	8,98	0,07	0,02
40	9,20	8,98	0,18	0,07
48	9,19	9,01	0,08	0,05
56	9,23	9,05	0,11	0,09

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba pure Ba3 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,30	3,35	0,06	0,03
1	3,29	3,44	0,07	0,03
2	3,33	3,24	0,01	0,01
3	3,25	3,30	0,03	0,02
4	3,34	3,31	0,06	0,01
5	3,32	3,35	0,01	0,01
6	3,21	3,34	0,06	0,00
7	3,15	3,35	0,01	0,01
8	3,08	3,22	0,01	0,05
9	3,05	3,40	0,05	0,03
10	3,11	3,23	0,03	0,03

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Lm pure Lm3 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,60	3,70	0,03	0,01
1	3,74	3,70	0,02	0,01
2	4,14	3,95	0,09	0,05
3	5,23	4,73	0,15	0,07
4	6,39	5,72	0,08	0,14
5	7,45	6,36	0,04	0,19
6	8,41	7,21	0,12	0,16
7	9,16	8,01	0,02	0,06
8	9,39	9,10	0,12	0,01
9	9,10	9,03	0,04	0,02
10	9,11	9,03	0,03	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba pure Ba5 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,27	5,23	0,03	0,05
1	5,24	5,18	0,05	0,02
2	5,24	5,11	0,01	0,03
3	5,13	5,16	0,02	0,01
4	5,22	5,26	0,03	0,01
5	5,26	5,25	0,02	0,05
6	5,30	5,19	0,01	0,03
7	5,25	5,25	0,01	0,06
8	5,28	5,18	0,02	0,01
9	5,16	5,07	0,01	0,03
10	5,16	5,11	0,01	0,03

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Lm pure Lm5 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,58	5,48	0,22	0,19
1	5,65	5,51	0,21	0,21
2	6,09	5,63	0,28	0,45
3	7,00	6,45	0,39	0,45
4	8,01	7,01	0,53	0,67
5	8,67	7,90	0,62	0,65
6	9,33	8,45	0,33	0,86
7	9,19	8,64	0,10	0,80
8	9,23	9,08	0,14	0,07
9	9,17	8,97	0,06	0,12
10	9,08	8,86	0,08	0,20

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Annexe C : Données des courbes de croissance en compétition.

Ba Compet Ba3-Lm3 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,31	3,26	0,03	0,01
2	3,36	3,26	0,06	0,02
4	3,95	3,77	0,41	0,02
6	4,25	4,36	0,62	0,00
8	5,31	5,35	0,62	0,12
10	6,12	6,02	0,06	0,01
12	6,91	6,32	0,33	0,00
14	7,61	7,04	0,13	0,09
16	7,87	7,26	0,18	0,05
18	7,95	7,37	0,29	0,07
20	7,92	7,30	0,27	0,08
22	7,82	7,54	0,19	0,14
24	7,36	7,40	0,26	0,18

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba3-Lm3 Lm Compet 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,26	3,45	0,01	0,00
2	3,27	3,44	0,00	0,05
4	4,10	4,26	0,04	0,02
6	4,90	5,25	0,04	0,01
8	4,58	5,29	0,02	0,01
10	3,73	5,29	0,03	0,01
12	3,15	5,17	0,52	0,24
14	3,19	5,42	0,60	0,47
16	3,66	5,97	0,09	0,26
18	4,36	6,36	0,90	0,20
20	3,83	6,36	0,25	0,26
22	3,39	6,34	0,23	0,40
24	3,05	5,47	0,62	0,39

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba5-Lm5 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,19	5,15	0,01	0,04
2	5,22	5,14	0,01	0,03
4	5,17	5,11	0,01	0,02
6	4,91	4,92	0,01	0,05
8	4,84	4,76	0,02	0,09
10	4,72	4,64	0,01	0,06
12	4,95	4,78	0,29	0,43
14	4,99	5,48	0,28	0,51
16	5,93	5,87	0,21	0,34
18	6,72	6,43	0,06	0,42
20	7,38	6,61	0,40	0,53
22	7,48	7,15	0,54	0,09
24	8,05	7,33	0,04	0,13

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba5-Lm5 Lm Compet 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,23	5,45	0,01	0,02
2	5,32	5,50	0,01	0,01
4	5,73	5,81	0,06	0,05
6	5,77	6,04	0,09	0,02
8	6,19	6,51	0,08	0,07
10	6,66	6,71	0,09	0,17
12	6,88	6,84	0,11	0,24
14	7,18	7,27	0,03	0,06
16	7,56	7,73	0,17	0,16
18	8,12	8,15	0,13	0,02
20	8,58	8,83	0,11	0,23
22	9,12	9,15	0,14	0,04
24	9,19	9,27	0,13	0,14

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba3-Lm5 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,45	3,32	0,01	0,02
2	3,43	3,34	0,01	0,00
4	3,65	3,76	0,06	0,03
6	4,76	4,76	0,09	0,06
8	5,40	5,38	0,01	0,03
10	6,21	5,99	0,02	0,16
12	6,91	6,35	0,02	0,40
14	7,11	7,11	0,29	0,18
16	7,39	7,47	0,12	0,07
18	7,22	7,60	0,31	0,33
20	7,17	7,23	0,30	0,23
22	7,11	7,20	0,32	0,21
24	6,79	7,17	0,83	0,14

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba3-Lm5 Lm Compet 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,36	5,31	0,01	0,01
2	5,31	5,37	0,13	0,00
4	5,69	6,39	0,02	0,02
6	6,12	7,00	0,04	0,05
8	6,54	7,15	0,03	0,02
10	7,37	6,69	0,04	0,02
12	4,75	6,38	0,35	0,18
14	5,03	6,72	0,31	0,57
16	5,24	7,15	0,18	0,10
18	5,07	6,63	0,15	0,12
20	5,05	5,92	0,33	0,81
22	5,21	6,43	0,06	0,85
24	5,21	6,24	0,02	0,78

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba5-Lm3 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,11	5,26	0,04	0,01
2	5,07	5,22	0,03	0,01
4	5,04	5,00	0,06	0,03
6	5,04	4,91	0,03	0,05
8	4,71	4,73	0,07	0,04
10	4,68	4,69	0,09	0,07
12	4,91	4,87	0,05	0,17
14	5,29	5,27	0,13	0,09
16	5,68	5,60	0,48	0,29
18	6,37	6,25	0,12	0,16
20	7,03	6,89	0,38	0,16
22	8,06	7,37	0,16	0,31
24	8,11	7,55	0,19	0,28

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba5-Lm3 Lm Compet 30°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,44	3,45	0,01	0,01
2	3,42	3,43	0,01	0,02
4	3,42	3,41	0,01	0,01
6	4,13	4,12	0,02	0,04
8	4,20	4,16	0,00	0,02
10	4,40	4,29	0,02	0,01
12	4,90	4,88	0,04	0,02
14	5,21	5,19	0,11	0,05
16	5,50	5,39	0,16	0,07
18	6,11	5,99	0,08	0,05
20	6,30	6,28	0,04	0,00
22	6,44	6,76	0,03	0,04
24	6,95	7,34	0,07	0,11

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba3-Lm3 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,34	3,35	0,12	0,08
2	3,34	3,36	0,10	0,07
8	3,36	3,37	0,10	0,05
16	3,61	3,55	0,16	0,13
24	4,65	4,02	0,26	0,39
32	5,87	4,83	0,51	0,58
40	6,54	5,46	0,49	0,62
48	7,18	5,88	0,69	0,44
56	7,19	6,67	0,79	0,53

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba3-Lm3 Lm Compet20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,26	3,27	0,01	0,03
2	3,31	3,31	0,04	0,01
8	3,84	3,76	0,40	0,41
16	4,80	4,69	0,74	0,67
24	6,40	6,04	0,73	0,59
32	6,45	6,82	1,36	0,51
40	4,75	6,93	1,69	0,54
48	3,41	6,60	1,97	0,73
56	3,22	6,12	2,19	0,16

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba5-Lm5 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,23	5,21	0,06	0,08
2	5,21	5,20	0,06	0,06
8	5,19	5,19	0,08	0,06
16	5,20	5,20	0,05	0,05
24	5,17	5,16	0,09	0,08
32	5,15	5,14	0,12	0,08
40	5,11	5,11	0,14	0,12
48	5,12	5,11	0,14	0,13
56	5,10	5,11	0,15	0,13

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba5-Lm5 Lm Compet 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,34	5,36	0,04	0,02
2	5,36	5,37	0,04	0,02
8	5,37	5,39	0,04	0,01
16	5,35	5,40	0,08	0,00
24	5,33	5,37	0,04	0,04
32	5,23	5,27	0,07	0,13
40	5,21	5,25	0,07	0,14
48	5,18	5,24	0,09	0,14
56	5,20	5,23	0,07	0,15

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba3-Lm5 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,24	3,15	0,17	0,09
2	3,22	3,14	0,17	0,08
8	3,23	3,15	0,18	0,06
16	3,65	3,50	0,18	0,13
24	4,59	3,75	0,38	0,07
32	5,14	4,17	0,15	0,14
40	5,10	3,98	0,19	0,18
48	5,12	3,93	0,26	0,19
56	5,10	3,83	0,29	0,21

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba3-Lm5 Lm Compet 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,32	5,36	0,13	0,01
2	5,33	5,40	0,17	0,04
8	6,15	5,93	0,12	0,02
16	7,15	7,04	0,34	0,39
24	8,40	8,27	0,51	0,51
32	9,20	8,97	0,08	0,09
40	9,26	9,16	0,03	0,05
48	9,22	9,08	0,06	0,09
56	9,17	8,97	0,10	0,09

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba5-Lm3 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,27	5,19	0,02	0,02
2	5,25	5,20	0,02	0,01
8	5,22	5,20	0,01	0,01
16	5,16	5,16	0,01	0,01
24	4,98	5,04	0,00	0,02
32	5,22	5,26	0,00	0,01
40	5,01	4,93	0,02	0,02
48	5,01	4,92	0,00	0,01
56	5,06	5,04	0,01	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba5-Lm3 Lm Compet 20°C

Temps (h)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,39	3,42	0,02	0,05
2	3,37	3,44	0,01	0,01
8	3,38	3,47	0,02	0,00
16	3,35	3,37	0,01	0,01
24	3,40	3,40	0,00	0,01
32	3,46	3,45	0,01	0,00
40	3,45	3,43	0,00	0,01
48	3,42	3,40	0,00	0,00
56	3,43	3,44	0,01	0,00

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba3-Lm3 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,06	3,10	0,02	0,06
1	3,10	3,09	0,02	0,04
2	2,88	3,13	0,03	0,02
3	2,78	3,11	0,05	0,06
4	2,66	3,10	0,09	0,07
5	2,58	3,06	0,03	0,03
6	2,89	3,06	0,04	0,04
7	2,91	3,02	0,05	0,01
8	2,94	3,06	0,02	0,03
9	2,88	3,06	0,05	0,03
10	2,89	3,05	0,01	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba3-Lm3 Lm Compet 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,35	3,37	0,02	0,00
1	3,38	3,43	0,02	0,02
2	3,74	3,58	0,04	0,03
3	5,11	4,17	0,02	0,01
4	6,12	5,05	0,01	0,04
5	7,32	6,20	0,01	0,01
6	8,44	7,09	0,01	0,01
7	9,26	7,91	0,01	0,01
8	9,37	9,07	0,02	0,00
9	9,12	9,10	0,01	0,02
10	9,08	9,02	0,00	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba5-Lm5 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,16	5,20	0,08	0,06
1	5,10	5,13	0,05	0,05
2	5,10	5,07	0,07	0,04
3	5,41	5,13	0,55	0,05
4	5,09	5,15	0,07	0,01
5	5,17	5,22	0,07	0,01
6	5,19	5,11	0,06	0,07
7	5,09	5,11	0,05	0,07
8	5,06	5,07	0,03	0,06
9	5,07	5,12	0,04	0,03
10	5,08	5,12	0,01	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba5-Lm5 Lm Compet 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,38	5,39	0,01	0,03
1	5,38	5,35	0,02	0,08
2	5,21	5,22	0,02	0,03
3	4,94	5,03	0,07	0,04
4	4,82	4,92	0,13	0,13
5	4,24	4,29	0,06	0,11
6	4,34	4,37	0,01	0,09
7	4,32	4,34	0,00	0,06
8	4,36	4,26	0,01	0,05
9	4,39	4,23	0,02	0,07
10	4,39	4,23	0,02	0,09

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba3-Lm5 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,42	3,41	0,02	0,05
1	3,46	3,43	0,01	0,04
2	3,42	3,41	0,02	0,01
3	3,38	3,37	0,01	0,02
4	3,35	3,35	0,01	0,01
5	3,33	3,30	0,00	0,01
6	3,32	3,28	0,02	0,04
7	3,38	3,33	0,01	0,01
8	3,32	3,31	0,01	0,01
9	3,29	3,34	0,01	0,01
10	3,25	3,24	0,03	0,04

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba3-Lm5 Lm Compet 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,51	5,54	0,03	0,06
1	6,08	5,59	0,04	0,04
2	6,85	5,87	0,06	0,07
3	7,83	6,64	0,04	0,04
4	8,70	7,35	0,03	0,07
5	8,92	8,22	0,02	0,02
6	9,42	8,74	0,04	0,12
7	9,17	9,10	0,04	0,05
8	9,12	9,09	0,01	0,02
9	9,12	8,99	0,04	0,03
10	9,07	8,91	0,01	0,05

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba Compet Ba5-Lm3 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	5,39	5,41	0,04	0,01
1	5,41	5,45	0,04	0,01
2	5,35	5,36	0,02	0,03
3	5,31	5,25	0,01	0,02
4	5,23	5,16	0,03	0,02
5	5,16	5,10	0,04	0,03
6	5,13	5,15	0,01	0,04
7	5,14	5,11	0,03	0,01
8	5,13	5,13	0,03	0,01
9	5,15	5,12	0,04	0,01
10	5,13	5,14	0,02	0,01

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba5-Lm3 Lm Compet 10°C

Temps (j)	Log(10)	Log(10)	EC	EC
	AA	SA	AA	SA
0	3,61	3,59	0,03	0,01
1	3,25	3,38	0,01	0,01
2	2,90	2,94	0,05	0,02
3	1,89	2,35	0,15	0,06
4	SSD	1,94	NA	0,21
5	SSD	SSD	NA	NA
6	SSD	SSD	NA	NA
7	SSD	SSD	NA	NA
8	SSD	SSD	NA	NA
9	SSD	SSD	NA	NA
10	SSD	SSD	NA	NA

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation, EC = Ecart-type,
SSD = Sous le seuil de detection et NA = Non applicable

Annexe D : Données des courbes de pH en culture pure.

<i>Ba pure Ba3 30°C</i>				
Temps (h)	AA	SA	EC	EC
	pH	pH	AA	SA
0	7,66	7,51	0,10	0,07
2	7,64	7,50	0,10	0,08
4	7,63	7,49	0,09	0,08
6	7,63	7,49	0,09	0,07
8	7,61	7,48	0,07	0,08
10	7,58	7,45	0,07	0,10
12	7,52	7,43	0,09	0,05
14	7,10	7,38	0,09	0,00
16	6,89	7,14	0,05	0,10
18	6,61	6,81	0,10	0,14
20	6,48	6,54	0,05	0,11
22	6,45	6,46	0,05	0,07
24	6,45	6,37	0,01	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

<i>Lm pure Lm3 30°C</i>				
Temps (h)	AA	SA	EC	EC
	pH	pH	AA	SA
0	7,67	7,65	0,01	0,01
2	7,68	7,65	0,01	0,00
4	7,66	7,66	0,02	0,01
6	7,65	7,64	0,02	0,00
8	7,63	7,63	0,05	0,00
10	7,60	7,58	0,04	0,02
12	7,59	7,55	0,05	0,01
14	7,34	6,63	0,01	0,00
16	6,44	6,05	0,15	0,03
18	5,94	5,67	0,02	0,03
20	5,59	5,38	0,01	0,02
22	5,57	5,26	0,01	0,02
24	5,56	5,17	0,01	0,03

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba pure Ba5 30°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,59	7,51	0,03	0,08
2	7,59	7,49	0,03	0,13
4	7,59	7,47	0,05	0,11
6	7,62	7,48	0,08	0,11
8	7,58	7,48	0,02	0,10
10	7,56	7,49	0,01	0,10
12	7,55	7,48	0,00	0,11
14	7,56	7,49	0,01	0,11
16	7,52	7,46	0,03	0,10
18	7,52	7,41	0,00	0,08
20	7,45	7,41	0,01	0,10
22	7,32	7,38	0,02	0,15
24	7,12	7,32	0,09	0,18

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Lm pure Lm5 30°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,56	7,55	0,12	0,14
2	7,51	7,55	0,10	0,16
4	7,49	7,52	0,11	0,15
6	7,48	7,49	0,13	0,14
8	7,41	7,43	0,21	0,17
10	6,82	6,72	0,03	0,06
12	6,48	6,03	0,15	0,37
14	5,85	5,74	0,26	0,42
16	5,62	10,81	0,09	0,33
18	5,53	5,26	0,02	0,11
20	5,50	5,21	0,01	0,04
22	5,54	5,17	0,01	0,03
24	5,55	5,16	0,01	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba pure Ba3 20°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,65	7,67	0,06	0,03
2	7,72	7,68	0,07	0,02
8	7,65	7,68	0,05	0,02
16	7,67	7,66	0,04	0,01
24	7,64	7,65	0,04	0,02
32	7,65	7,61	0,04	0,04
40	7,63	7,38	0,04	0,21
48	7,55	7,33	0,05	0,21
56	7,50	7,29	0,03	0,18

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Lm pure Lm3 20°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,69	7,67	0,04	0,05
2	7,67	7,67	0,04	0,04
8	7,65	7,65	0,04	0,05
16	7,69	7,67	0,03	0,01
24	7,65	7,64	0,03	0,02
32	7,44	7,53	0,14	0,16
40	6,77	6,89	0,56	0,70
48	5,96	5,77	0,18	0,39
56	5,80	5,32	0,08	0,09

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba pure Ba5 20°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,64	7,65	0,04	0,06
2	7,64	7,64	0,03	0,04
8	7,65	7,62	0,04	0,01
16	7,66	7,66	0,04	0,03
24	7,65	7,64	0,06	0,03
32	7,63	7,62	0,03	0,04
40	7,65	7,66	0,02	0,03
48	7,64	7,64	0,01	0,02
56	7,67	7,66	0,02	0,03

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

<i>Lm pure Lm5 20°C</i>				
	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,67	7,66	0,05	0,03
2	7,65	7,65	0,05	0,04
8	7,64	7,64	0,04	0,05
16	7,62	7,65	0,05	0,05
24	6,80	6,75	0,29	0,53
32	6,21	5,67	0,39	0,36
40	5,92	5,35	0,15	0,16
48	5,74	5,25	0,04	0,05
56	5,72	5,27	0,02	0,09

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

<i>Ba pure Ba3 10°C</i>				
	AA	SA	EC	EC
Temps (j)	pH	pH	AA	SA
0	7,45	7,45	0,00	0,01
1	7,44	7,43	0,02	0,02
2	7,46	7,47	0,01	0,01
3	7,46	7,43	0,02	0,01
4	7,47	7,46	0,01	0,01
5	7,48	7,43	0,03	0,01
6	7,46	7,44	0,01	0,00
7	7,46	7,45	0,03	0,02
8	7,50	7,45	0,06	0,01
9	7,51	7,61	0,13	0,03
10	7,49	7,52	0,04	0,05

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Lm pure Lm3 10°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (j)	pH	pH	AA	SA
0	7,34	7,34	0,08	0,07
1	7,29	7,28	0,05	0,04
2	7,27	7,26	0,06	0,04
3	7,21	7,22	0,03	0,03
4	6,87	6,92	0,07	0,10
5	6,26	6,46	0,06	0,07
6	6,05	6,03	0,06	0,03
7	5,99	5,55	0,03	0,02
8	5,91	5,37	0,01	0,05
9	5,85	5,23	0,03	0,01
10	5,77	5,20	0,06	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Ba pure Ba5 10°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (j)	pH	pH	AA	SA
0	7,43	7,44	0,00	0,01
1	7,42	7,45	0,00	0,00
2	7,43	7,47	0,01	0,02
3	7,41	7,46	0,04	0,01
4	7,43	7,48	0,00	0,01
5	7,43	7,50	0,01	0,01
6	7,44	7,50	0,01	0,03
7	7,43	7,46	0,01	0,01
8	7,44	7,45	0,00	0,01
9	7,52	7,57	0,07	0,08
10	7,46	7,45	0,02	0,11

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Temps (j)	AA	<i>Lm pure Lm5 10°C</i>		EC
	pH	SA	EC	SA
0	7,4	7,4	0,1	0,2
1	7,3	7,4	0,1	0,3
2	7,3	7,4	0,1	0,3
3	7,3	7,4	0,1	0,3
4	7,0	7,2	0,4	0,5
5	6,6	6,9	0,6	0,7
6	6,2	6,6	0,6	1,0
7	5,9	6,0	0,2	0,7
8	5,9	5,6	0,2	0,5
9	5,8	5,4	0,1	0,2
10	5,8	5,3	0,1	0,2

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Annexe E : Données des courbes de pH en compétition.

Compet <i>Ba3-Lm3</i> 30°C				
Temps (h)	AA	SA	EC	EC
	pH	pH	AA	SA
0	7,68	7,54	0,01	0,01
2	7,68	7,55	0,01	0,01
4	7,68	7,46	0,00	0,01
6	7,67	7,47	0,00	0,00
8	7,64	7,45	0,05	0,00
10	7,61	7,43	0,03	0,00
12	7,54	7,42	0,00	0,00
14	6,95	7,55	0,01	0,05
16	6,84	7,34	0,01	0,00
18	6,56	7,04	0,01	0,01
20	6,54	6,83	0,00	0,01
22	6,41	6,66	0,01	0,01
24	6,39	6,57	0,01	0,00

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet <i>Ba5-Lm5</i> 30°C				
Temps (h)	AA	SA	EC	EC
	pH	pH	AA	SA
0	7,60	7,50	0,06	0,07
2	7,61	7,43	0,07	0,06
4	7,60	7,39	0,07	0,05
6	7,61	7,39	0,09	0,03
8	7,59	7,39	0,09	0,01
10	7,46	7,36	0,02	0,01
12	7,44	7,34	0,02	0,01
14	7,39	7,32	0,02	0,01
16	7,38	7,25	0,03	0,05
18	7,22	6,96	0,15	0,03
20	6,92	6,29	0,03	0,08
22	6,47	5,65	0,12	0,03
24	6,10	5,36	0,08	0,07

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba3-Lm5* 30°C

Temps (h)	AA	SA	EC	EC
	pH	pH	AA	SA
0	7,457	7,448	0,076	0,012
2	7,452	7,480	0,071	0,057
4	7,457	7,442	0,084	0,052
6	7,413	7,430	0,084	0,027
8	7,403	7,360	0,063	0,049
10	7,325	7,330	0,042	0,011
12	7,109	7,256	0,081	0,057
14	6,600	7,236	0,061	0,036
16	6,497	7,064	0,047	0,082
18	6,415	6,608	0,087	0,118
20	6,352	6,479	0,036	0,065
22	6,373	6,393	0,017	0,081
24	6,357	6,298	0,026	0,165

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba5-Lm3* 30°C

Temps (h)	AA	SA	EC	EC
	pH	pH	AA	SA
0	7,63	7,58	0,02	0,03
2	7,55	7,56	0,02	0,02
4	7,56	7,55	0,03	0,02
6	7,53	7,54	0,01	0,01
8	7,53	7,53	0,00	0,01
10	7,53	7,50	0,01	0,03
12	7,53	7,53	0,00	0,01
14	7,52	7,52	0,01	0,00
16	7,47	7,47	0,01	0,01
18	7,41	7,44	0,01	0,01
20	7,30	7,42	0,03	0,02
22	6,89	7,33	0,01	0,04
24	6,71	7,21	0,02	0,05

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba3-Lm3* 20°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,64	7,70	0,08	0,03
2	7,64	7,69	0,06	0,02
8	7,63	7,67	0,04	0,02
16	7,66	7,67	0,04	0,02
24	7,62	7,67	0,04	0,03
32	7,64	7,58	0,03	0,05
40	7,51	7,30	0,04	0,32
48	7,10	6,97	0,19	0,20
56	6,80	6,54	0,14	0,28

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba5-Lm5* 20°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,64	7,66	0,02	0,03
2	7,64	7,65	0,01	0,03
8	7,64	7,63	0,01	0,01
16	7,63	7,64	0,02	0,03
24	7,63	7,64	0,02	0,05
32	7,62	7,62	0,02	0,02
40	7,61	7,62	0,03	0,03
48	7,60	7,63	0,04	0,05
56	7,59	7,62	0,08	0,05

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba3-Lm5* 20°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,62	7,61	0,07	0,06
2	7,62	7,61	0,08	0,06
8	7,62	7,61	0,09	0,07
16	7,58	7,58	0,08	0,07
24	6,98	7,14	0,05	0,13
32	6,08	5,99	0,04	0,23
40	5,85	5,45	0,08	0,03
48	5,73	5,29	0,10	0,07
56	5,71	5,22	0,12	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba5-Lm3* 20°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (h)	pH	pH	AA	SA
0	7,59	7,58	0,06	0,06
2	7,58	7,59	0,05	0,05
8	7,58	7,58	0,05	0,04
16	7,58	7,57	0,04	0,03
24	7,56	7,53	0,04	0,03
32	7,55	7,53	0,03	0,00
40	7,55	7,55	0,02	0,01
48	7,55	7,55	0,03	0,01
56	7,56	7,54	0,03	0,02

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba3-Lm3* 10°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (j)	pH	pH	AA	SA
0	7,44	7,42	0,01	0,01
1	7,44	7,40	0,00	0,00
2	7,31	7,32	0,04	0,02
3	7,14	7,22	0,05	0,04
4	6,88	7,02	0,04	0,15
5	6,36	6,59	0,06	0,13
6	6,13	6,04	0,05	0,03
7	6,03	5,64	0,06	0,04
8	5,92	5,44	0,04	0,11
9	5,87	5,35	0,01	0,09
10	5,84	5,27	0,01	0,06

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba5-Lm5* 10°C

Temps (j)	AA	SA	EC	EC
	pH	pH	AA	SA
0	7,43	7,45	0,02	0,02
1	7,43	7,45	0,01	0,01
2	7,42	7,44	0,01	0,01
3	7,42	7,44	0,01	0,03
4	7,43	7,48	0,00	0,05
5	7,42	7,44	0,02	0,01
6	7,42	7,43	0,01	0,00
7	7,44	7,46	0,00	0,01
8	7,44	7,45	0,02	0,00
9	7,44	7,44	0,01	0,01
10	7,45	7,46	0,01	0,01

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba3-Lm5* 10°C

Temps (j)	AA	SA	EC	EC
	pH	pH	AA	SA
0	7,54	7,48	0,12	0,02
1	7,51	7,44	0,17	0,02
2	7,59	7,49	0,12	0,02
3	7,54	7,45	0,00	0,01
4	7,08	7,44	0,03	0,00
5	6,65	6,92	0,05	0,04
6	6,42	6,21	0,02	0,02
7	6,28	5,73	0,04	0,05
8	6,08	5,53	0,07	0,06
9	6,04	5,31	0,03	0,01
10	6,04	5,26	0,01	0,04

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type

Compet *Ba5-Lm3* 10°C

	AA	SA	EC	EC
Temps (j)	pH	pH	AA	SA
0	7,46	7,41	0,02	0,02
1	7,50	7,41	0,02	0,01
2	7,47	7,40	0,03	0,01
3	7,49	7,42	0,01	0,00
4	7,51	7,42	0,01	0,01
5	7,50	7,42	0,01	0,00
6	7,49	7,43	0,02	0,01
7	7,46	7,44	0,01	0,00
8	7,44	7,45	0,02	0,01
9	7,44	7,46	0,01	0,01
10	7,44	7,44	0,01	0,01

Avec AA = Avec Agitation, SA = Sans Agitation et EC = Ecart-type