

**IFREMER**

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer  
Rue de l'Île d'Yeu - B.P. 1049  
44037 Nantes cedex 01  
Tél. 40 37 40 00  
Fax 40 37 40 01

**UTILISATION DE LA SOUCHE DE BACTERIE LACTIQUE  
*CARNOBACTERIUM DIVERGENS* V41, PRODUCTRICE DE  
BACTERIOCINES, POUR INHIBER LES LISTERIA DANS LE  
SAUMON FUME**

OLLIER Thérèse  
Promotion 1991-1994

Mémoire INGENIEUR ENITIAA  
Septembre 1994

École Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires

Domaine de la Géraudière - 44072 NANTES CEDEX 03  
Tél. 40 40 03 00 - Fax: 40 59 63 36

Ministère de l'agriculture et de la forêt

**NOM AUTEUR DU MEMOIRE**  
Adresse personnelle

Therèse OLLIER

**NOM DU TUTEUR**  
ENITIAA

X. DOUSSET

**NOM DU MAITRE DE STAGE**  
ENTREPRISE

F. LEROY  
- IFREMER - Nantes

**TITRE DE L'ETUDE** Utilisation de la souche de bactérie lactique  
*Carosobacterium divergens* V41, productrice de bactériocines, pour inhiber  
*Listeria* dans le saumon fumé.

**CONFIDENTIALITE**

**RESUME**

**MOTS CLES** saumon fumé - conservation - bactériocine - *Listeria*.

**APPRECIATION DU MEMOIRE**

	Excellent	Bien	A. Bien	Moyen	Médiocre
FOND		X			
FORME		X			
RESUME		X			
BIBLIOGRAPHIE		X			

N.B. : Cette page sera agrafée dans l'exemplaire original conservé à la bibliothèque.

## RESUME

*Carnobacterium divergens* V41, isolée de viscères de saumon, produit une bactériocine, la divercine V41, capable d'inhiber la croissance des *Listeria* et notamment *Listeria monocytogenes*, une bactérie pathogène pour l'homme.

L'effet de l'addition de la divercine V41 ou de *Carnobacterium divergens* V41 sur le devenir de *Listeria innocua* et *L. monocytogenes* Scott A, inoculées dans de la chair de saumon fumé broyée, a été suivi pendant un stockage de 10 à 20 jours à 8 °C, en conditionnement sous-vide.

*L. innocua* S (isolée du saumon fumé) et *L. monocytogenes* Scott A se développent respectivement de 1.5 à 2 Log UFC/g après 20 jours et 2.5 Log UFC/g après 10 jours de stockage à 8°C.

Le surnageant de culture de *Cb. divergens* V41, ajouté au taux de 5%, inhibe le développement de *L. innocua* S inoculée au taux de  $10^5$  UFC/g environ et dans une moindre proportion celui de *L. monocytogenes*.

La culture de *Cb. divergens* V41 (cellules + bactériocines) possède également cette activité inhibitrice vis-à-vis de *L. innocua* S. Dans ce cas, les bactéries sont capables de synthétiser la bactériocine au cours du stockage de la chair de saumon fumé.

Par contre, lorsque les cellules sont lavées et inoculées dans la chair de saumon, elles ne semblent pas capables de produire la divercine et n'inhibent pas le développement de *L. innocua* S.

Sur filet entier de saumon fumé, la population de *L. innocua* S inoculée au taux de  $10^4$  UFC/g, décroît en 24 heures de 0.8 Log UFC/g en présence d'une culture de cellules de *Cb. divergens* V41. Ensuite, pendant les 20 jours de stockage ultérieur, *L. innocua* S ne se développe pas dans le filet.

## SUMMARY

*Carnobacterium divergens* V41, isolated from viscera of salmon, produces a bacteriocin, the divercin V41, which is able to inhibit the growth of the Listeria and particularly *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen for human beings.

The effect of the addition of divercin V41 or *Carnobacterium divergens* V41 on the behaviour of *L. innocua* and *L. monocytogenes* Scott A inoculated in pummeled smoked salmon was studied during 10 to 20 days storage at 8°C in vacuum-sealed packages.

*L. innocua* S (isolated from smoked salmon) and *L. monocytogenes* Scott A populations increase by 1.5 to 2 Log CFU/g, after 20 days and by 2.5 Log CFU/g after 10 days of storage at 8°C, respectively.

The supernatant of the fermentation of *Cb. divergens* V41 added at the rate of 5% inhibits the growth of *L. innocua* S originally inoculated with about  $10^5$  CFU/g and in a lesser proportion this of *L. monocytogenes* Scott A.

The culture of *Cb. divergens* V41 (cells + bacteriocins) has also the same inhibitory activity against *L. innocua* S. In this case, it was found that the bacteria are able to synthesize bacteriocins during the storage of the salmon's flesh.

Nevertheless, when the cells are washed and inoculated in the smoked salmon, they seem unable to produce divercin V41 and they cannot inhibit the growth of *L. innocua* S.

On smoked salmon slice, the *L. innocua* S population originally inoculated with  $10^4$  CFU/g decrease by 0.8 Log CFU/g during 24 hours, in the presence of a culture of *Cb. divergens* V41. Then, during the next 20 days of storage, *L. innocua* S do not increase in the fillet.

# SOMMAIRE

## REMERCIEMENTS

## OBJECTIFS

## INTRODUCTION

1

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2

### 1. Microbiologie des produits de la mer et du poisson fumé

3

#### 1. 1. La flore du poisson frais

3

##### 1. 1. 1. Flore de la peau et du mucus

3

##### 1. 1. 2. Flore intestinale du poisson frais

3

##### 1. 1. 3. Flore du muscle de poisson frais

3

#### 1. 2. La flore du poisson fumé

4

##### 1. 2. 1. Action du sel

4

##### 1. 2. 2. Action du fumage

4

### 2. Altération des produits marins

5

#### 2. 1. Phénomènes biochimiques

5

#### 2. 2. Phénomènes microbiologiques

5

### 3. *Listeria*

6

#### 3. 1. Caractéristiques

6

#### 3. 2. *Listeria* : un germe pathogène

7

#### 3. 3. Impact économique de la présence de *Listeria* dans les produits de la mer

8

#### 3. 4. *Listeria monocytogenes* dans le poisson fumé

8

### 4. Utilisation de bactériocines pour lutter contre *Listeria*

10

#### 4. 1. Les bactéries lactiques

10

##### 4. 1. 1. Classification des bactéries lactiques

10

##### 4. 1. 2. Les CARNOBACTERIUM

11

##### 4. 1. 3. Les différents modes d'actions inhibiteurs des bactéries lactiques

11

#### 4. 2. Les bactériocines

12

##### 4. 2. 1. Définition

12

##### 4. 2. 2. Les différentes classes de bactériocines

13

##### 4. 2. 3. Déterminants génétiques

13

##### 4. 2. 4. Mode d'action des bactériocines

13

##### 4. 2. 5. Les bactériocines anti-*Listeria*

14

<b>MATERIEL ET METHODES</b>	16
<b>1. Matériels et micro-organismes utilisés</b>	17
1. 1. Micro-organismes	17
1. 2. Préparation de l'inoculum de la souche cible	17
1. 3. Milieux de culture et techniques de dénombrement	18
1. 3. 1. Milieux utilisés	18
1. 3. 2. Techniques de dénombrement	19
<b>2. Production et prépurification de la bactériocine, produite par <i>Carnobacterium divergens</i> V41 en fermenteur</b>	20
2. 1. Préparation des pré cultures	20
2. 2. Culture en fermenteur et traitement du surnageant	21
2. 3. Préparation de la suspension de culture lavée	22
2. 4. Précipitation des bactériocines	22
2. 5. Méthode de titration de l'activité de la bactériocine	22
2. 5. 1. Préparation de l'échantillon	22
2. 5. 2. Réalisation du dosage	22
2. 5. 3. Lecture de la titration en bactériocines	23
<b>3. Méthode de sélection, d'isolement et d'identification des <i>Listeria</i></b>	24
3. 1. Sélection et isolement des colonies	24
3. 2. Coloration de Gram	24
3. 3. Recherche de la catalase	24
3. 4. Recherche de l'oxydase	24
3. 5. Test de CAMP	25
3. 6. Galerie API- <i>Listeria</i>	26
3. 7. Culture à basse température ( 8°C)	26
<b>4. Méthodes utilisées pour mettre en évidence l'activité inhibitrice des bactériocines sur les <i>Listeria</i> dans le saumon fumé broyé</b>	26
4. 1. Préparation de l'échantillon du saumon fumé	26
4. 2. Inoculation des échantillons	27
4. 3. Préparation des échantillons	27
4. 3. 1 Tests d'implantation	27
4. 3. 2 Tests d'inhibition	28
4. 4. Analyse des échantillons	28
4. 5. Plan de prélèvement des échantillons	29
4. 5. 1. Temps de prélèvement	29
4. 5. 2. Plan d'échantillonnage	29
<b>5. Méthodes utilisées pour mettre en évidence l'activité inhibitrice des bactériocines sur les <i>Listeria</i> dans le filet entier de saumon fumé</b>	30
5. 1. Préparation des échantillons	30
5. 2. Inoculation des échantillons	30

<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	31
<b>A - IDENTIFICATION D'UNE SOUCHE ET CARACTERISTIQUES DU SAUMON FUME</b>	32
<b>1. Identification et caractérisation</b>	32
<b>2. Caractéristiques du saumon fumé</b>	32
2. 1. Composition	32
2. 2. Flore totale des échantillons	33
<b>B - EXPERIENCES SUR SAUMON FUME</b>	34
<b>1. Tests d'implantation</b>	34
<b>2. Tests d'inhibition</b>	35
2. 1. Inhibition de <i>Listeria innocua</i> F dans le saumon fumé	35
2. 1. 1. Chair broyée dans du tryptone-sel à 3% de NaCl	35
2. 1. 2. Chair broyée dans de l'eau peptonée (0% de NaCl)	36
2. 2. Inhibition de <i>Listeria innocua</i> S dans le saumon fumé	37
2. 2. 1. Chair broyée dans de l'eau peptonée	37
2. 2. 1. 1. Par ajout de surnageant de culture	37
2. 2. 1. 2. Par ajout de culture	39
2. 2. 1. 3. Par ajout de culture ou par ajout de cellules lavées	40
2. 2. 1. 4. Par ajout de précipité non-dialysé	42
2. 2. 2. Sur filet entier, par ajout de culture	43
2. 3. Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A dans le saumon fumé	45
2. 3. 1. Par ajout de surnageant de culture	45
2. 3. 2. Par ajout de culture	46
<b>CONCLUSION</b>	47
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	49
<b>ANNEXES</b>	54

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée au cours de mon travail, en particulier :

Monsieur VALLET, pour m'avoir confiée ce projet,

Monsieur MESCLE, responsable du laboratoire de microbiologie de l'ENITIAA, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et conseillée pendant l'étude,

Monsieur DOUSSET, pour son encadrement, son aide et ses conseils tout au long de ce stage,

Madame LEROI, pour ses conseils sur la démarche de l'étude,

Madame ROUAUD, pour nous avoir accueillis dans son laboratoire de la DSV de Nantes,

Daniel IVANOV, étudiant de l'Université de Sofia qui a mené cette étude avec moi, pour sa grande disponibilité et sa collaboration tout au long de ce travail,

Marie-France PILET et Bruno MEIGNEN, pour leurs conseils et leur disponibilité,

Marie-France BREUIL, pour son accueil et sa collaboration,

Dominique MITARD, pour sa disponibilité et son aide technique,

ainsi que tout le personnel technique des laboratoires de microbiologie de l'ENITIAA et de la DSV de Nantes.



## OBJECTIFS

Cette étude est intégrée dans un programme de recherches plus vaste sur la conservation du poisson mettant en oeuvre des bactéries lactiques. Ce programme FAR (Fisheries and Aquaculture Research programme) dans le domaine de la pêche et de l'aquaculture est financé par la CEE. D'une durée de 3 ans (1992-1994), le contrat FAR regroupe 3 partenaires :

- l'Université de Technologie de Loughborough (Angleterre)
- l'IFREMER de Nantes
- l'ENITIAA de Nantes

Les objectifs du contrat sont l'isolement, la sélection et l'adaptation de souches de bactéries lactiques d'origine marine en vue d'augmenter la durée de conservation des poissons et produits à base de poisson.

Les objectifs sont **scientifiques** (connaissance de la nature des bactéries lactiques d'origine marine), **techniques** (méthodes d'application et conséquences de l'utilisation de bactéries lactiques dans les produits marins) et **économiques** (la méthode peut-elle remplacer ou améliorer le stockage au froid?).

Au cours de la troisième et dernière année du contrat, l'ENITIAA a jugé qu'il fallait compléter et approfondir les travaux sur les propriétés inhibitrices des bactéries lactiques. L'IFREMER ayant déjà travaillé sur l'augmentation de la conservation du saumon fumé par des bactéries lactiques, en inhibant **la flore d'altération**, le problème nouveau dans ce contrat était la recherche d'une amélioration d'ordre sanitaire en inhibant **la flore pathogène**.

Ainsi, il était intéressant de travailler sur l'utilisation de *Carnobacterium divergens* V41, souche isolée et caractérisée auparavant, dans une précédente recherche du laboratoire de l'ENITIAA. Celle-ci produit une bactériocine active contre *Listeria*.

Les objectifs à plus long terme sont d'utiliser ces résultats pour la mise en oeuvre de nouvelles techniques de conservation permettant de prolonger la durée de vie du poisson fumé, tout en conservant ses qualités et celles organoleptiques en particulier.

## INTRODUCTION

Les produits de la mer sont des denrées très périssables car ils possèdent :

- une teneur en eau élevée,
- davantage de composés azotés non-protéiques,
- un pH ultime élevé ( de 6,1 à 6,5) selon les espèces.

Par ailleurs, le poisson frais représente en France 70% des tonnages du poisson commercialisé. Les qualités nutritionnelles et diététiques font du poisson frais un produit à valeur ajoutée appréciable. L'état de fraîcheur constitue le principal critère d'appréciation de sa valeur marchande.

Malheureusement, le poisson subit dès sa capture des altérations d'origine bactérienne et enzymatique qui peuvent compromettre sa qualité commerciale et hygiénique.

Réduire ou retarder les processus d'altération est un avantage économique certain. C'est le but fondamental des différentes méthodes de conservation mises en oeuvre à différents stades de la filière du produit. Elles portent dans un premier temps sur la réduction de la contamination, ensuite sur l'inhibition de la croissance des bactéries restantes.

Le fumage est l'un des procédés de conservation les plus anciens. Il n'a d'effet conservateur que s'il est associé au salage et au séchage ; ainsi seul les poissons très salés, très secs et fortement fumés sont aptes à se conserver tels quels.

Aujourd'hui le but du fumage n'est plus tant d'assurer une longue conservation que de donner une couleur et un goût. De ce fait un impératif s'ajoute au traitement : celui de réfrigérer.

Les technologies actuelles de conservation sous-vide, en atmosphère modifiée ou l'utilisation d'agents physico-chimiques n'ont pas encore donné une entière satisfaction. Ceci justifie les études qui sont entreprises dans la recherche d'agents biologiques qui éviteraient l'ajout d'additifs dans le poisson frais tout en assurant sa plus longue conservation.

Les bactéries lactiques représentent une méthode biologique de préservation des aliments par leur capacité à inhiber la flore d'altération. Cette action inhibitrice est bien connue dans l'industrie agro-alimentaire.

Parmi les substances inhibitrices produites par les bactéries lactiques, les bactériocines sont des peptides susceptibles d'être utilisés pour la préservation des produits alimentaires.

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# 1 MICROBIOLOGIE DES PRODUITS DE LA MER ET DU POISSON FUME

Les produits de la mer représentent un groupe de denrées caractérisé par une diversité et une multiplicité impressionnantes des espèces. La composition de la chair de poisson varie selon l'âge, le sexe, l'année, le lieu, la saison de pêche et la partie musculaire considérée. Les organes consommables se composent de 75% d'eau, de 19% de protéines, de 5% de lipides et de 1,2% de cendres.

## 1-1 LA FLORE DU POISSON FRAIS

### 1-1-1 Flore de la peau et du mucus

La composition et la consistance semi-liquide du mucus en font un milieu de culture particulièrement adapté aux bactéries marines. Mais aussitôt après la mort, le mucus subit une prolifération bactérienne dont la charge peut varier de l'ordre de  $10^2$  à  $10^7$  germes /  $cm^2$  (ICMSF, 1985). Les germes dominants appartiennent aux genres : *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Cytophaga* et *Vibrio* (ICMSF, 1985).

### 1-1-2 Flore intestinale du poisson frais

Celle-ci est fonction de l'activité alimentaire du poisson. En période de nutrition, l'intestin contient une flore importante et variée. La charge bactérienne, par gramme de fécès, peut atteindre  $10^3$  à  $10^9$ .

Les bactéries intestinales des poissons vivant près des côtes, comprennent des représentants des genres spécifiquement intestinaux : *Escherichia coli*, *Aerobacter*, *Shigella* (SOUDAN, 1950, LISTON, 1980, HODGKISS, 1982).

La présence d'anaérobies stricts est assez fréquente comme *Clostridium perfringens*. On note toutefois que ce germe est assez rare dans le poisson capturé au large.

### 1-1-3 Flore du muscle de poisson frais

Le muscle du poisson vivant est stérile. Mais dès le début des phénomènes d'altération, il tend à être contaminé par toutes les bactéries communes de la peau, du mucus et des intestins. Le réseau circulatoire serait une voie d'infection. La présence bactérienne, longtemps limitée en surface, ne se propage pas seulement à partir de la peau, mais essentiellement à partir de la cavité viscérale à l'aide des vaisseaux sanguins.

On peut considérer que les bactéries Gram négatif constituent la fraction dominante de la flore naturelle du poisson. *Pseudomonas* et *Alcaligenes*, mais aussi *Vibrio* et à un certain degré, les genres *Flavobacterium*, *Micrococcus* et *Bacillus* sont les taxons les plus fréquents chez les poissons marins.

Le muscle du poisson commercialisé est aussi contaminé par des bactéries Gram positif mésophiles.

Les poissons pêchés ne portent que très rarement des bactéries pathogènes pour l'homme hormis *Clostridium botulinum* et *Vibrio parahaemolyticus*, contaminants naturels du poisson qui sont susceptibles de se développer si les conditions d'hygiène ne sont pas respectées (LISTON, 1980). En revanche, ils sont contaminés dès leur capture par contact avec les surfaces, le matériel et par rupture de la chaîne du froid.

## 1-2 LA FLORE DU POISSON FUME

Les données sur la flore du poisson fumé sont difficiles à trouver car les documents sont peu nombreux.

### 1-2-1 Action du sel

Le sel utilisé pour les saumures ou pour le salage au sel sec a une charge moyenne de  $10^1$  à  $10^3$  germes/g (BAIN et coll., 1958). De plus, le sel marin comporte naturellement un grand nombre d'halophiles contrairement aux autres sels qui n'en ont pas. Mais ce groupe de micro-organismes n'est pas important dans le poisson fumé parce que le taux de sel présent à la surface du poisson n'est pas suffisant pour permettre sa croissance (SHEWAN, 1949). Les bactéries que l'on trouve dans le sel sont *Bacillus*, principalement *Bacillus megatherium* et *B. subtilis* ainsi que *Micrococcus* et *Sarcina*.

Les saumures légères n'ont généralement pas d'effet sur le nombre de bactéries présentes sur le poisson et on peut même constater une augmentation de la charge bactérienne après utilisation d'une "vieille" saumure. Seules les premières saumures ont un effet, en particulier, sur la réduction de la population de *Pseudomonas*.

### 1-2-2 Action de la fumée

Le fumage à froid (28 à 32 °C) ne modifie pas les protéines tandis que le fumage à chaud (65 à 75 °C) est à l'origine de la coagulation des protéines (SAINCLIVIER, 1983).

La flore totale est affectée par l'addition de sel et le processus de fumage. En effet, la fumée contient de nombreux composés volatils tels que : formol, acide acétique, acétaldéhyde, acétone, phénols et polyphénols, qui apportent à la fois couleur, arôme et pouvoir aseptique.

DODDS, BRODSKY et WARBURTON (1992) ont comparé la flore des poissons prêts-à-consommer fumés à chaud et à froid ; il a été observé une importante variation de la flore totale initiale avec 77% des échantillons ayant une population microbienne inférieure à  $10^5$  UFC/g et 39% d'entre-eux avec une flore inférieure à  $10^3$  UFC/g.

Après un stockage de 30 jours à 4°C, 56% des échantillons avaient une flore totale de plus de  $10^7$  UFC/g, et 12% une flore inférieure à  $10^3$  UFC/g.

Tandis que les coliformes n'étaient pas détectés dans 70 des 100 échantillons au temps 0 et dans 66% de ceux-ci après 30 jours à 4°C, 4 échantillons avaient initialement plus de  $10^3$  coliformes/g et après 30 jours, 15 échantillons atteignaient ce niveau.

Dans cette étude, les auteurs soulignent que le fumage à chaud peut être une cause d'inhibition du développement bactérien mais celle-ci peut avoir pour origine la déshydratation de la surface, la présence de NaCl et des composants antiseptiques de la fumée

Les procédés de fumage à haute température sont recommandés pour la réduction des risques dus à *Clostridium botulinum*. Une température minimale interne de 65,5°C pendant 30 minutes est requise pour aider aussi à l'élimination des *Listeria*, *Salmonella* et *Staphylococcus*. Les produits fumés à froid doivent contenir des taux élevés de NaCl pour inhiber les bactéries.

Pendant le stockage du poisson fumé, les espèces de *Pseudomonas* augmentent au dépend des *corynéformes* et 70% de la flore est constituée de *Micrococcus* (STOREY et SPENCER, 1956, 1957). Il apparaîtrait que les lipides du poisson favoriseraient la survie des *Micrococcus* plus résistants.

## 2- ALTERATION DES PRODUITS MARINS

### 2-1 PHENOMENES BIOCHIMIQUES

Lors de sa capture, le poisson utilise une grande partie du glycogène. Une faible diminution du pH est observée suite à sa dégradation, en acide lactique en anaérobiose.

Après la mort, des séries de réactions enzymatiques aboutissent à l'apparition d'un grand nombre de composants de faible poids moléculaire, qui avec les autres composés extractibles, constituent les premiers substrats de la croissance bactérienne (inosine, ribosine, lactate, créatine) (SHEWAN, 1971). Ces réactions aboutissent à des changements organoleptiques indésirables après un temps variable selon la température de stockage (24 h à température ambiante, 2 semaines à 0°C).

### 2-2 PHENOMENES MICROBIOLOGIQUES

Il a été reconnu que les bactéries se développant à basse température (au dessous de 5°C) ont une aptitude à utiliser efficacement l'azote non-protéique. C'est certainement un des facteurs déterminants dans l'évolution de la flore du poisson.

Après une phase de latence correspondant à la rigor mortis, les bactéries vont se développer de façon exponentielle pour atteindre des populations de  $10^8$  à  $10^9$  germes / g de muscle après 8-10 jours à 0°C (SHEWAN, 1977).

L'activité bactérienne est essentiellement localisée sur la peau. La flore est composée de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* et de bactéries Gram +. Les germes les plus nombreux dans les premiers stades de la conservation appartiennent au genre *Micrococcus*. Au cours du temps, les cocci Gram + disparaissent.

STENSTROM (1990) a pu établir que la flore dominante, sur les poissons stockés à basse température, appartient aux genres *Schewanella* et *Pseudomonas* capables de se développer à basse température. L'espèce principale responsable de l'altération semble être *Schewanella putrefaciens* (anciennement *Pseudomonas putrefaciens*), capable de produire de l'H<sub>2</sub>S et de réduire l'oxyde de triméthylamine.

La dégradation bactérienne sur des filets, produit de l'ammoniaque, de l'hydrogène sulfuré, des mercaptans et des composés sulfurés diméthylés.

Les bactéries aérobies, qui se multiplient initialement en utilisant les sucres ( glucose, ribose ) et l'acide lactique comme source d'énergie, dégradent ces composés en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Il se crée à la surface du poisson des micro-régions partiellement anaérobies qui favorisent la croissance des germes anaérobies facultatifs. En l'absence d'O<sub>2</sub>, certaines bactéries anaérobies comme *Schewanella* peuvent réduire l'OTMA contenu dans la chair de poisson.

La disparition de l'OTMA après 7 jours de stockage en anaérobiose, permet aux bactéries anaérobies strictes de se développer, ce qui aboutit à une forte augmentation d'ammoniaque.

### 3- LISTERIA

#### 3-1 CARACTERISTIQUES (SEELIGER et JONES, 1940)

*Listeria* est un contaminant du milieu ambiant qu'on peut trouver dans l'eau froide, dans l'eau de mer ainsi que dans les produits marins.

*Listeria* est un bacille Gram positif non-sporulé, catalase +, oxydase -, aéro-anaérobie facultative. Elle croît entre 1 et 45°C et son optimum de croissance est entre 30 et 37°C.

Elle ne survit pas à un traitement thermique de 60°C pendant 30 minutes. Il a été montré expérimentalement que la pasteurisation "HT-ST" du lait (72°C / 15 sec) assure une réduction logarithmique de 8 (VEIT, 1993).

Elle pousse entre pH 6 et pH 9 et jusqu'à 10% de NaCl.

On distingue classiquement 7 espèces :

- *Listeria monocytogenes*
- *Listeria innocua*
- *Listeria ivanovii*
- *Listeria seeligeri*
- *Listeria welshimeri*
- *Listeria grayi*
- *Listeria murrayi*

Les seules espèces pathogènes sont *Listeria monocytogenes* (pour les animaux et l'homme) et *Listeria ivanovii* (responsable d'avortement seulement chez les animaux).

Les premiers sérovars ont été décrits en 1940 par Paterson. Les différentes associations de 5 antigènes flagellaires et 14 antigènes somatiques définissent 16 sérovars pour le genre *Listeria*. En dépit de la diversité des sérovars, les souches de *L. monocytogenes*, isolées chez l'homme, sont classées essentiellement dans les sérovars 1/2a, 1/2b et 4b ; plus précisément, environ deux tiers des souches responsables de cas sporadiques appartiennent au sérovar 4b, ainsi que la plupart des souches responsables d'épidémies (ROCOURT, 1989).

En revanche, il est étonnant de constater que la très grande majorité des souches de *Listeria monocytogenes* d'origine alimentaire est caractérisée par le sérogroupe 1/2 ( 94% en France).

### **3- 2 LISTERIA : UN GERME PATHOGENE**

Depuis quelques années, l'apparition de *Listeria monocytogenes* pose des problèmes aux industriels.

La listériose est une maladie qui peut atteindre l'homme et de très nombreuses espèces animales. Elle est connue sous deux formes cliniques principales :

- la listériose foeto-maternelle (60% des cas humains) qui se traduit par des avortements ou la naissance d'enfants atteints de septicémie ou de méningite.
- la listériose de l'adulte (40% des cas humains) qui se traduit par des septicémies ou des méningites.

La listériose est mortelle dans 30% des cas, malgré les traitements antibiotiques. On ne connaît pratiquement rien sur la dose infectieuse de *Listeria* chez l'homme. Cependant, elle est à rapporter à la sensibilité de l'hôte car les sujets immunodéprimés sont préférentiellement atteints.

Dans un extrait de la note de service du 16 novembre 1992 de la DGCCRF, il est noté que la limite entre l'acceptable et le risque pour le consommateur, d'après les données épidémiologiques publiées dans la littérature, est de 100 *Listeria monocytogenes* par gramme au stade de la consommation.

La principale source de contamination est d'origine alimentaire. Cela est relié à la capacité de développement des *Listeria* à 4°C, toutefois une pasteurisation correcte entraîne sa destruction.

Selon l'OMS, les deux principaux critères qui définissent une épidémie de listériose sont une augmentation anormale de malades et la mise en évidence d'une même souche dans la majorité des cas.

Un certain nombre d'épidémies répondant à cette définition est mentionné dans la littérature, la première ayant été décrite en Allemagne fédérale en 1960- 1961, et les plus importantes ayant eu lieu en Allemagne démocratique en 1966 (281 cas) et en France en 1975-1976 (175 cas). Mais ce sont les épidémies récemment observées sur le continent nord-américain et en Suisse qui, en démontrant l'origine alimentaire, ont incontestablement le plus contribué à comprendre l'épidémiologie de cette infection. Ainsi ont été successivement incriminés les crudités à Boston en 1979 (23 cas), le chou en Nouvelle- Ecosse en 1981 (41 cas), le lait pasteurisé à Boston en 1983 (49 cas) puis le fromage " Mexican style cheese" en Californie (142 cas) et le "Vacherin Mont d'Or" en Suisse en 1983-1987 (122 cas).

En France, de mars à décembre 1992, 279 cas de listériose dus à une forme particulière de *Listeria monocytogenes*, sérovar 4b, ont été identifiés. Cette épidémie a entraîné au total 63 décès et 22 avortements. L'origine de cette épidémie était principalement due à de la langue de porc en gelée et par d'autres produits contaminés lors de manipulations à la distribution.



On connaît maintenant le mode d'action des *L. monocytogenes*. Après inoculation par voie orale, les bactéries traversent la barrière intestinale. Elles accèdent ainsi au réseau lymphatique puis sanguin où elles sont phagocytées par les macrophages. Les étapes de l'infection cellulaire sont les suivantes :

- adhésion à la membrane puis entrée dans la cellule par la formation d'une vacuole .
- sortie de la vacuole grâce à la production de listériolysine ;
- multiplication dans le cytoplasme ;
- mouvement intracellulaire et passage de cellule en cellule.

(cité par HECHARD, 1993).

### **3-3 IMPACT ECONOMIQUE DE LA PRESENCE DE LISTERIA DANS LES PRODUITS DE LA MER**

Sur une étude faite aux Etats-Unis entre 1977 et 1984, il a été remarqué que 24.8% des TIA (Toxi-Infections Alimentaires), sont causées par des produits de la mer, tandis que les viandes arrivent en seconde position avec 23.3%, et le lait et les produits laitiers en troisième position avec 4.2%. Sur la période de 1983 à 1987, les coquillages et le poisson ont été impliqués dans 22.4% des cas de TIA contre 13.1% pour la viande et 5.4% pour les produits laitiers.

Pour l'industrie, le coût de la contamination d'un produit par *Listeria monocytogenes* inclut : le coût de la reprise et de la destruction du produit, la réduction de la demande des consommateurs, la recherche de la source de contamination, le nettoyage, les changements dans la production, le dysfonctionnement du programme de production et finalement la fermeture de l'entreprise.

Etant donné que les produits de la mer deviennent de plus en plus populaires et que les produits prêts-à-consommer s'accroissent sur les lieux de ventes, l'importance du problème lié aux *Listeria* augmente aussi.

C'est pour faire face à cette nouvelle maladie que des programmes de recherche ont été mis en place pour mieux connaître la bactérie et les façons de la combattre.

### **3-4 LISTERIA MONOCYTOGENES DANS LE POISSON FUME**

Les cas de listérioses soulignent le besoin d'avoir de plus amples informations sur la fréquence, le devenir et l'épidémiologie de *Listeria monocytogenes* dans le poisson. L'intérêt est tout particulier pour les produits réfrigérés, prêts-à-consommer et ayant une longue durée de conservation. Le poisson fumé fait partie de cette catégorie .

Récemment, des travaux ont montré que ces produits étaient relativement souvent contaminés par *Listeria monocytogenes* . JEMMI (1990) a détecté *Listeria monocytogenes* dans 12.2% des poissons fumés et fermentés étudiés. Les taux de contamination correspondant étaient de 8.9% pour les poissons fumés à chaud; 13.6% pour ceux fumés à froid et 25.8% pour les poissons fermentés. L'auteur a aussi noté dans une autre étude que sur 100 poissons fumés 24 étaient contaminés avec *Listeria monocytogenes*.

FARBER (1991) a montré que 31% des saumons fumés provenant de différents pays étaient contaminés.

Dans une étude plus récente JEMMI, (1993) a montré que sur 691 échantillons de poissons fumés à chaud et 434 fumés à froid , 8.4% et 11.3% des produits étaient contaminés par *Listeria monocytogenes*.

La présence relativement fréquente de *Listeria monocytogenes* dans le poisson fumé conduit à vouloir identifier l'origine de la contamination et à rechercher les contrôles nécessaires à réaliser pendant la production. A ce sujet, GUYER et JEMMI (1991) ont montré que, dans 3 usines de fabrication de poisson fumé en Suisse, la matière première était plus contaminée que les produits finis .

Cependant, dans les industries de fumage, les contrôles microbiologiques sont rarement mis en place alors que des contaminations avant et après transformations apparaissent fréquemment . Les taux de contamination importants ne sont donc pas surprenants. L'application d'une méthode de contrôle telle que la méthode des points critiques ou l'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) ou la microbiologie prédictive peuvent aider à assurer la qualité microbiologique du produit.

### *Listeria monocytogenes* au cours du fumage et pendant le stockage

GUYER et JEMMI (1991) ont observé le devenir de *Listeria monocytogenes* au cours de la fabrication et du stockage du saumon fumé. Dans trois essais, des filets de saumon ont été inoculés en surface avec *Listeria monocytogenes*, puis mis en saumure, fumés à des températures de 26 à 30°C pendant 6 heures et stockés à 4 et 10°C pendant 30 jours. Les taux d'inoculation pour les différents essais ont été de 10, 10<sup>2</sup> et 10<sup>4</sup> UFC/g.

Durant la fabrication, la population en *Listeria monocytogenes* reste la même que celle que l'on a inoculée au départ.

Après un stockage de 30 jours à 4°C et 10°C , une croissance significative a été détectée pour les essais correspondant aux inoculations à 10<sup>2</sup> et 10<sup>4</sup> UFC/g. Le niveau de la population atteint environ 10<sup>7</sup> UFC/g pour les deux essais (GUYER et JEMMI, 1991) . Les auteurs n'ont pas mis en évidence de développement de la souche de référence 1/2b dans l'essai faiblement inoculé (10 UFC/g). De façon générale, ces résultats prouvent la nécessité de limiter la contamination initiale de la matière première.

Enfin, ces même auteurs mentionnent que :

- \* les espèces de *Listeria* survivent à des taux élevés de NaCl ( 6% en marinade).
- \* les poissons fumés à froid sont plus contaminés que les poissons fumés à chaud
- \* un fumage réalisé à 30°C ne détruit pas *Listeria monocytogenes* mais inhibe sa croissance
- \* les espèces de *Listeria* peuvent se développer entre pH 5.6 et 9.6 .

Dans une autre étude, PETERSON et coll (1993) ont étudié le comportement de *Listeria monocytogenes* (Scott A) inoculé au taux de 10 UFC/g dans du saumon fumé à froid contenant 3, 5 ou 6% de NaCl pendant un stockage de 40 jours à 5°C et 10°C, en conditionnement perméable à l'oxygène ou sous-vide. A 10°C, la population de *Listeria monocytogenes* des échantillons au taux de 3 et 5% de NaCl passe de 10 à 10<sup>6</sup> UFC/g en 10 jours dans les deux conditionnements. Cependant le conditionnement sous-vide limite le développement ultérieur de ces germes. En effet, la population de *Listeria monocytogenes* continue à croître jusqu'à 10<sup>8</sup> UFC/g après 20 jours de stockage dans le seul échantillon conditionné sous film perméable à l'O<sub>2</sub>.

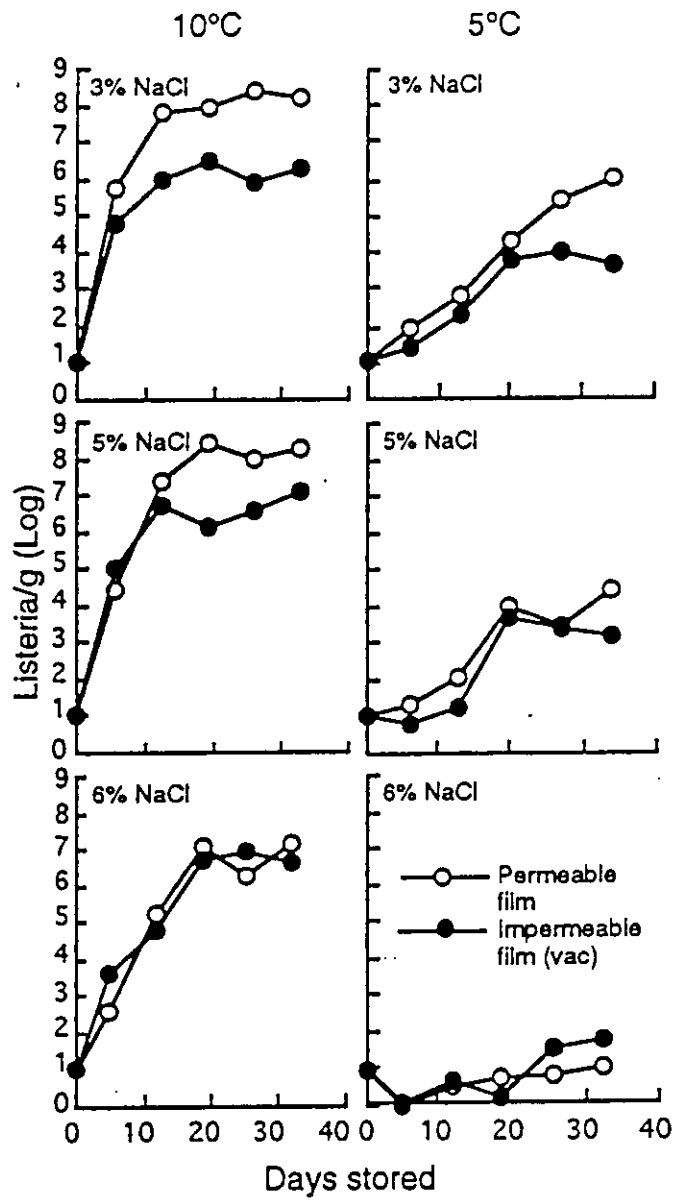


Figure 1. Growth of *L. monocytogenes* (10 Scott A/g) in cold-process salmon containing 3, 5, or 6% water-phase NaCl during storage at 10 or 5°C in oxygen-permeable film or vacuum-sealed impermeable film packages.

(Peterson et coll, 1993)

L'inhibition liée à la concentration en NaCl apparaît de façon plus évidente à 5°C et la population de *Listeria monocytogenes* ne dépasse pas 10<sup>2</sup> UFC/g dans le saumon fumé, salé à 6% ( figure 1).

#### **Des éléments de prévention :**

La concentration en *Listeria* dans le produit fini

- dépend : - de la charge bactérienne initiale,  
- du maintien de la chaîne du froid ( t°<4°C ),  
et doit éviter : - les recontaminations en utilisant des moyens appropriés dans l'hygiène et la technologie,  
- éviter les manipulations intempestives.

## **4 UTILISATION DE BACTERIOCINES POUR LUTTER CONTRE LISTERIA**

### **4-1 LES BACTERIES LACTIQUES**

Les bactéries lactiques sont reconnues depuis longtemps comme un moyen de conserver les aliments, tout en y apportant des saveurs particulières.

En effet, dans de nombreux aliments fermentés la croissance des bactéries lactiques crée des conditions de milieu défavorables aux autres micro-organismes. Dans ces produits l'acidification est le facteur sélectif déterminant, associé dans certains cas à l'abaissement de l'Aw (activité de l'eau) dû au salage ou au séchage. Cependant, d'autres facteurs inhibiteurs interviennent, comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et les substances à activité antibiotique appelées bactériocines (BELIARD et THUAULT, 1989).

#### **4-1-1 Classification des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques regroupent des micro-organismes relativement hétérogènes au point de vue morphologique et physiologique. Leurs caractéristiques communes sont d'être GRAM positif, asporulées, microaérophiles, de ne pas posséder de catalase et de produire de l'acide lactique à partir de sucres selon deux voies métaboliques : homofermentaire / hétérofermentaire.

Les bactéries lactiques sont réparties en cinq genres :

- *LEUCONOSTOC*
- *PEDIOCOCCUS*
- *STREPTOCOCCUS*, *ENTEROCOCCUS*, *LACTOCOCCUS*, *VAGOCOCCUS*
- *LACTOBACILLUS*
- *CARNOBACTERIUM*, espèces anciennement répertoriées dans les *Lactobacillus* et décrites par COLLINS et coll. en 1987.

#### 4-1-2 Les Carnobacterium

Les Carnobacterium présentent des cellules en forme de bâtonnet. Les quatre espèces de ce genre sont faiblement hétérofermentaires, ce caractère peut être variable selon le substrat fermenté. Elles dégradent l'arginine et c'est la forme "L" de l'acide lactique qui est principalement produite au cours de la fermentation des sucres. Elle possèdent un peptidoglycane du type méso-diaminopimélique.

Ces souches fermentent toutes le ribose, le D-glucose, le D-fructose, le D-mannose, le N-acétyl-glucosamine, l'arbutine, le cellobiose, la salicine, le maltose, le saccharose et le tréhalose. Par contre, elles n'hydrolysent pas l'amidon.

Ces bactéries sont peu acidifiantes, elles sont psychrotrophes et ne se développent pas en présence de 8% de NaCl (MAUGUIN, 1991).

#### 4-1-3 Les différents modes d'actions inhibiteurs des bactéries lactiques

##### - La production d'acide :

Dans la plupart des cas, la formation d'acide lactique ou acétique permet d'obtenir des pH inhibiteurs de la flore d'altération.

Dans les produits fermentés, la baisse du pH dépend du pouvoir tampon du milieu, de la concentration en substrats fermentescibles et du pH limite toléré par les ferments (BELIARD et THUAULT, 1989).

L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée (CORLETT et BROWN, 1980).

On constate parfois une synergie dans l'inhibition lorsqu'il y a deux acides différents (RUBIN, 1978).

Cependant, l'inhibition de la flore d'altération ou de souches pathogènes sur le poisson frais ne peut être envisagée par simple acidification puisque l'ensemencement de la chair par des bactéries lactiques ne diminue que faiblement le pH.

##### - La production de peroxyde d'hydrogène :

Etant donné leur manque de catalase, les bactéries lactiques produisent du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) lors de la réduction des molécules d'oxygène par le NADH. La quantité de peroxyde d'hydrogène produite dépend des espèces et du substrat glucidique consommé.

Le rôle antagoniste du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition a été mis en évidence par GILLILAND et SPECK (1975), PRICE et LEE (1970), MARTIN et GILLILAND (1980).

Cependant, l'efficacité réelle d'une inhibition due à la présence du peroxyde d'hydrogène sur la chair de poisson n'est actuellement pas connue.

### - La production d'antibiotiques et de bactériocines:

C'est en 1925, qu'une substance antibiotique produite par une souche d'*Escherichia coli*, active contre des souches de la même espèce, est découverte. Depuis de grands progrès ont été réalisés dans la connaissance de ces substances.

La reutérine (un dérivé du glycérol) est produite par *Lactobacillus reuteri* (TALERIO et coll., 1988). Elle a un spectre d'action très large : elle inhibe des bactéries GRAM positif et négatif, des levures, des moisissures et des protozoaires. Son mode d'action n'est pas encore élucidé mais elle pourrait exercer son activité en bloquant des enzymes dont la Ribonucléotide réductase (enzyme qui catalyse la première phase de synthèse d'ADN) ce qui explique son large spectre d'action.

On utilise la nisine (peptide de 3500 daltons de masse moléculaire, produit par des souches de *Streptococcus lactis*) comme agent de conservation dans l'industrie alimentaire (pour les fromages fondus en France). La nisine, découverte en 1944 par MATTICK et HIRSCH, a un très large spectre d'action qui s'explique par son mode d'action (SAHL, 1985).

Les bactériocines sont des peptides susceptibles d'être utilisés pour la préservation des produits alimentaires. En effet, à la différence de l'acide lactique ou du peroxyde d'hydrogène, elles ne présentent pas de propriétés défavorables à la qualité organoleptique des aliments.

## 4-2 LES BACTERIOCINES

Les bactériocines peuvent être produites par la plupart des espèces de bactéries lactiques (JUILLARD et coll., 1987). Mais le pourcentage de bactéries productrices au sein d'une même espèce est faible : GEIS et coll. (1983) ont montré que sur 280 souches de *Lactobacillus lactis* testées, 5% seulement d'entre elles produisent des bactériocines.

La mise en évidence de l'activité de la bactériocine se fait par plusieurs méthodes : celle des 3 couches (THUAULT, 1990) et celle des surnageants. La mesure de l'activité spécifique se fait soit par présence d'un halo d'inhibition, soit par mesure du diamètre de ce halo.

### 4-2-1 Définition

Les bactériocines sont caractérisées par (TAGG et coll., 1976) :

- un spectre d'activité généralement restreint aux bactéries taxonomiquement proches de la bactérie productrice,
- une partie protéique,
- un effet bactéricide,
- une action grâce à un récepteur spécifique,
- un codage de la toxine et de l'immunité le plus généralement par un plasmide.

De nombreuses bactériocines ont été mises en évidence comme le montre le tableau en annexe 1.

<b>Bactériocine de C. divergens</b>	1	5	10	15		
Mesentéricine Y105	Thr	Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Tyr X Asn Ser Lys X X Val Asp X Gly				
Leucocine A	Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val His Cys Thr Lys Ser Gly Cys Ser Val Asn Trp Gly					
Pediocine PA-1	Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val His Cys Thr Lys Ser Gly Cys Ser Val Asn Trp Gly					
Sakacine P	Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val His Cys Thr Lys Ser Gly Cys Thr Val Asp Trp Gly					
Curvacine A	Ala Cys Ser Tyr Gly Asn Gly Val Tyr Cys Asn Lys Lys Ser Trp Val Asn Gly Gly					
<b>Bactériocine de C. divergens</b>	20	25	30	35		
Mesentéricine Y105	Gln Ala Ser Gly X Ile X Gln Thr X Val Gly					
Leucocine A	Glu Ala Ala Ser Ala Gly Ile Ile His Arg Leu Ala Asn Gly Asn Gly Phe					
Pediocine PA-1	Glu Ala Phe Ser Ala Gly Val His Arg Leu Ala Asn Gly Asn Gly Phe Trp					
Sakacine P	Lys Ala Thr Thr Cys Ile Ile Asn Asn Gly Ala Met Ala Trp Ala Thr Gly Gly His					
Curvacine A	Thr Ala Ile Gly Asn Ile Gly Asn Ala Ala Ala Asn W/G Ala Thr Gly W/S Asn					
Pediocine PA-1	40					
Sakacine P	Gln Gly Asn His Lys Cys					
	Ala G/K G/K					

**Figure 2:** Comparaison des séquences en acides aminés des bactériocines anti-*Listeria*  
Les résidus des autres bactériocines soulignés en bleu sont identiques à ceux de la bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* V41.

#### 4-2-2 Les différentes classes de bactériocines

L'analyse de la composition chimique des bactériocines permet de les classer en 3 groupes (PIARD et DESMAZEAUD, 1992) :

- les peptides de faible poids moléculaire (< à 50 acides aminés) de l'ordre de 1700 à 6000 daltons, contenant des résidus lanthionines ou  $\beta$ -méthyl-lanthionines : les lantibiotiques, représentés par la Carnocine UI49 et la Lacticine 481 ;

- les peptides de faible poids moléculaire ne contenant pas de résidus lanthionine ou  $\beta$ -méthyl-lanthionine tels la diplococcine, la lactococcine, l'helvéticine J, les lactacines B et F, la curvacine A, la sakacine P et la mésentéricine Y 105, la divercine (PILET et coll, 1993).

- les protéines d'un poids moléculaire plus élevé. C'est le cas de la lactocine 27 glycosylée et de la caséicine avec un poids moléculaire respectif de 12400 et 42000 daltons.

#### 4-2-3 Déterminants génétiques

De nombreux auteurs ont mis en évidence la relation entre la production de bactériocine et la présence d'un plasmide (KLAENHAMMER, 1988).

Mais le déterminant génétique des bactériocines n'est pas toujours un plasmide. En effet, MEIGNEN (1993), a démontré que le support génétique de la bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* V41 est chromosomique et non pas plasmidique.

Notons que les différents peptides anti-*Listeria* ont la même séquence d'acides aminés sur une partie du peptide. Cette partie commune, quelque soit la souche productrice de la bactériocine anti-*Listeria*, se présente comme "le site actif" de la bactériocine et pourrait renseigner sur son mode d'action (figure 2).

#### 4-2-4 Mode d'action des bactériocines

L'action des bactériocines sur les cellules sensibles comprend deux étapes (TAGG et coll., 1976) :

- la première phase, réversible, consiste en l'adsorption de la bactériocine (généralement hydrophobe) sur l'enveloppe cellulaire de la bactérie cible par des récepteurs spécifiques ou non. A ce stade, la bactériocine est encore sensible aux protéases.

- la seconde phase est irréversible et induit des altérations biologiques de la bactérie cible, altérations spécifiques à chaque bactériocine. Hormis la lactocine 27 qui a un effet bactériostatique, les bactériocines ont une activité bactéricide, lytique ou non lytique. Leur action létale est rapide et plus importante au cours de la phase exponentielle de croissance que pendant la phase stationnaire. Ceci s'explique par le fait que la biosynthèse des bactériocines a lieu, en général, pendant ou en fin de phase exponentielle.

Très peu d'études ont été rapportées sur le mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques. Récemment, il a été montré que la lactococcine A augmentait spécifiquement la perméabilité et diminuait le potentiel de la membrane cible d'un *Lactococcus lactis* (VAN BELKUM et al, 1991).

Des travaux ont été effectués sur le mode d'action des bactériocines anti-*Listeria*. Ainsi, la pédiocine AcH entraîne une fuite d'ion  $K^+$  et de divers composés, due à l'augmentation de la perméabilité membranaire. Elle se fixe à la surface des membranes de cellules sensibles et même de cellules résistantes. Son effet est bactéricide (BHUNIA et al, 1991).



Quant à la nisine, elle provoque un efflux d'acides aminés, d'ATP, et d'ions potassium. La chute de potentiel de membrane de la cellule, qui en résulte, ainsi que l'arrêt de toute biosynthèse, explique son large spectre d'action (BELIARD et THUAULT, 1989).

#### 4-2-5 Les bactériocines anti-Listeria

La recherche de bactéries lactiques productrices de substances inhibitrices provenant de produits marins est récente.

K. SCHRODER en 1981 a isolé une souche de *Lactobacillus plantarum* provenant des intestins de Lieu noir. Cette souche pourrait avoir un effet inhibiteur par la production de substances à activité anti-bactérienne.

STOFFELS, NES et GUOMUNSDOTTIR en 1992 ont démontré la présence d'une bactériocine (carnocin UI49) produite par *Carnobacterium piscicola* isolé du poisson. Ils l'ont purifiée et séquencée. Elle appartiendrait à la famille des lanthibiotiques.

Elle est produite pendant la phase exponentielle entre 15°C et 34°C. Elle a une action bactéricide qui est le résultat d'une lyse des cellules sensibles.

BARRE (1992) et PILET et coll. (1993) ont mis en évidence des substances de nature peptidique, produites par *Carnobacterium* et actives contre *Listeria monocytogenes*.

La souche *Carnobacterium divergens* V41 produit une bactériocine active, en outre, contre :

- *Listeria innocua*,
- *Listeria monocytogenes*,
- *Carnobacterium piscicola*,
- *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*.

Certaines bactéries lactiques présentent une activité inhibitrice technologiquement intéressante vis à vis de *Listeria monocytogenes* (tableau 2). Elles sont de plus en plus étudiées pour leurs propriétés anti-microbiennes.

Tableau 2 : Comparaison des bactériocines actives contre *Listeria monocytogenes* :

Bactériocine	Origine	Poids moléculaire
Leucocin A-UAL 187	<i>Ln gelidum</i>	3930
Mésentéricine Y 105	<i>Ln mesenteroides</i>	3666
Mésentérocin 5	<i>Ln mesenteroides</i>	4500
Nisine	<i>Lc lactis</i>	3354
Pédiocine A	<i>P.pentosaceus</i>	ND
Pédiocine AcH	<i>P.acidilactici</i>	2700
Pédiocine PA-1	<i>P.acidilactici</i>	4629
Sakacine A	<i>Lb sake</i>	ND
Divercine V41	<i>Cb.divergens</i>	4509

Les bactériocines pourraient, dans un proche avenir, être un des moyens de lutte contre les *Listeria* (THUAULT, 1993). Il est nécessaire d'obtenir l'autorisation de les utiliser sur les aliments ; pour l'instant seule la nisine est acceptée sur le plan législatif. Cependant, il semblerait plus facile d'obtenir des autorisations pour l'utilisation directe des cultures microbiennes d'espèces acceptées pour leur innocuité.

## **MATERIEL ET METHODES**

# 1 - MATÉRIELS ET MICRO-ORGANISMES UTILISÉS

## 1 - 1 MICRO ORGANISMES

### - Souches productrices de bactériocines

La souche productrice de bactériocine, *Carnobacterium divergens* V41, a été isolée de viscères de saumon par BARRE (1992) et PILET et coll. (1993).

### - Souches cibles

Les souches cibles permettant le dosage des bactériocines sont :

- *Carnobacterium piscicola* NDCO 2762
- *Listeria innocua* F (collection ENITIAA)

### - Souchesensemencées

- *Listeria innocua* F
- *Listeria innocua* S, isolée du saumon fumé pendant le stage ; identifiée à la DSV de Nantes.
- *Listeria monocytogenes* Scott A fournie par l'INRA de Jouy en Josas.

### - Conservation des souches

Les souches, après isollements successifs sur boîtes de Pétri pour assurer leur purification, sont mises en culture en milieux appropriés.

Elles sont ensuite réparties à raison de 500 µl dans des tubes Eppendorf stériles. Pour assurer la conservation des cellules, 500 µl de glycérol stérile sont ajoutés à chaque tube. La conservation se fait à - 25°C.

## 1 - 2 PRÉPARATION DE L'INOCULUM DE LA SOUCHE CIBLE

L'inoculum de la souche cible (*Listeria innocua*) est normalisé par mesure de la densité optique (DO) avant d'êtreensemencé dans le saumon fumé.

La corrélation DO-nombre de cellules a été établie à partir d'une culture dense de cellules cibles diluées plusieurs fois et pour lesquels DO et dénombrements classiques sur boîtes de Pétri ont été réalisés.

## 1 - 3 MILIEUX DE CULTURE ET TECHNIQUES DE DENOMBREMENT

### 1 - 3 - 1 Milieux utilisés (composition en annexe 2) :

#### - Milieux liquides

Pour la production des bactériocines par *Carnobacterium divergens*, le milieu de culture utilisé fut le MRS sans tween. C'est un milieu riche, sélectif des bactéries lactiques. Le tween a été supprimé du milieu car ce surfactant peut perturber la lecture de la D.O. en raison de ses propriétés moussantes.

Le milieu Elliker a été utilisé pour la culture des différentes souches de *Listeria* en raison de leur croissance rapide (16 heures à 30°C).

#### - Milieux solides

Cinq milieux solides ont été utilisés pour la titration des bactériocines et surtout pour les dénombrements : MRS, PALCAM, PCA, BHI, Elliker 1% agar.

Le dénombrement de la flore lactique se fait sur gélose MRS, milieu sélectif des bactéries lactiques en anaérobiose.

Pour le dénombrement des *Listeria* inoculées dans le saumon fumé, c'est le milieu PALCAM qui a été choisi pour ses propriétés très sélectives. Le milieu PALCAM permet d'isoler les *Listeria* car dans le même temps les bactéries Gram- négatifs et la plus grande partie de la flore d'accompagnement Gram- positive sont supprimées. La sélectivité résulte de l'utilisation de substances inhibant la pousse : polymyxine, acriflavine, chlorure de lithium et ceftazidime.

Les *Listeria* hydrolysent le glucoside esculine en glucose et esculétine. Ces dernières formes se complexent en présence d'ions fer III et passent de vert-olive au noir pour colorer ensuite les colonies de *Listeria*. Si une pousse de germes secondaires mannitol-positifs, par exemple *Staphylocoques*, intervient malgré l'inhibition, elle se présente sous forme de colonies jaunes.

Les colonies de *Listeria* apparaissent donc grises ou grises-verdâtres, luisantes, avec un halo brun-noir. Elles sont incrustées dans la gélose et présentent une dépression centrale. Si les colonies sont très denses, l'ensemble du milieu de culture peut se colorer en brun-noir.

La gélose PCA est utilisée pour dénombrer la flore aérobie totale du saumon fumé.

Pour la titration des bactériocines, le milieu utilisé a été une gélose Elliker molle contenant 1% d'agar. Les propriétés de cette gélose permettent la diffusion des bactériocines.

### Caractéristiques d'utilisation des milieux gélosés :

	MRS	PALCAM	PCA(1)	Elliker 1% agar
Température	30°C	37°C	20°C	30°C
Temps	48 h	48 h	5 j	16 h
Flore isolée	Flore lactique	Listeria	Flore totale	dosage bactériocines
Ensemencement	spirale	en surface	en profondeur	1 ml de la souche cible en profondeur + 10 µl de la bactériocine en surface
Volume ensemencé	0.0492	0.1 ml ou 0.5 ml	1 ml	
Lecture	UFC/g de saumon fumé broyé dilué au 7/10	UFC/g de saumon fumé broyé dilué au 7/10	UFC/g de saumon fumé	

(1) Les critères microbiologiques relatifs aux poissons fumés sont donnés dans le Journal Officiel du 19/01/80 (cf annexe 3).

#### 1 -3 -2 Techniques de dénombrement

##### - Méthode à l'étaleur

Cette méthode a été utilisée pour le dénombrement des *Listeria* lorsque la population était trop faible pour être dénombrée par la méthode de l'anse calibrée.

Principe : On dépose 0,5 ml de la solution à dénombrer sur la gélose PALCAM préalablement séchée. L'étalement se fait, à l'aide d'un étaleur en verre flambé à l'alcool, sur toute la surface de la boîte.

##### - Méthode de l'anse calibrée

Cette méthode présente l'avantage de n'utiliser qu'une seule boîte pour l'ensemble des dilutions de la solution à dénombrer. Elle est utilisée pour les *Listeria* quand leur taux est important.

Principe : Il consiste à déposer, à l'aide d'une anse calibrée stérile, 10 µl de chaque dilution sur la gélose et à étaler le dépôt sur une longueur de 5 cm de manière à disperser les bactéries. Il faut cependant veiller, à ce qu'aucun liquide ne reste sur l'anse.

## - Méthode de l'ensemenceur spiral

L'ensemenceur spiral ( Interscience ) a servi pour tous les dénombrements de la flore lactique des prélèvements. Cet appareil distribue de manière décroissante et en tournant un volume calibré ( 0,0492 ml ) sur la gélose nutritive.

Après incubation, les colonies apparaissent sur le tracé en spirale et sont de plus en plus isolés. On les compte à l'aide de secteurs correspondant à des volumes précis.

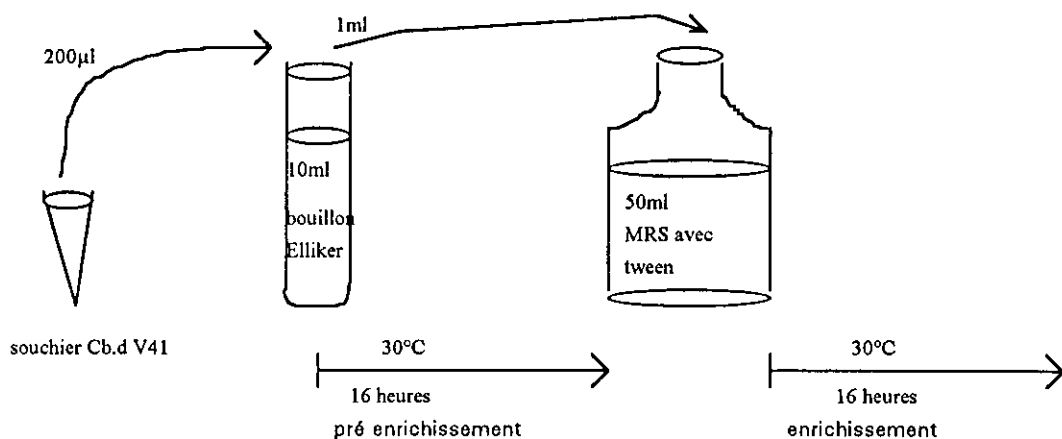
Cette méthode présente une très bonne reproductibilité dû aux faibles taux de variation du volume ( < 5% ). Etant automatique, un gain de temps intéressant est réalisé par rapport à la méthode à l'étaioir.

## 2- PRODUCTION ET PRE PURIFICATION DE LA BACTERIOCINE, PRODUITE PAR *CARNOBACTERIUM DIVERGENS V41* EN FERMENTEUR

### 2-1 PREPARATION DES PRE CULTURES

La figure 3 visualise les étapes de pré culture de *Carnobacterium divergens* V41.

Figure 3 : Etapes de pré culture avant les fermentations de *Carnobacterium divergens* V41 en fermenteurs :



### Pré enrichissement.

Le pré enrichissement est une culture d'au moins huit heures, à 30°C.

Pour obtenir un ensemencement à 2%, on ajoute 200 µl d'un tube du lot primaire à un tube de bouillon Elliker (10 ml).

On réalise deux tubes de pré enrichissement par mesure de précaution.

### Enrichissement.

Successivement on réalise deux flacons d'enrichissement à 2% en ajoutant 1 ml du pré enrichissement sur bouillon Elliker à un flacon de bouillon MRS.

La croissance se fait à 30°C pendant au maximum 20 heures, afin d'éviter le risque de se trouver en phase de lyse.

### Ensemencement.

Un flacon d'enrichissement de 50 ml est prévu pour un fermenteur d'un litre, et permettra un ensemencement à 5 %.

Pour garantir des conditions opératoires standards, la densité optique de l'inoculum est fixée à  $DO = 1,0 \pm 0,1$ , cette densité optique est mesurée contre le milieu MRS stérile.

Suivant les cas il faudra laisser la culture à 30°C pour permettre aux cellules de se multiplier plus ou diluer cette culture avec le surplus du milieu MRS dilué.

## **2 - 2 CULTURE EN FERMENTEUR ET TRAITEMENT DU SURNAGEANT**

Des essais de production en fermenteur (MEIGNEN, 1993) à pH régulé 6,5 ont permis de mettre en évidence que sur milieu MRS, la croissance à pH régulé est plus forte. Le titre maximum en bactériocine en fin de culture à pH régulé est aussi plus élevé, soit 4 fois la valeur obtenue à pH non régulé.

D'autre part la croissance est plus rapide et plus importante à 30°C mais la production de bactériocine dans le milieu est plus forte à 20°C pour une DO équivalente. Enfin, à 30°C la quantité de bactériocine du milieu décroît en début de la phase stationnaire (elle passe de 25600 à 12800 UA/ml) alors qu'elle reste stable à 20°C (25600 UA/ml).

Les conditions retenues pour les fermentations sont donc 20°C, à pH régulé 6,5.

Les fermentations sont faites :

- d'une part en fermenteur Setric 2 litres avec rack de régulation MOD 7 F, lorsqu'il s'agit de récupérer les surnageants contenant la bactériocine ;

La culture obtenue en fermenteur est centrifugée 5 min à 12000 tr/min, chauffée 10 min à 95°C pour inactiver les protéases puis congelée à - 20°C.

Ce surnageant contient la bactériocine et il est donc actif contre la souche cible de référence.

- d'autre part en petit fermenteur 0,5 litre équipé d'un système d'agitation et d'une double paroi permettant la régulation de la température. La régulation du pH est rendue possible grâce à l'utilisation d'un milieu tampon phosphate 0,2 M, à pH 6,5. Les cultures ainsi obtenues sont directement inoculées dans le saumon fumé.



## **2 -3 PREPARATION DE LA SUSPENSION DE CULTURE LAVÉE**

A partir de la culture obtenue en fermenteur, on procède à une centrifugation à 7000 tr/min pendant 7 minutes. Les bactéries sont mises en suspension dans de l'eau de Ringer (dilution au 1/100), (poids de cellules/volume d'eau de Ringer).

La solution est de nouveau centrifugée dans les mêmes conditions puis rediluée dans de l'eau de Ringer au 1/100. C'est cette solution obtenue qui sera ajoutée à l'échantillon de saumon fumé.

## **2 -4 PRECIPITATION DES BACTERIOCINES**

La veille de la précipitation, le surnageant est décongelé puis filtré sur membrane 0,8 µm puis 0,2µm pour éliminer les cellules. Il est ensuite conservé au froid ( 4°C).

La précipitation au sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a été optimisée par MEIGNEN (1993). Le taux de saturation optimal pour V41 est de 60%, ce qui correspond à 361 g/l de sulfate d'ammonium.

La solution obtenue après précipitation est centrifugée 50 min à 11500 tr/min à 4°C. Le surnageant est ensuite recueilli pour le dosage de son activité. Le précipité est repris dans du tampon phosphate (20 mM, pH=6,5), dans un volume correspondant à 1/10 du volume de surnageant de départ. Son activité est également testée.

Ce précipité redissous peut ensuite être dialysé dans un boudin de dialyse contre du tampon phosphate (20 mM, pH=6,5), pendant une nuit à 4°C sous agitation pour éliminer les sels.

## **2 -5 METHODE DE TITRATION DE L'ACTIVITE DE LA BACTERIOCINE**

### **2 -5 -1 Préparation de l'échantillon :**

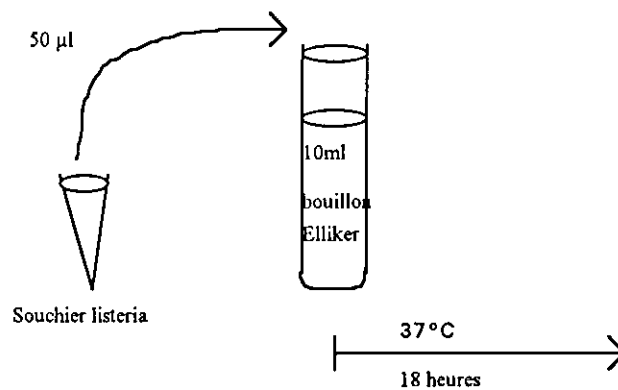
La culture issue du fermenteur est centrifugée 5 minutes à 12000 tr/min dans des Eppendorfs stériles. Le surnageant, récupéré dans un Eppendorf stérile, est chauffé à 95°C pendant 10 minutes dans un bain-marie. Ceci pour éliminer les protéases susceptibles de dégrader les bactériocines.

Pour les prélèvements au cours du stockage du saumon fumé broyé, le traitement avant dosage est identique à celui de la culture avec en plus une deuxième centrifugation après l'étape de chauffage. Cette centrifugation permet d'éliminer les protéines qui ont coagulé pendant le chauffage pour obtenir un liquide clair.

Les solutions ainsi obtenues sont congelées à - 25°C : elles constituent nos échantillons dont le dosage en bactériocines peut être fait ultérieurement.

### **2 -5 -2 Réalisation du dosage :**

La veille du dosage, une pré culture de la souche cible, (*Listeria innocua* F), est réalisée avec 50 µl du souchier,ensemencé dans un tube stérile contenant 10 ml de bouillon Elliker. L'incubation se fait à 37°C pendant 18 heures.



Au moment du dosage, cette préculture est diluée au 1/100 dans de l'eau physiologique (passage d'environ  $10^8$  à  $10^6$  cellules/ml).

Cette culture diluée est déposée dans des boîtes de Pétri stériles, à raison de 1 ml par boîte pour réaliser un ensemencement en profondeur dans la gélose Elliker à 1% d'agar (environ 10 à 15 ml de gélose liquifiée par boîte).

Après décongélation pendant 15 minutes à température ambiante, les échantillons sont dilués de 2 en 2 dans du tampon Phosphate (0,1 M, pH 6,5) sur des plaques de microtitration.

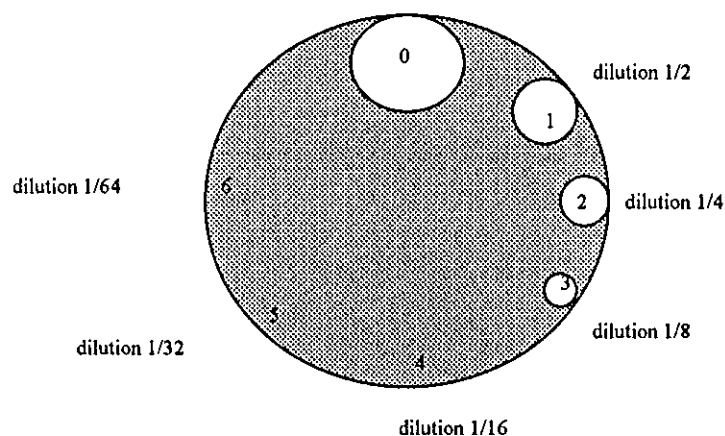
10 µl des différentes dilutions sont déposés sur la gélose alors prise en masse.

Les boîtes sont mises à incuber 18 heures à 30°C.

### 2 -5 -3 Lecture de la titration en bactériocines

On obtient des halos d'inhibition dont la taille décroît lorsque la dilution augmente. Pour obtenir le titre des bactériocines, nous considérons l'inverse de la première dilution sans halo que nous multiplions par  $10^2$  pour ramener au ml, puisque nous avons déposé 10 µl. Le titre ainsi obtenu est exprimé en unité arbitraire par millilitre (UA/ ml.).

Par exemple :



on voit l'extinction des halos à la quatrième dilution, soit la dilution 1/16, donc le titre est :

$$16 \times 10^2 = 1\,600 \text{ UA/ ml}$$

Dans notre cas, on multiplie ensuite par 5 car pour le dosage des bactériocines, tous les échantillons de saumon fumé broyé étaient dilués au 1/5.

### **3 - METHODE DE SELECTION, D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES LISTERIA**

Il a paru intéressant de sélectionner une souche cible de Listeria, isolée du saumon fumé afin de tester l'activité de la bactériocine étudiée.

#### **3 - 1 SELECTION ET ISOLEMENT DES COLONIES**

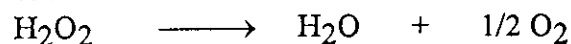
A partir des boîtes de dénombrements, 6 colonies retenues sont diluées dans 0.5 ml d'eau physiologique stérile, la suspension est étalée sur le milieu PALCAM en boîte de Pétri par la méthode des cadrans, afin d'obtenir des colonies espacées après 48 h à 37°C. Trois isollements successifs sont réalisés.

#### **3 - 2 COLORATION DE GRAM**

Une coloration de Gram est effectuée pour chaque colonie isolée. L'observation microscopique des cellules est ensuite réalisée avec un objectif à immersion (Gr × 100).

#### **3 - 3 RECHERCHE DE LA CATALASE**

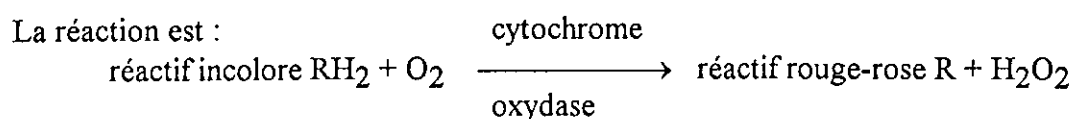
La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée. Sa présence est mise en évidence en déposant 1 goutte d'eau oxygénée à 10 % sur une lame et en émulsionnant 1 colonie sur la goutte. La décomposition de l'eau oxygénée se traduit par un dégagement gazeux selon la réaction suivante :



#### **3 - 4 RECHERCHE DE L'OXYDASE**

Les phosphorylations oxydatives de la chaîne respiratoire se réalisent grâce aux cytochrome-oxydases. Cette enzyme est mise en évidence grâce à l'utilisation d'un disque imprégné de chlorhydrate de diméthylparaphénylène-diamine ou l'oxalate de diméthylparaphénylène-diamine.

On place le disque imprégné sur une lame. Après humidification, on y dépose à l'aide d'une pipette Pasteur, un peu d'une colonie. Si l'oxydase est présente, le disque devient rouge-rose en moins d'une minute.



### 3 - 5 TEST DE CAMP

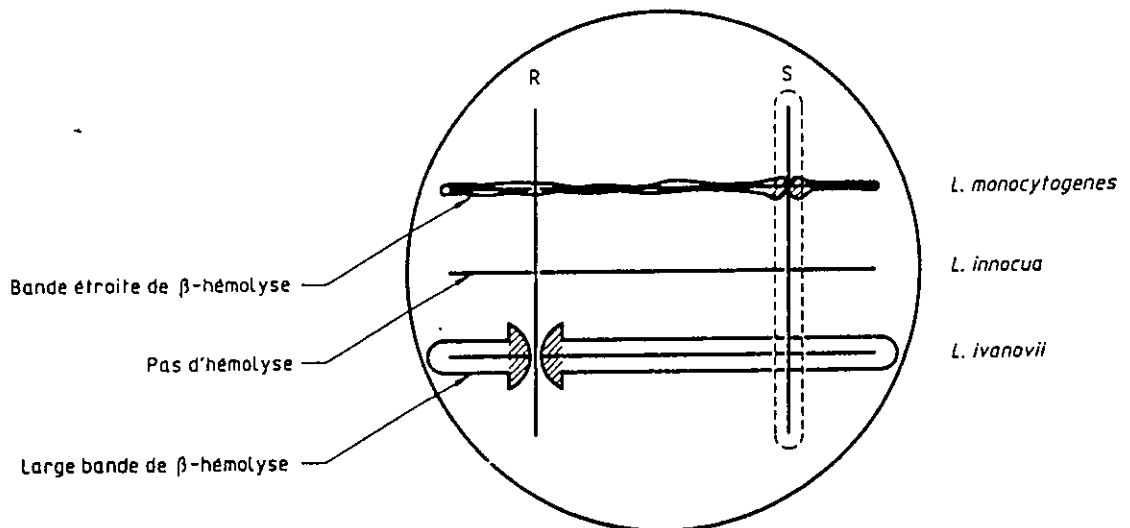
Le test de CAMP est réalisé pour savoir si le germe est hémolytique ou non. L'hémolyse permet la différenciation de *L. monocytogenes*, pathogène, et de *L. innocua*, non pathogène.

On ensemence *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi* en deux stries simples sur la gélose au sang ( composition en annexe 2 ) de manière à ce que les deux stries soient parallèles et diamétralement opposées.

De façon similaire et perpendiculairement à ces cultures, on ensemence les cultures témoins ( *Listeria monocytogenes*, *innocua*, *ivanovii* et *welshimeri* ) ainsi que les souches d'essais en faisant attention de ne pas toucher les souches de *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*, mais d'être à environ 1 à 2 mm.

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 h.

La réaction est considérée comme positive s'il y a une augmentation de la zone de  $\beta$ -hémolyse à l'intersection de la souche d'essai avec chacune des cultures de *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*.



NOTE 1 : Ensemencer de fines boîtes de gélose au sang comme illustré sur le diagramme. Les lignes verticales représentent les stries de *Staphylococcus aureus* (S) et de *Rhodococcus equi* (R). Les lignes horizontales représentent les stries des cultures d'essai. Les parties hachurées indiquent les zones d'hémolyse développée.

NOTE 2 : La partie en pointillés délimite la zone d'influence de la culture de *Staphylococcus aureus*.

### 3- 6 GALERIE API-LISTERIA (annexe 2)

La galerie API-Listeria est un ensemble de tests biochimiques miniaturisés. Pour son utilisation, se référer à la notice explicative API-Listeria.

Identification des espèces de Listeria

Espèce	Hémolyse	Test de CAMP		D-xylose	L-rhamnose	Mannitol	Réduction des nitrates
		<i>R.equi</i>	<i>S.aureus</i>				
<i>L.monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-	-
<i>L.innocua</i>	-	-	-	-	V	-	-
<i>L.ivanovii</i>	+	+	-	+	-	-	-
<i>L.welshimeri</i>	-	-	-	+	V	-	-
<i>L.seeligeri</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>L.grayi</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>L.murrayi</i>	-	-	-	-	-	+	+

### 3- 7 CULTURE A BASSE TEMPERATURE

Les 6 souches ainsi identifiées ont été mises en bouillon Elliker à 8°C pendant plusieurs jours. Ce test au froid nous a permis de mettre en évidence la souche qui était la plus apte à pousser au froid.

## 4 METHODES UTILISEES POUR METTRE EN EVIDENCE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES BACTERIOCINES SUR LES LISTERIA DANS LE SAUMON FUME BROYE

### 4- 1 PREPARATION DE L'ECHANTILLON DE SAUMON FUME

Le saumon fumé provient du commerce ; il est conservé sous-vide et au froid. Lors de son achat, le produit est choisi en fonction de son fabricant ( toujours le même) et de la DLUO (date limite d'utilisation optimale) restante qui doit être la plus longue possible.

Pour l'étude de l'influence de la bactériocine et de la souche de bactérie lactique, nous avons choisi de travailler sur un broyat de poisson au lieu du filet entier.

Soixante-dix grammes de saumon fumé ont été broyés par stomachage en présence de 30 ml de Tryptone-sel, jusqu'à l'obtention d'un broyat homogène. Le Tryptone-sel permet d'éviter tout choc osmotique pour les bactéries.

Le broyage du poisson permet, sans enlever ni rajouter de nutriments, d'homogénéiser la matière première, pour mieux visualiser les effets inhibiteurs.

#### 4 -2- INOCULATION DES ECHANTILLONS

Pour inoculer des taux de micro-organismes souhaités, nous avons utilisé les équations de régression nous donnant la relation entre la DO et le nombre de cellules qui lui correspond (cf annexe 4).

Pour *Carnobacterium divergens* V41, nous avons :

$$\ln n = 20,95 + 1,03 \ln DO$$

$$\text{avec } R^2 = 82,71\%$$

Pour *Listeria innocua*, nous avons :

$$n = 2,55 \cdot 10^8 DO - 2,73 \cdot 10^7$$

$$\text{avec } R^2 = 95,67\%$$

n : nombre de cellules / ml

DO : densité optique

La densité optique (DO) de *Carnobacterium divergens* V41 après les pré cultures identiques à celles décrites au chapitre 2 -1 est d'environ  $1,5 \pm 0,1$ , ce qui correspond à  $1,9$  à  $2 \cdot 10^9$  UFC/g. Des dilutions sont ensuite effectuées pour obtenir le taux d'inoculation souhaité.

La DO de *Listeria innocua*, après 18 h de pré culture en bouillon Elliker à 37°C est de  $1 \pm 0,1$ , c'est-à-dire  $2$  à  $2,4 \cdot 10^8$  UFC/g. De la même façon que précédemment, on procède à des dilutions.

#### 4-3 PREPARATION DES ECHANTILLONS

##### 4 -3 -1 Tests d'implantation

Taux d'inoculation :

*Cb. divergens* V41 :  $2 \cdot 10^5$  UFC/g

*Listeria innocua* F:  $2 \cdot 10^4$  UFC/g

- pesée dans des sacs stomachers sans filtre, d'échantillons de 70 g de saumon fumé auquel on ajoute :

soit 30 ml de TS = témoin

soit 30 ml de TS + 10 µl d'inoculum

- stomachage pendant 6 à 8 min

- prélèvement t0

- thermoscellage sous-vide des échantillons ( P = - 0,95 bar )

- stockage en chambres froides à 4°C et 7 °C.

#### 4 -3 -2 Tests d'inhibition (schéma 1)

##### Taux d'inoculation :

Culture V41 :	5% ( $10^8$ UFC/g)
Culture lavée V41 :	0.5% ( $6 \cdot 10^7$ UFC/g)
<i>Listeria innocua</i> F:	$10^3$ UFC/g et $10^4$ UFC/g
<i>Listeria innocua</i> S :	$10^3$ UFC/g et $10^4$ UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A :	$10^2$ UFC/g et $10^4$ UFC/g
Bactériocines	- surnageant : 5% ( $10^3$ UA/ml)
	- précipité : 5% ( $10^7$ UA/ml)

- pesée dans des sacs stomachers sans filtre, d'échantillons de 70 g de saumon fumé auquel on ajoute :

- \* échantillon n°1 : 30 ml de TS = **témoin**
- \* échantillon n°2 : 30 ml de TS + 10  $\mu$ l de *Listeria* à  $2 \cdot 10^8$  UFC/g
- \* échantillon n°3 : soit 25 ml de TS + 5 ml de surnageant de fermenteur, contenant la bactériocine à  $10^5$  UA/ml.  
soit 25 ml de TS + 5 ml de culture de *Cb. divergens* V41  
soit 25 ml de TS + 5 ml du précipité dilué au 1/5, contenant la bactériocine à  $10^9$  UA/ml  
soit 29,5 ml de TS + 0,5 ml de cellules lavées d'une culture de *Cb. divergens*.

\* échantillon n°4 : 25 ml de TS + 5 ml de surnageant de fermenteur ou de culture de V41.

L'échantillon n°4 nous a permis de vérifier la possibilité de doser la bactériocine dans le saumon fumé broyé. Lorsque cette possibilité a été vérifiée, ce témoin a été supprimé.

- stomachage pendant 6 à 8 min
- prélèvement t0
- thermoscellage sous-vide des échantillons ( P = - 0.95 bar )
- stockage en chambre froide à 8°C.

#### 4-4 - ANALYSE DES ECHANTILLONS (schéma 2)

- ouverture des sacs stomachers
- prélèvement de 10 g, en sac stomacher avec filtre
- remise sous-vide des échantillons puis stockage au froid
- dilutions au 1/5 ou 1/10 suivant l'ensemencement

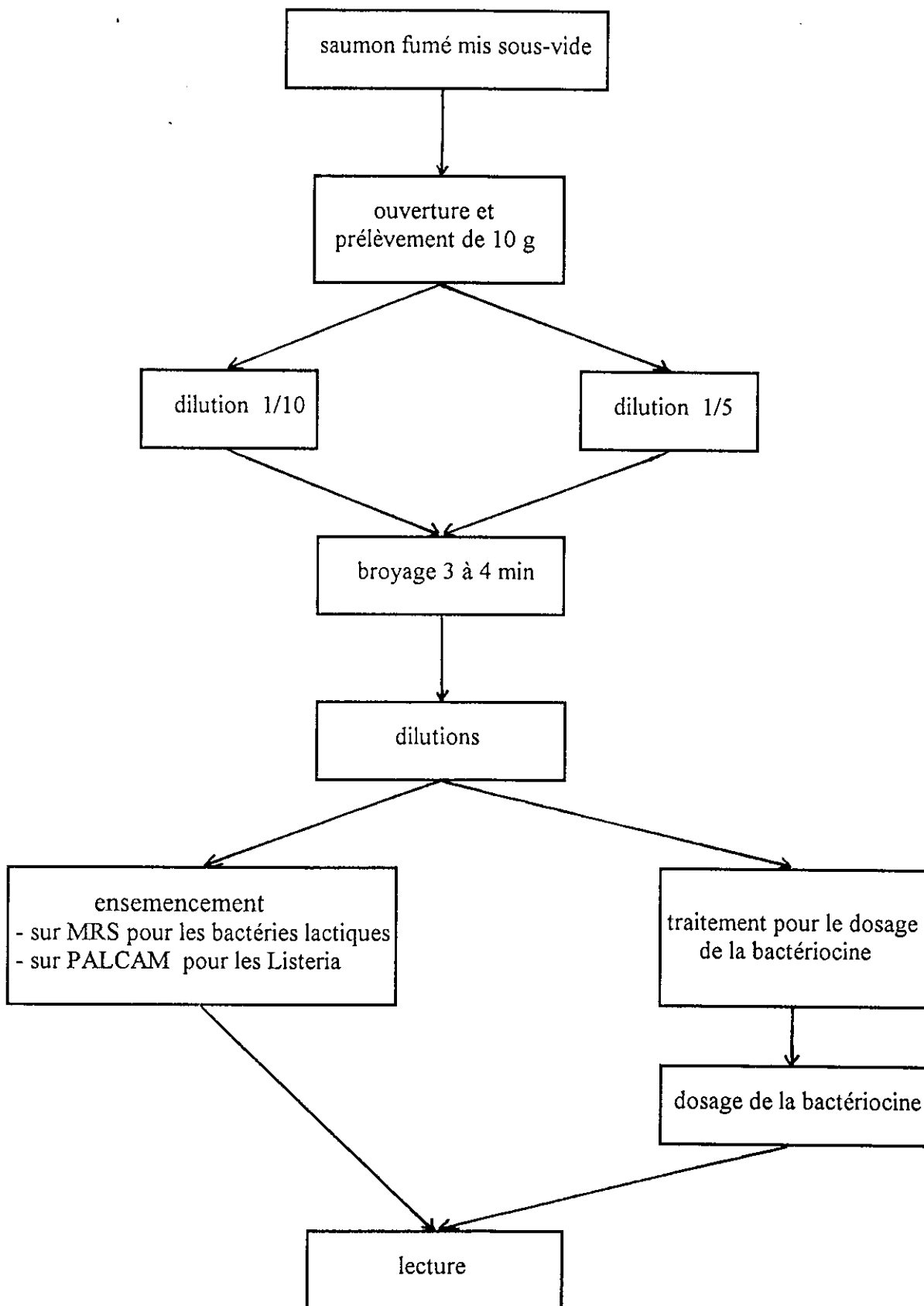
Les dilutions aux 1/5 servent

- pour le dosage de la bactériocine à partir du broyat, car une dilution plus faible nous permet de mieux doser les bactériocines ;

- pour le dénombrement des *Listeria* pour le témoin ou pour les échantillons, quand les *Listeria* sont en faible quantité.

- stomachage pendant 3 à 4 min .
- pipetage de 10 ml de filtrat en tubes stériles
- dilutions dans des tubes de 9 ml de tryptone-sel
- ensemencement des dilutions sur milieux gélosés appropriés
- incubation des boîtes
- lecture

Schéma 2 : PRELEVEMENT AU COURS DU STOCKAGE





Echantillon n°1, dénombrement :

- de la flore totale à t0
- de la flore lactique
- des *Listeria*

Echantillon n°2, dénombrement :

- de la flore lactique pour les expériences (d), (f), (i) et (j) (cf § 4-5)
- des *Listeria*

Echantillon n°3, dénombrement :

- de la flore lactique
- des *Listeria*
- des bactériocines

Echantillon n°4, dénombrement :

- de la flore lactique pour les expériences (e) et (h), (cf § 4 -5)
- des bactériocines

#### **4- 5 PLAN DE PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS**

##### **4 -5 -1 Temps de prélèvement**

Les prélèvements sont faits dans les heures qui suivent le lancement des manipulations (4 et 8 heures), puis après 24 heures et ensuite à des intervalles réguliers jusqu'à 10 ou 20 jours.

##### **4 -5 -2 Plan d'échantillonnage**

- a) échantillon avec du surnageant de fermenteur contenant la bactériocine + *Listeria innocua* F + Tryptone-sel salé à 3% de NaCl ;
- b) échantillon avec du surnageant de fermenteur contenant la bactériocine + *Listeria innocua* F + eau peptonée à 0% de NaCl ;
- c) échantillon avec du surnageant de fermenteur contenant la bactériocine + *Listeria innocua* S ;
- d) échantillon avec du surnageant de fermenteur contenant la bactériocine + *Listeria innocua* S, pendant 20 jours ;
- e) échantillon avec une culture de *Cb. divergens* V41, contenant la bactériocine + les cellules de *Cb. divergens* V41 + *Listeria innocua* S ;
- f) échantillon avec une culture de *Cb. divergens* V41, contenant la bactériocine + les cellules de *Cb. divergens* V41 + *Listeria innocua* S, pendant une durée de 20 jours ;  
et échantillon avec une suspension de culture lavée de *Cb. divergens* V41 + *Listeria innocua* S., pendant 20 jours ;
- g) échantillon avec du surnageant de fermenteur contenant la bactériocine + *Listeria monocytogenes* Scott A ;
- h) échantillon avec une culture de *Cb. divergens* V41, contenant la bactériocine + les cellules de *Cb. divergens* V41 + *Listeria monocytogenes* Scott A ;
- i) échantillon avec un précipité de culture de *Cb. divergens* V41 + *Listeria innocua* S ;
- j) échantillon de filet de saumon fumé, avec une culture de *Cb. divergens* V41 contenant la bactériocine + les cellules de V41 + *Listeria innocua* S.

## 5 - METHODES UTILISEES POUR METTRE EN EVIDENCE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES BACTERIOCINES SUR LES LISTERIA DANS LE FILET ENTIER DE SAUMON FUME

### 5 -1 PREPARATION DES ECHANTILLONS

Dans ce cas, on choisit de travailler avec des tranches de saumon fumé pour se rapprocher des conditions de commercialisation du produit.

### 5 -2 INOCULATION DES ECHANTILLONS

Nous utilisons, pour cette expérience, une culture de V41 de 30 heures préparée comme en § 2.

Taux d'inoculation :

<i>Listeria innocua</i> S :	10 <sup>4</sup> UFC/g
Culture de V41 :	5% (10 <sup>8</sup> UFC/g)

Selon les travaux de PELROY et coll (1993), nous avons utilisé la méthode "sandwich" en déposant 1 ml d'inoculum sur chaque face extérieure et 2 ml entre les deux tranches. Les dépôts se font à l'aide d'une pipette à la surface des filets.

Echantillon n°1 : filets + 4 ml de TS = **témoin**

Echantillon n°2 : filets + 4 ml d'une culture de *Listeria innocua* S diluée, soit 10<sup>4</sup> UFC/g

Echantillon n°3 : filets + 4 ml d'une culture de V41 + 10 µl de *Listeria innocua* S à 10<sup>8</sup> UFC/g.

# RESULTATS ET DISCUSSION

# A - IDENTIFICATION D'UNE SOUCHE ET CARACTERISTIQUES DU MILIEU SAUMON FUME

## 1 - IDENTIFICATION ET CARACTERISATION


L'analyse des 6 souches isolées du saumon fumé ( § 3 matériel et méthodes), a donné les résultats suivants :

Souches	Gram	Catalase	Oxydase	Test Camp	Galerie Api
1 à 6	Gram + petits bâtonnets par 2 ou en chaînette	+	-	-	<i>Listeria innocua</i>

Résultat de la galerie Api-Listeria :

REF

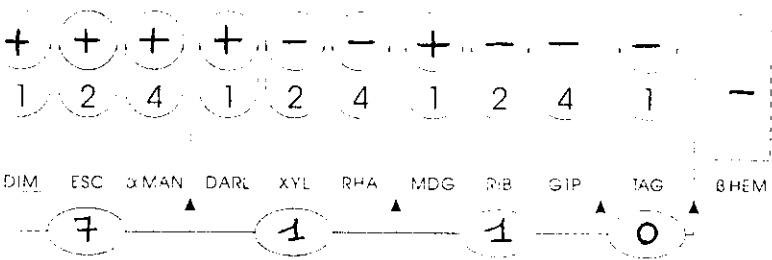
Origin / Source / Herkunft / Origen / Prelevo.



bioMérieux

---

**api Listeria**



Ident. :

*Listeria innocua*

Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests :

## 2 - CARACTERISTIQUES DU SAUMON FUME

### 2 -1 COMPOSITION

Des analyses biochimiques ont été réalisées à l'IFREMER sur trois lots de saumon fumé.

Les résultats sont les suivants :

Provenance	Date d'achat	Chlorures (en %)	Graisses (en %)	Eau (en %)
MIN de Nantes	06/04	2,41	14,41	61,92
Carrefour	24/05	3,94	10,14	62,72
Carrefour	06/06	2,75	18,23	58,01

Le saumon fumé du MIN qui semblait être fait de façon plus artisanale n'est pas plus salé que ceux de la marque Carrefour probablement sous-traitée par l'entreprise Narvik implantée en Bretagne. En effet, le salage se fait dans ce cas au sel sec, c'est-à-dire en recouvrant les filets de sel fin pendant une durée déterminée par l'expérience du fabricant. Ensuite le sel est éliminé à l'aide d'un jet d'eau.

De ce fait, on remarque une grande hétérogénéité des lots que ce soit dans la composition en eau et en matière grasse, que dans le taux de sel. D'une part, la composition du poisson frais est très variable suivant l'âge, le sexe, la saison et le lieu d'élevage de l'animal, mais elle dépend aussi des conditions opératoires du process de fabrication.

D'après ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que plus le poisson est gras, moins il absorbe de sel.

## 2 -2 FLORE TOTALE DES ECHANTILLONS

Etude de la flore totale dans les différents échantillons de saumon fumé :

Echantillon (1)	Flore totale (en UFC/g de chair)	Temps avant DLC (en jours)
Tests d'implantation	$3,3 \cdot 10^7$ et $2,0 \cdot 10^5$	23
a) surnageant, <i>L.innocua</i> F; 3%NaCl	$6,0 \cdot 10^4$	21
b)surnageant, <i>L.innocua</i> F	$6,5 \cdot 10^3$	22
c)surnageant, <i>L.innocua</i> S	$8,3 \cdot 10^6$	21
d)surnageant ; <i>L.innocua</i> S, 20 jours	$7,9 \cdot 10^5$	20
e)culture V41 ; <i>L.innocua</i> S	$1,2 \cdot 10^7$	13
f)culture V41 et culture lavée; <i>L.innocua</i> S, 20 jours	$4,0 \cdot 10^6$	19
g) et h)surnageant et culture ; <i>L.mono</i> Scott A	$5,0 \cdot 10^4$	10
i)précipité ; <i>L.innocua</i> S	$2,8 \cdot 10^6$	19
j)culture V41; <i>L.innocua</i> S, filet entier	$1,0 \cdot 10^7$	10

(1) a) ...j) - cf § 4 -5 -2 Matériel et Méthodes

Ce tableau permet de mettre en relation les taux de flore totale des échantillons avec chaque expérience correspondante et de constater l'hétérogénéité de la charge microbienne de la matière première.

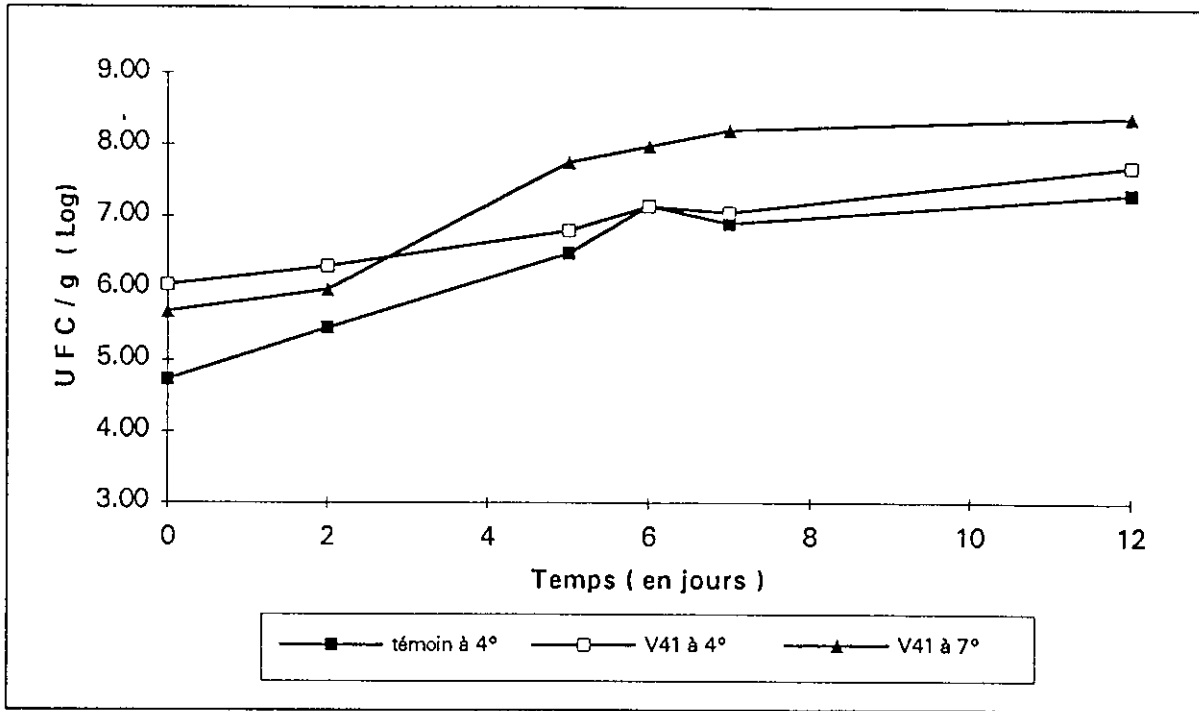


Figure 4: Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin et les échantillons ensemencés avec *Carnobacterium divergens* V41 au taux de  $10^6$  UFC/g au cours de leur stockage à 4°C et 7°C (moyenne sur 3 échantillons).

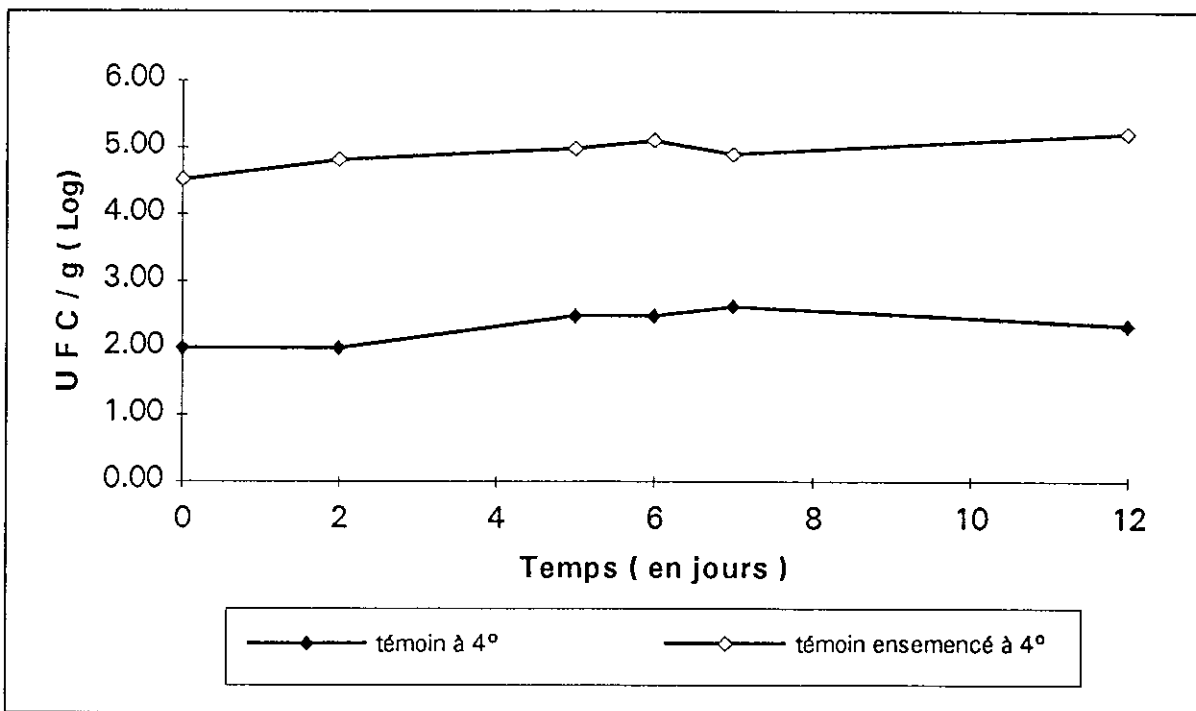


Figure 5: Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé du témoin et du témoin ensemencé avec *Listeria innocua* F au taux de  $3 \cdot 10^4$  UFC/g au cours de leur stockage à 4°C.

## B. EXPERIENCES SUR SAUMON FUME

### 1. TESTS D'IMPLANTATION

#### - Conditions de manipulation :

- Broyat : 70g de saumon fumé + 30g de tryptone-sel salé à 3% de NaCl
- Inoculum : *Cb.divergens* V41 au taux de  $10^6$  UFC/g  
*L.innocua* F au taux de  $3.10^4$  UFC/g
- Température de stockage : 4°C et 7°C.
- Temps de conservation : 12 jours.

#### - Evolution de la flore lactique (figure 4)

La population de bactéries lactiques dans les essais inoculés avec la culture V41, s'accroît de 1.7 Log UFC/g à 4°C et de 2.6 Log UFC/g à 7°C en 12 jours. La flore lactique du témoin non-ensemencé augmente de 2.6 Log UFC/g dans le même temps.

La courbe de croissance des bactéries lactiques de l'essai ensemencé avec *Carnobacterium divergens* V41 à 4°C est linéaire, il n'y a pas de phase exponentielle. Pour l'essai conservé à 7°C, on observe dans les 6 premiers jours, une augmentation de la population qui est deux fois supérieure à l'augmentation de la population de l'essai conservé à 4°C. A 7°C, on note la présence d'une phase exponentielle.

#### - Evolution des Listeria (figure 5)

La population en *Listeria innocua* F dans le témoin ensemencé évolue relativement peu à 4°C, puisqu'elle augmente seulement de 0.7 Log UFC/g en 12 jours.

Cette flore n'a pu être dénombrée que dans un seul des échantillons témoins. Dans ce cas, la population reste voisine du seuil de détection de 20 UFC/g. Pour les autres témoins, elle reste toujours inférieure à ce seuil.

Une des souches de Listeria du témoin dénombrable a été isolée et identifiée comme une souche de *Listeria innocua*. Elle sera ensuite ensemencée dans les essais ultérieurs et sera appelée *L. innocua S* en référence à son origine dans le saumon fumé.

#### - Conclusion

A 7°C la flore lactique se développe plus rapidement qu'à 4°C.

Enfin, *Listeria innocua* F se développe lentement à 4°C dans le saumon fumé broyé avec le tryptone-sel salé.

Nous choisirons donc de mener les expériences ultérieures à une température de 8°C, c'est-à-dire en simulant de mauvaises conditions de conservation.

**Tableau 3 : Etude de l'implantation des souches de *Carnobacterium divergens* V41 et de *Listeria innocua* F dans le saumon fumé :**

Evolution de la flore lactique :

Temps ( en jours )	Flore lactique du témoin à 4°C ( en Log )			moyenne
	0	5.7	4.2	
2	6.6	4.6	5.1	5.4
5	7.3	6.0	6.1	6.5
6	7.7	6.1	7.6	7.1
7	7.6	6.6	6.6	6.9
12	8.3	6.8	6.9	7.3

Temps ( en jours )	Flore lactique de V41 à 4°C ( en Log )			moyenne
	0	6.4	5.5	
2	6.7	6.1	6.1	6.3
5	7.2	6.5	6.7	6.8
6	7.2	7.4	6.8	7.1
7	7.0	7.4	6.7	7.0
12	7.6	8.2	7.3	7.7

Temps ( en jours )	Flore lactique de V41 à 7°C ( en Log )			moyenne
	0	6.5	5.3	
2	6.8	5.6	5.5	5.9
5	8.4	7.4	7.4	7.7
6	8.1	7.9	8.0	8.0
7	8.1	7.8	7.9	8.2
12	9.5	7.8	7.8	8.4

Evolution des *Listeria* :

Temps ( en jours )	Listeria du témoin à 4°C ( en Log )	
	0	2.0
2	2.0	
5	2.5	
6	2.5	
7	2.6	
12	2.3	

Temps ( en jours )	Listeria du témoinensemencé à 4°C moyenne sur 3 échantillons ( en Log )
0	4.5
2	4.8
5	4.9
6	5.1
7	4.9
12	5.2



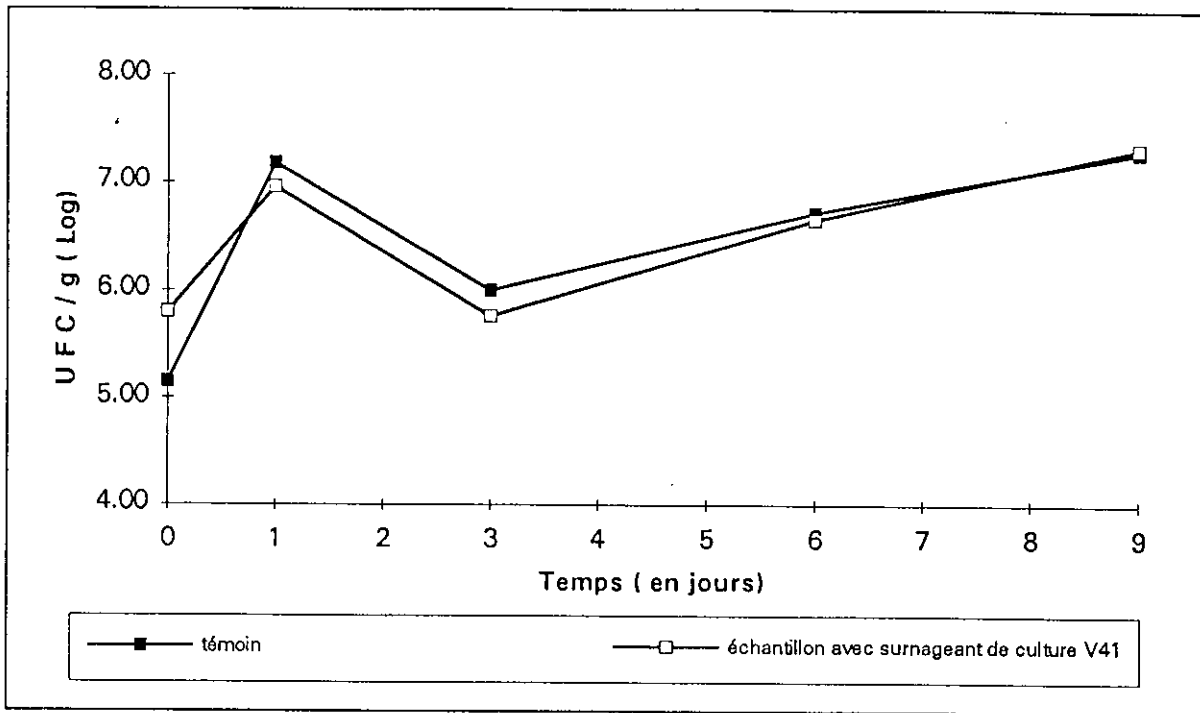


Figure 6: Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin et l'échantillon contenant le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C.

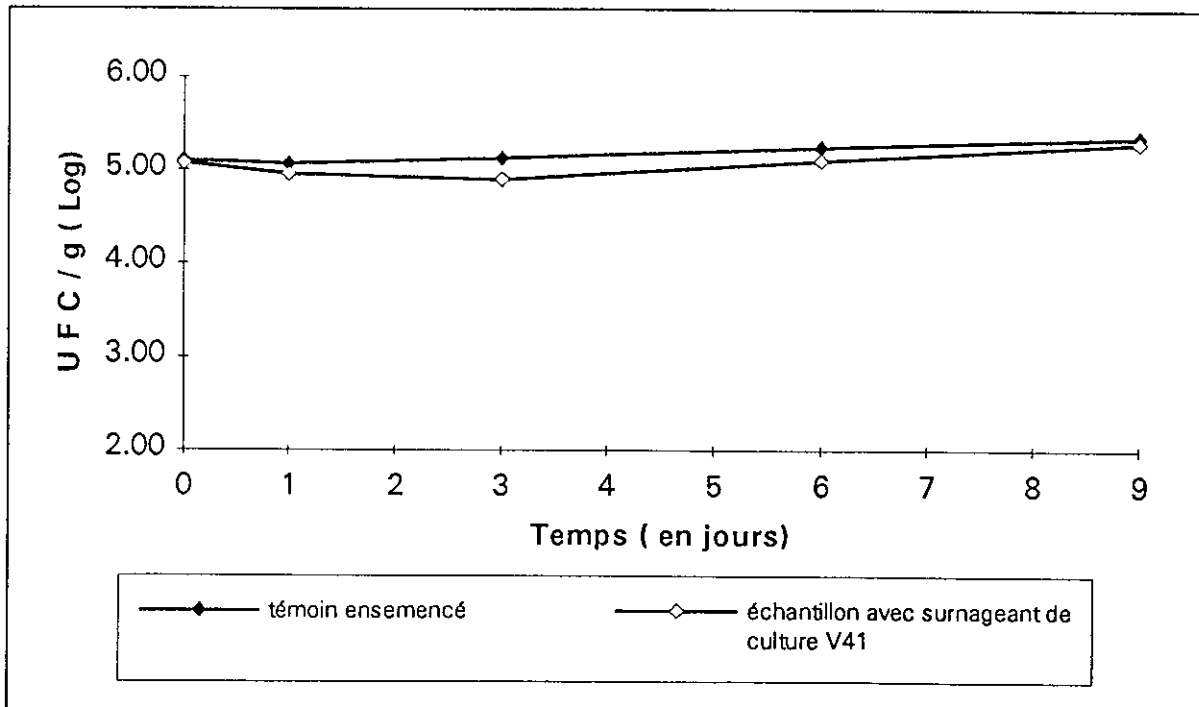


Figure 7: Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé ensemencé avec  $10^5$  UFC/g de *Listeria innocua* F dans le témoin et l'échantillon contenant le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C. (la population de *Listeria* du témoin reste inférieure à 20 UFC/g après 9 jours de stockage).

## 2. TESTS D'INHIBITION

### 2. 1. INHIBITION DE *LISTERIA INNOCUA* F DANS LE SAUMON FUME

#### 2. 1. 1 Chair broyée dans du tryptone-sel à 3% de NaCl

##### - Conditions de manipulation :

- Utilisation du surnageant de culture V41 au taux de 5% d'une activité en bactériocines de  $6.10^6$  UA/ml ( dosée sur *Listeria innocua* F)
- Broyat : 70g de saumon fumé +30g de tryptone-sel salé à 3% de NaCl
- Inoculum :  $10^5$  UFC de *Listeria innocua* F /g
- Température de stockage : 8°C
- Temps de conservation : 9 jours

##### - Evolution de la flore lactique (figure 6)

La flore lactique du témoin augmente de 2.1 Log UFC/g en 9 jours, alors que la flore lactique de l'échantillon avec surnageant de culture V41 s'accroît de 1.5 Log UFC/g pendant le même délai.

Les deux populations évoluent de la même façon ; il n'y a donc pas d'effet quant à la présence de bactériocines dans l'un des échantillons.

##### - Evolution des *Listeria* (figure 7)

La population en *Listeria innocua* F dans le témoin reste inférieure au seuil de détection de 20 UFC/g après 9 jours à 8°C.

Dans le témoin ensemencé il n'y a pas de croissance significative de cette souche. L'ajout de surnageant de culture *Cb.divergens* V41 au taux de 5% n'est pas à l'origine d'une inhibition de *Listeria innocua* F dans cet essai.

##### - Titre des bactériocines (tableau 4)

L'activité des bactériocines est dosée dans le milieu. Il apparaît que celle-ci reste dosable pendant les 24 premières heures.

##### - Conclusion

*Listeria innocua* F ne se développe pas dans ces conditions de milieu.

Nous avons donc décidé de remplacer le tryptone-sel salé en broyant le saumon fumé par du tryptone-sel sans ajout de NaCl.

**Tableau 4 : Etude de l'inhibition de *Listeria innocua* F par ajout de 5% de surnageant de culture *Cb.divergens* V41 dans le saumon fumé broyé dilué au 7/10 dans le tryptone-sel salé à 3%**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 9 jours :

Temps (en jours)	Flore lactique du témoin ( en Log )	Flore lactique de l'échantillon avec surnageant de culture V41 ( en Log )
0	5.1	5.8
1	7.2	6.9
3	6.0	5.7
6	6.7	6.6
9	7.3	7.3

Evolution des *Listeria* à 8°C pendant 9 jours :

Temps (en jours)	<i>Listeria</i> du témoin ( en Log )	<i>Listeria</i> du témoin ensemencé ( en Log )	<i>Listeria</i> de l'échantillon avec surnageant de culture V41 ( en Log )
0	<1.3	5.1	5.1
1	<1.3	5.0	4.9
3	<1.3	5.1	4.9
6	<1.3	5.2	5.1
9	<1.3	5.3	5.3

Titre des bactériocines ( activité en UA/ml) :

Temps (en jours)	Echantillon avec surnageant de culture V41	Témoin des bactériocines
0	4500	4500
0.16	1000	1000
0.32	500	500
1	ND	ND
3	ND	ND
6	ND	ND
9	ND	ND

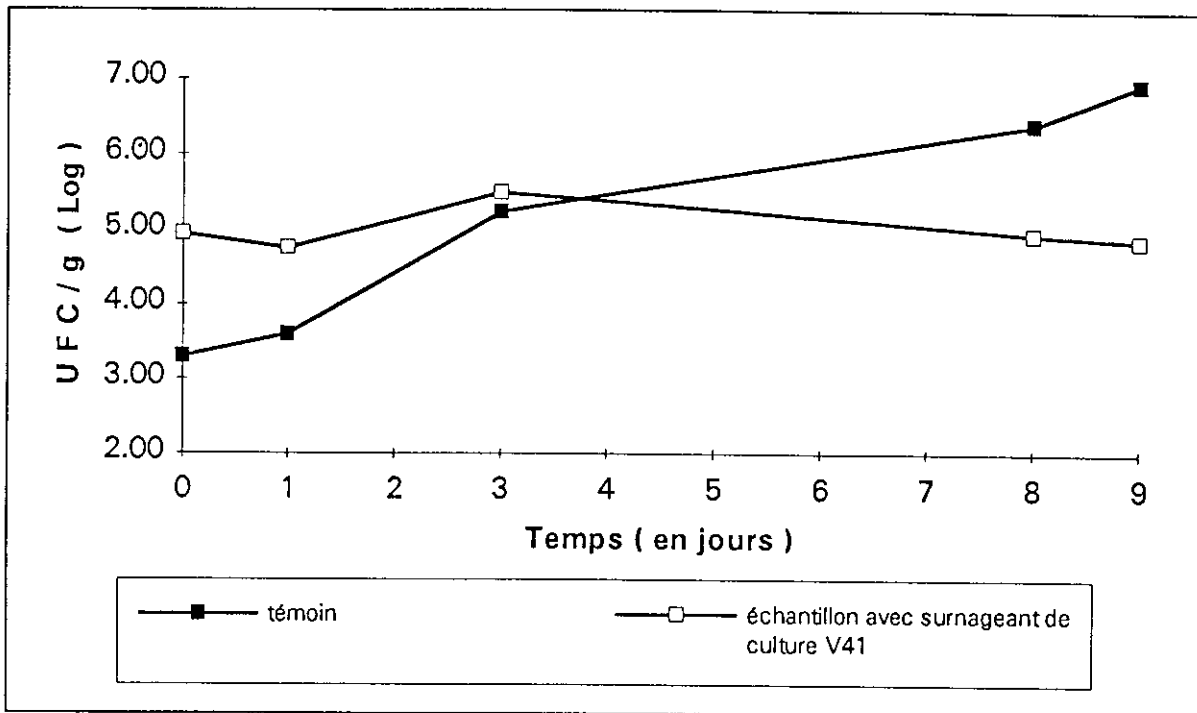


Figure 8: Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin et l'échantillon contenant le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C.

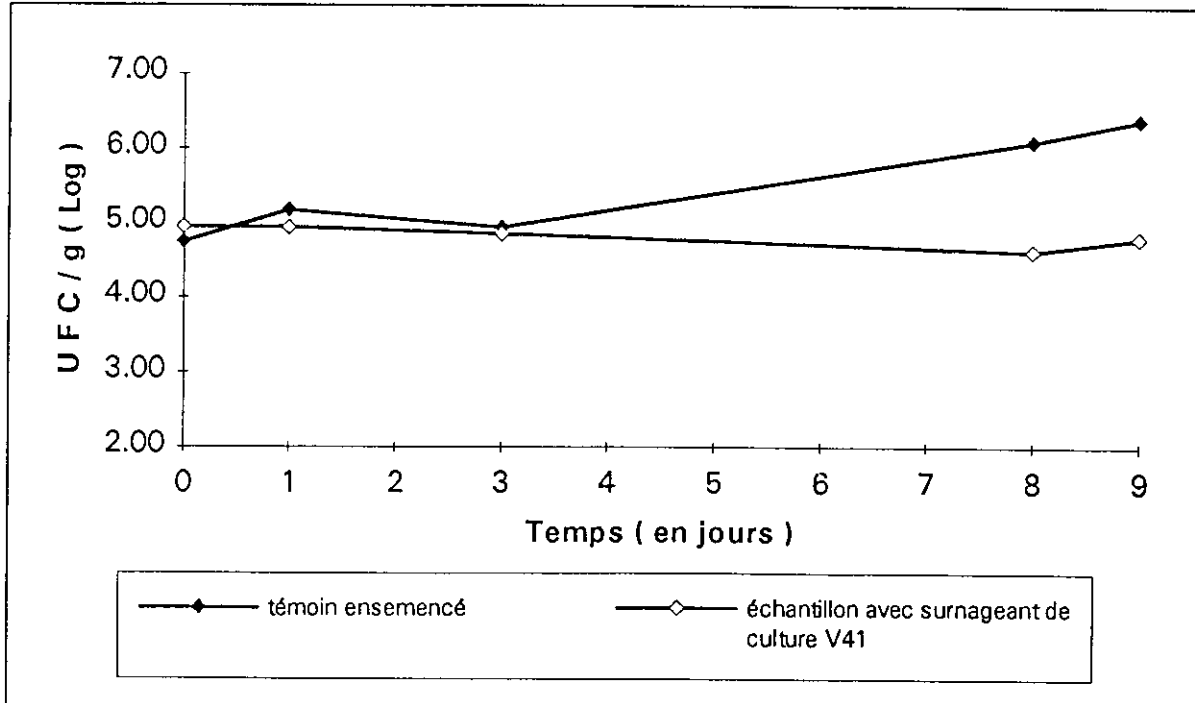


Figure 9: Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé ensemencé avec  $10^5$  UFC/g de *Listeria innocua* F dans le témoin ensemencé et l'échantillon contenant le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C ( la population de *Listeria* du témoin reste inférieure à 20 UFC/g après 9 jours de stockage).

## 2. 1. 2. Chair broyée dans de l'eau peptonée (0% de NaCl)

### - Conditions de manipulation :

- Utilisation du surnageant de culture V41 au taux de 5% d'une activité en bactériocines de  $6.10^6$  UA/ml ( dosée sur *Listeria innocua* F)
- Broyat : 70g de saumon fumé + 30g d'eau peptonée
- Inoculum :  $10^5$  UFC de *Listeria innocua* F /g
- Température de stockage : 8°C
- Temps de conservation : 9 jours

### - Evolution de la flore lactique (figure8)

La flore lactique du témoin augmente de 3.6 Log UFC/g en 9 jours, alors que cette même flore de l'échantillon avec surnageant de culture V41 ne se développe pas.

On peut penser que, dans ce cas, il y ait un effet bactériostatique des bactériocines sur la flore lactique dans le saumon fumé.

### - Evolution des *Listeria* (figure9)

La population en *Listeria innocua* F dans le témoin reste inférieure au seuil de détection de 20 UFC/g après 9 jours à 8°C. Dans le témoin ensemencé cette même flore s'accroît de 1.7 Log UFC/g.

A l'opposé, dans l'échantillon avec le surnageant de culture V41, il n'y a pas de développement des *Listeria* et on peut penser que la bactériocine manifeste un effet bactériostatique sur cette souche à partir du troisième jour de stockage.

En outre, la bactériocine semble inhiber la flore lactique. Cependant il est aussi possible, qu'il y ait une compétition entre la flore lactique et les *Listeria* qui expliquerait le faible développement de ces deux flores.

### - Titre des bactériocines (tableau 5)

L'activité des bactériocines est dosée dans le milieu. Il apparaît que celle-ci est seulement mise en évidence dans les 24 premières heures. Malgré ces résultats, l'inhibition vis à vis des *Listeria* se maintient pendant les 9 jours de stockage. On peut émettre l'hypothèse que la bactériocine se combine avec d'autres éléments du milieu dans un premier temps, puis est relarguée au cours du stockage.

### - Conclusion

Dans cet essai, on observe donc un effet inhibiteur de la bactériocine sur le développement de *L.innocua* F. Nous avons voulu savoir si cet effet s'exerçait sur d'autres souches de *Listeria* et en particulier sur celle isolée du saumon fumé.

**Tableau 5 : Etude de l'inhibition de *Listeria innocua* F par ajout de 5% de surnageant de culture *Cb.divergens* V41 dans le saumon fumé broyé dilué au 7/10 dans le tryptone-sel**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 9 jours :

TEMPS ( en jours )	Flore lactique du témoin ( en Log )	Flore lactique de l'échantillon avec surnageant de culture V41 ( en Log )
0	3.3	4.9
0.16	-	4.7
0.32	-	5.5
1	3.6	4.9
3	5.2	4.8
8	6.4	4.6
9	6.9	4.8

Evolution des *Listeria* à 8°C pendant 9 jours :

TEMPS ( en jours )	<i>Listeria</i> du témoin ( en Log )	<i>Listeria</i> du témoin ensemencé ( en Log )	<i>Listeria</i> de l'échantillon avec surnageant de culture V41 ( en Log )
0	<1.3	4.7	4.9
0.16	-	4.9	4.7
0.32	-	-	5.5
1	<1.3	5.2	4.9
3	<1.3	4.9	4.8
8	<1.3	6.1	4.6
9	<1.3	6.4	4.8

Titre des bactériocines ( activité en UA/ml ) :

TEMPS ( en jours )	Echantillon avec surnageant de culture V41	Témoin des bactériocines
0	4000	4000
0.16	1000	1000
0.32	1000	-
1	1000	500
3	ND	ND
8	ND	ND
9	ND	ND

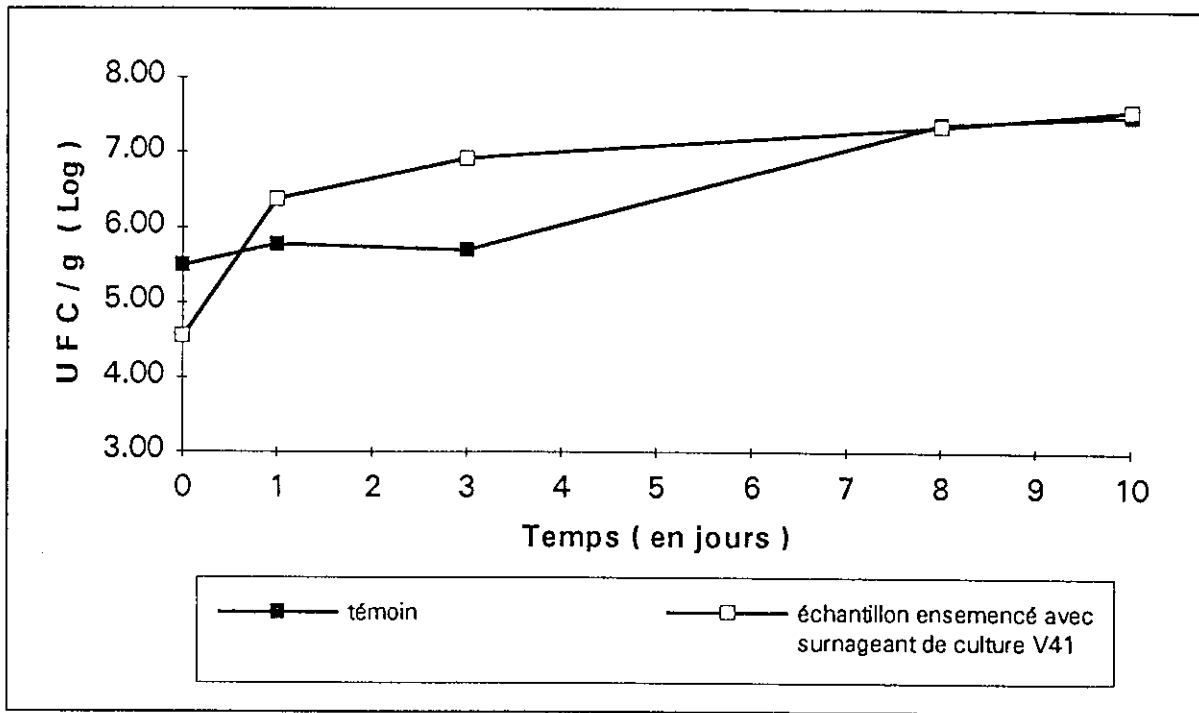


Figure 10: Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin et l'échantillon ensemencé en *Listeria* contenant le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C.

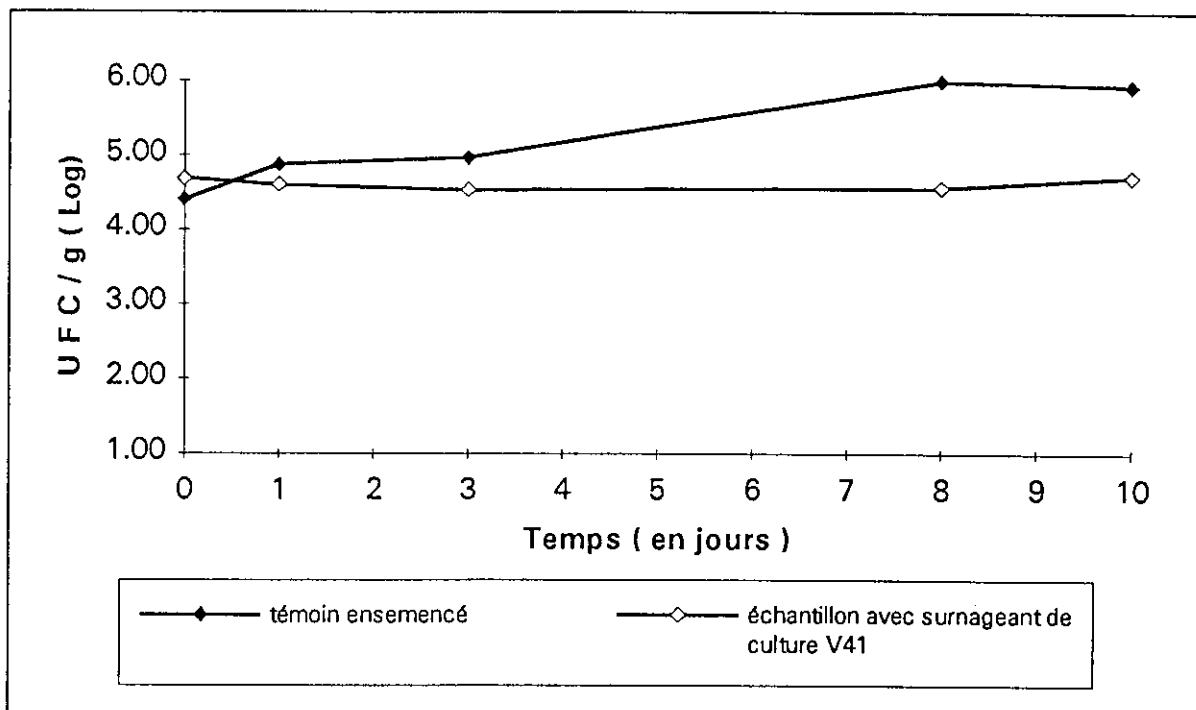


Figure 11: Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé ensemencé avec  $4.10^4$  UFC/g de *Listeria innocua* S dans le témoin ensemencé et l'échantillon contenant le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C (la population de *Listeria* du témoin reste inférieure à 20 UFC/g après 9 jours de stockage).

## 2. 2. INHIBITION DE *LISTERIA INNOCUA* S DANS LE SAUMON FUME

### 2. 2. 1 Chair broyée dans de l'eau peptonée

#### 2. 2. 1. 1 Par ajout de surnageant de culture

##### - Conditions de manipulation:

- Utilisation du surnageant de culture V41 au taux de 5% d'une activité en bactériocines : de  $6.10^6$  UA/ml (dosée sur *Listeria innocua* F)
- Broyat : 70g de saumon fumé + 30g d'eau peptonée
- Inoculum :  $4.10^4$  UFC de *Listeria innocua* S /g
- Température de stockage : 8°C
- Temps de stockage : 10 jours.

##### - Evolution de la flore lactique (figure 10)

Dans ces conditions, la flore lactique du témoin et de l'échantillonensemencé avec le surnageant de culture V41 se développe pendant les 10 jours de stockage pour atteindre 7.5 Log UFC/g environ dans le témoin et l'échantillon avec bactériocine.

##### - Evolution des *Listeria* (figure 11)

La population en *Listeria* dans le témoin reste toujours inférieure au seuil de détection de 20 UFC/g pendant ces 10 jours de conservation du saumon fumé à 8°C.

Cette même flore s'accroît de 1.5 Log UFC/g dans le témoinensemencé. L'ajout de 5% de surnageant de culture V41 inhibe le développement de cette souche après 10 jours de stockage.

On note une différence de 1.2 Log UFC/g entre les deux populations au bout de 10 jours.

##### - Titre des bactériocines (tableau 6)

Le titre en bactériocine de 4000 UA/ml est équivalent à celui de l'expérience précédente. On ne détecte plus d'activité après 24 heures de conservation du saumon fumé.

##### - Conclusion

Il apparaît donc un effet inhibiteur de cette substance sur le développement de *L. innocua* S dans le saumon fumé. Néanmoins, il serait souhaitable de réaliser un dénombrement de la flore lactique dans le témoinensemencé en *Listeria* pour confirmer ces résultats et d'allonger le temps de conservation des échantillons à 20 jours.



**Tableau 6 : Etude de l'inhibition de *Listeria innocua* S par ajout de 5% de surnageant de culture *Cb.divergens* V41 dans le saumon fumé broyé dilué au 7/10 dans le tryptone-sel**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 10 jours :

Temps (en jours)	Flore lactique du témoin (en Log)	Flore lactique de l'échantillon avec surnageant de culture V41 (en Log)
0	5.5	4.5
0.16	-	4.1
0.32	-	5.3
1	5.7	6.4
3	5.7	6.9
8	7.4	7.3
10	7.5	7.6

Evolution des *Listeria* à 8°C pendant 10 jours :

Temps (en jours)	<i>Listeria</i> du témoin (en Log)	<i>Listeria</i> du témoin ensemencé (en Log)	<i>Listeria</i> de l'échantillon avec surnageant de culture V41 (en Log)
0	< 1.3	4.4	4.7
0.16	-	4.8	4.7
0.32	-	-	4.6
1	< 1.3	4.9	4.6
3	< 1.3	4.9	4.5
8	< 1.3	6.0	4.5
10	< 1.3	5.9	4.7

Titre des bactériocines (activité en UA/ml) :

Temps (en jours)	Echantillon avec surnageant de culture V41	Témoin des bactériocines
0	4000	4000
0.16	1500	1000
0.32	1000	1000
1	ND	ND
3	ND	ND
8	ND	ND
10	ND	ND

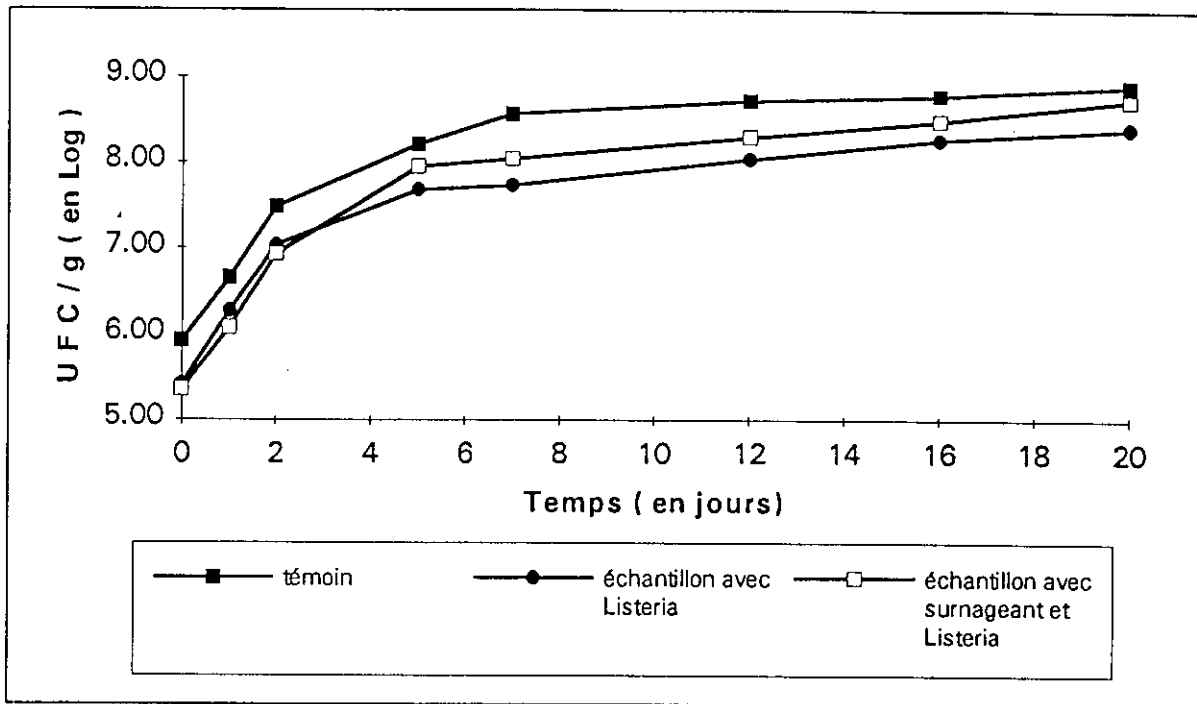


Figure 12: Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin, l'échantillon ensemencé en *Listeria* et l'échantillon ensemencé avec *Listeria innocua* S et *Cb.divergens* V41 au cours de leur stockage à 8°C.

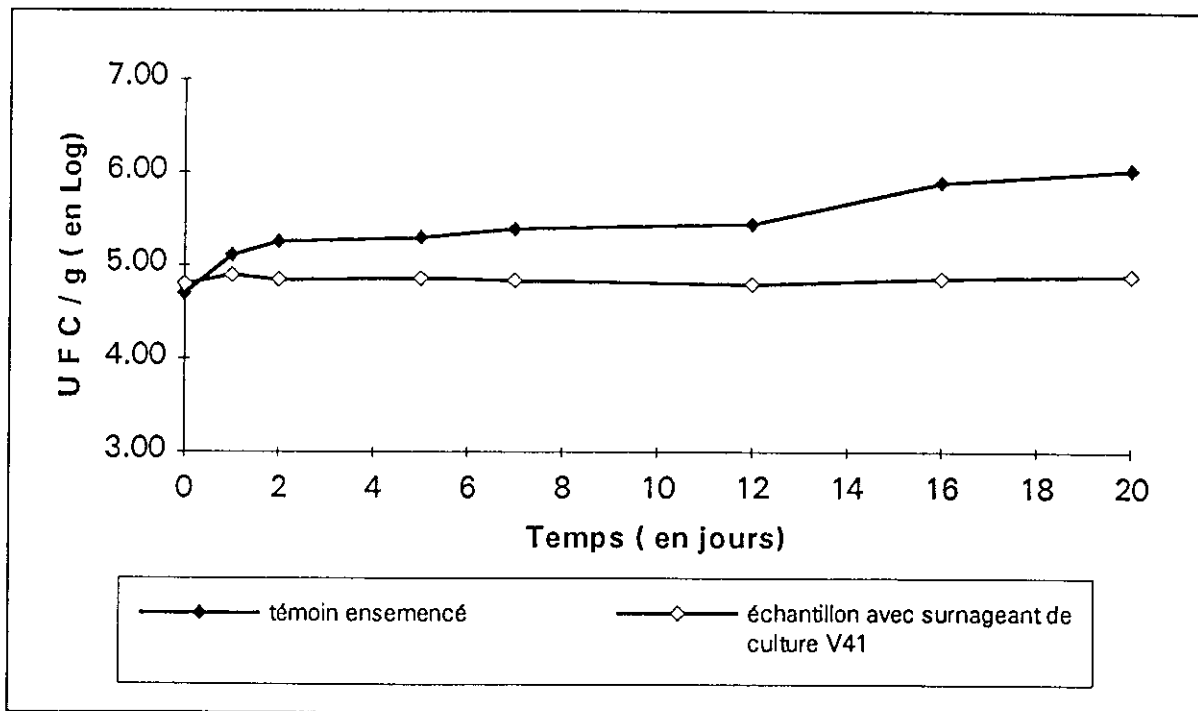


Figure 13: Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé ensemencé avec  $6.10^4$  UFC/g de *Listeria innocua* S dans le témoin et l'échantillon contenant le surnageant de culture *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C (la population de *Listeria* du témoin reste inférieure à 10 UFC/g après 20 jours de stockage).

Pour se placer dans les conditions de durée de conservation du saumon fumé commercialisé, l'expérience a été répétée sur une durée de 20 jours.

**- Conditions de manipulation : identiques aux précédentes**

**- Evolution de la flore lactique (figure 12)**

Dans ces conditions, la flore lactique du témoin, de l'échantillon avec *Listeria* et de l'échantillon avec le surnageant de culture se développe pendant les 20 jours de stockage pour atteindre respectivement 8.9 Log UFC/g, 8.4 Log UFC/g et 8.7 Log UFC/g, soit un accroissement de 3 Log UFC/g de cette population. Nous n'observons pas de différence significative dans l'évolution des flores lactiques des échantillons avec *Listeria* seule ou avec *Listeria* et surnageant de culture.

**- Evolution des *Listeria* (figure 13)**

La population en *Listeria* dans le témoin reste toujours inférieure au seuil de détection de 10 UFC/g pendant ces 20 jours de conservation du saumon fumé à 8°C.

Cette même flore s'accroît de 1.3 Log UFC/g dans le témoin ensemencé pendant le même délai. Enfin, cette population ne se développe pas, lorsqu'il y a ajout de 5% de surnageant de culture de *Cb.divergens* V41.

Ces résultats confirment donc ceux trouvés précédemment et ceci sur une durée plus longue. Après 20 jours, la différence entre l'échantillon *Listeria* et l'échantillon surnageant + *Listeria* est de 1.1 Log UFC/g.

**- Titre des bactériocines (tableau 7)**

L'activité des bactériocines est dosée dans le milieu. Il apparaît que celle-ci est seulement mise en évidence dans les 24 premières heures. Malgré ces résultats, l'inhibition vis à vis des *Listeria* se maintient pendant les 20 jours de stockage. Là encore, on peut émettre l'hypothèse du relargage de la bactériocine pendant le stockage.

**- Conclusion**

Nous allons chercher à optimiser l'activité de cette bactériocine en testant l'hypothèse d'une meilleure activité en ajoutant simultanément le surnageant et les cellules de la culture V41 dans le saumon fumé.

**Tableau 7 : Etude de l'inhibition de *Listeria innocua* S par ajout de 5% de surnageant de culture *Cb.divergens* V41 dans le saumon fumé broyé dilué au 7/10 dans le tryptone-sel**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 20 jours :

Temps (en jours)	Flore lactique du témoin non ensemencé (en Log)	Flore lactique de l'échantillon avec <i>Listeria</i> (en Log)	Flore lactique de l'échantillon avec surnageant et <i>Listeria</i> (en Log)
0	5.9	5.4	5.3
0.2	6.1	5.6	5.4
1	6.6	6.3	6.1
2	7.5	7.0	6.9
5	8.2	7.7	7.9
7	8.5	7.7	8.0
12	8.7	8.0	8.3
16	8.8	8.2	8.5
20	8.9	8.4	8.7

Evolution des *Listeria* à 8°C pendant 20 jours :

Temps (en jours)	<i>Listeria</i> du témoin (en Log)	<i>Listeria</i> du témoin ensemencé (en Log)	<i>Listeria</i> de l'échantillon contenant le surnageant de V41 (en Log)
0	<1	4.7	4.8
0.2	<1	4.9	5.0
1	<1	5.1	4.9
2	<1	5.3	4.8
5	<1	5.3	4.9
7	<1	5.4	4.8
12	<1	5.4	4.8
16	<1	5.9	4.8
20	<1	6.0	4.9

Titre des bactériocines (activité en UA/ml) :

Temps (en jours)	Echantillon avec surnageant de culture V41	Témoin des bactériocines
0	2000	2000
0.2	2000	2000
1	ND	ND
2	ND	ND
5	ND	ND
7	ND	ND
12	ND	ND
16	ND	ND
20	ND	ND

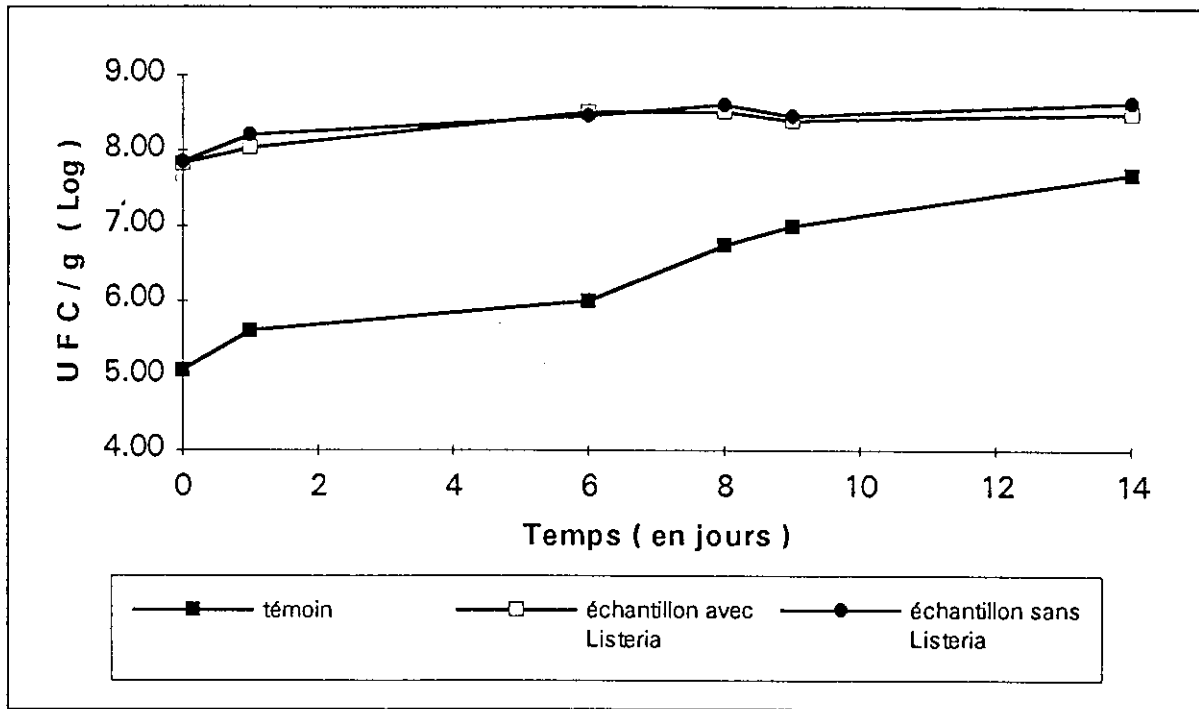


Figure 14: Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin, l'échantillon ensemencé avec *Listeria innocua* S et la culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% et l'échantillon ensemencé avec *Cb.divergens* V41 au cours de leur stockage à 8°C.

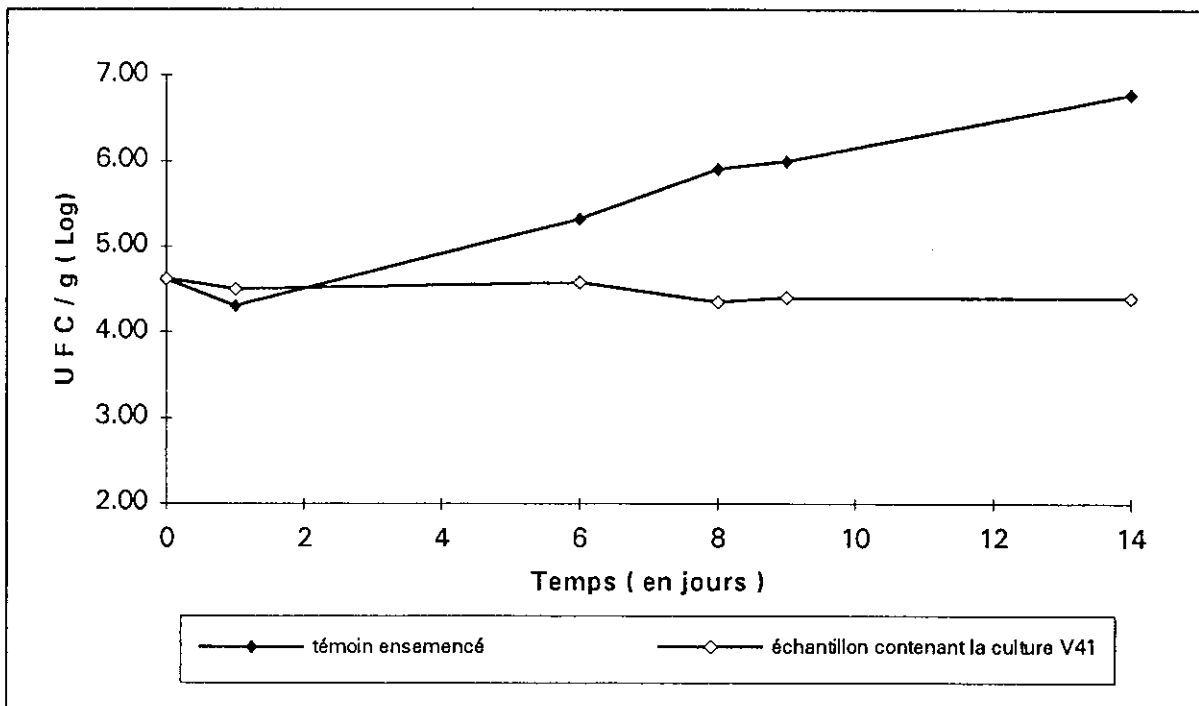


Figure 15: Evolution des Listeria du saumon fumé broyé ensemencé avec  $4 \cdot 10^4$  UFC/g de *Listeria innocua* S dans le témoin et l'échantillon contenant la culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C (la population de Listeria du témoin reste inférieure à 20 UFC/g après 9 jours de stockage).

## 2. 2. 1. 2 Par ajout de culture ( cellules + bactériocines)

### - Conditions de manipulation :

- Ajout de 5% d'une culture de V41 en fermenteur en début de phase stationnaire d'une activité de  $10^6$  UA/ml (dosée sur *Listeria innocua* F) et de  $10^4$  UA/ml ( dosée sur *Cb.piscicola* NCDO 2762)
- Broyat : 70g de saumon fumé + 30g d'eau peptonée
- Utilisation de *Listeria innocua* S au taux de  $5 \cdot 10^4$  UFC/g
- Température de stockage : 8°C
- Temps de stockage : 14 jours

### - Evolution de la flore lactique (figure 14)

Dans ces conditions, la flore lactique du témoin et des échantillonsensemencés avec la culture avec ou sans *Listeria*, se développe pendant les 14 jours de stockage pour atteindre 7.7 Log UFC/g dans le témoin, 8.5 Log UFC/g dans l'échantillonensemencé en *Listeria* et 8.7 Log UFC/g dans l'échantillon sans *Listeria*. Dans ces deux derniers échantillons, un palier est atteint et ainsi la croissance est très faible.

### - Evolution des *Listeria* (figure 15)

La population en *Listeria* dans le témoin reste toujours inférieure au seuil de détection de 20 UFC/g pendant ces 14 jours de conservation du saumon fumé à 8°C. Dans le témoinensemencé celle-ci s'accroît de 2.2 Log UFC/g et atteint 6.8 Log UFC/g à la fin du même délai.

Enfin, cette flore est de nouveau inhibée dans l'échantillon où on ajoute 5% de culture V41. On observe une différence importante de 2,4 Log UFC/g entre les deux échantillons.

### - Titre des bactériocines (tableau 8)

Le tableau des titres en bactériocines montre que pendant les premières heures, la cultureensemencée était bien active. De plus, il met en évidence que la soucheensemencée V41 est capable de produire de la bactériocine dans le saumon fumé conservé dans ces conditions. De plus, la production est identique qu'il y ait ou non des *Listeria* dans l'échantillon.

### - Conclusion

Ces résultats montrent l'effet inhibiteur du mélange cellules-bactériocines. L'inhibition empêche tout développement des *Listeria*, qui par contre poussent très bien dans le témoinensemencé en augmentant de 2 Log UFC/g en 14 jours. La différence de la population finale en *Listeria* entre le témoin et l'échantillon avec la culture est supérieure à celle trouvée avec l'utilisation du surnageant (2.4 contre 1.2 Log UFC/g).

Nous avons voulu ensuite vérifier ce résultat sur une période plus longue, et analyser l'action des bactériocines en utilisant une culture lavée.

**Tableau 8 : Etude de l'inhibition de *Listeria innocua* S par ajout de 5% d'une culture de *Cb.divergens* V41 dans le saumon fumé broyé dilué au 7/10 dans le tryptone-sel**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 14 jours :

Temps (en jours)	Flore lactique du témoin non ensemencé (en Log)	Flore lactique de l'échantillon avec culture V41 et <i>Listeria</i> (en Log)	Flore lactique de l'échantillon avec culture V41 seule (en Log)
0	5.1	7.8	7.8
0.16	-	7.8	7.9
0.32	-	-	-
1	5.6	8.0	8.2
6	6.0	8.5	8.4
8	6.7	8.5	8.6
9	7.0	8.4	8.4
14	7.7	8.5	8.6

Evolution des *Listeria* à 8°C pendant 14 jours :

Temps (en jours)	<i>Listeria</i> du témoin (en Log)	<i>Listeria</i> du témoin ensemencé (en Log)	<i>Listeria</i> de l'échantillon contenant la culture V41 (en Log)
0	<1.3	4.6	4.6
0.16	-	4.6	4.5
0.32	-	-	4.5
1	<1.3	4.3	4.5
6	<1.3	5.3	4.6
8	<1.3	5.9	4.4
9	<1.3	6.0	4.4
14	<1.3	6.8	4.4

Titre des bactériocines (activité en UA/ml) :

Temps (en jours)	L'échantillon contenant la culture V41	Témoin des bactériocines
0	2500	2500
0.16	2000	2000
0.32	2000	2000
1	4000	4000
6	4000	4000
8	8000	8000
9	4000	4000
14	8000	8000

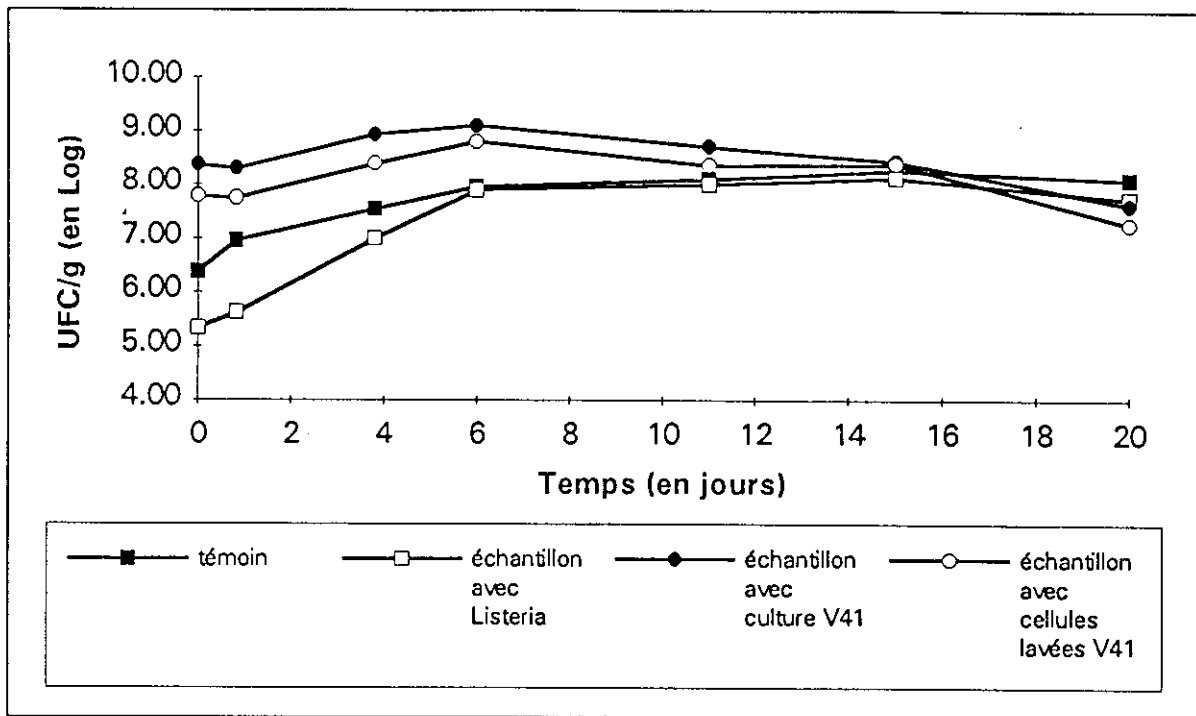


Figure 16 : Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin, l'échantillon ensemencé en *Listeria*, l'échantillon contenant la culture V41 au taux de 5% et l'échantillon contenant les cellules lavées de V41 au taux de 0.5% au cours de leur stockage à 8°C.

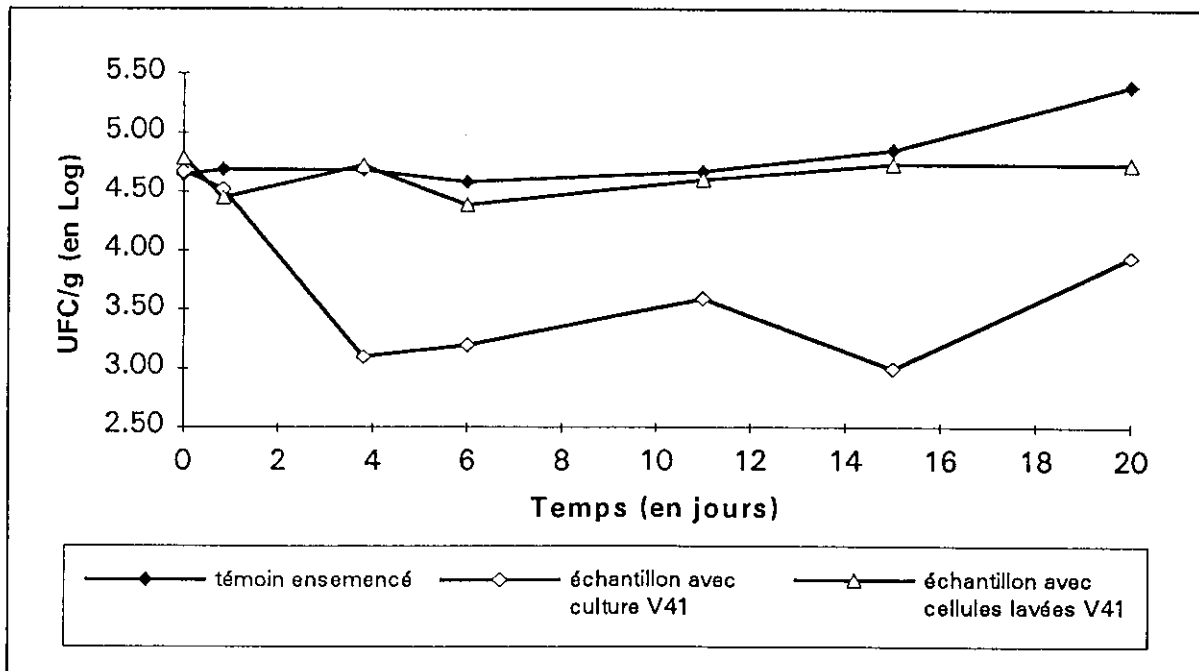


Figure 17 : Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé ensemencé avec  $4.10^4$  UFC/g de *Listeria innocua* F dans le témoin, l'échantillon contenant la culture V41 au taux de 5% et l'échantillon contenant les cellules lavées de V41 au taux de 0.5%, au cours de leur stockage à 8°C. ( la population de *Listeria* du témoin reste inférieure à  $10^4$  UFC/g après 20 jours de stockage).



### 2.2.1.3. Par ajout de culture et par ajout de cellules lavées

#### - Conditions de manipulation

- Utilisation : \* de 5% d'une culture de V41 de fermenteur en début de phase stationnaire d'une activité de  $10^6$  UA/ml ( dosée contre *L. innocua*) et de  $10^5$  UA/ml ( dosée contre *Cb.piscicola* NCDO 2762)
  - \* de 0,5% d'une culture lavée de V41 débarrassée des bactériocines
- Broyat : 70g de saumon fumé + 30g d'eau peptonée
- Inoculum :  $4.10^4$  UFC de *Listeria innocua* S / g
- Température de stockage : 8°C
- Temps de stockage : 20 jours

#### - Evolution de la flore lactique (figure 16)

La flore lactique du témoin et des échantillons se développe pendant les 6 premiers jours de stockage avec une croissance régulière pour le témoin et l'échantillon ensemencé en *Listeria* puis atteint le niveau de la phase stationnaire.

Par contre pour les échantillons ensemencés avec *Cb. divergens* V41 sous forme de culture ou de culture lavée, on observe un maximum de développement au sixième jour puis une diminution de cette population. Cette décroissance peut correspondre à une fin de phase stationnaire et au début d'une phase de déclin.

On remarque que dans l'échantillon ensemencé en *Listeria innocua* S, la présence de cette flore ne gêne en rien la croissance de la flore lactique. Il n'apparaît pas y avoir de compétition dans ce cas.

Les cellules lavées sont capables de se développer dans le broyat de poisson malgré le stress qu'elles ont subi lors de leur préparation.

#### - Evolution des *Listeria* (figure 17)

La population en *Listeria* du témoin reste inférieure au seuil de détection de 10 UFC/g.

Les *Listeria innocua* S ensemencées dans le témoin se développent peu et atteignent un niveau de 5.4 Log UFC/g après 20 jours , alors que dans l'expérience précédente, cette population était de 6,7 Log UFC/g après 14 jours. Nous sommes donc en présence d'une culture probablement gênée dans sa croissance soit à cause d'un stress lié à la composition du milieu (NaCl par exemple), soit à cause d'une flore initiale compétitive vis-à-vis de cette souche.

**Tableau 9 : Etude de l'inhibition de *Listeria innocua* S par ajout de 5% d'une culture de *Cb. divergens* V41 et par ajout d'une culture lavée de *Cb. divergens* V41 dans le saumon fumé broyé dilué au 7/10 dans le tryptone-sel**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 20 jours

Temps (en jours)	Flore lactique du témoin (en Log)	Flore lactique de l'échantillon avec <i>Listeria</i> (en Log)	Flore lactique de l'échantillon contenant la culture V41 et <i>Listeria</i> (en Log)	Flore lactique de l'échantillon contenant la culture lavée V41 et <i>Listeria</i> (en Log)
0	6.4	5.3	8.3	7.8
0.83	6.9	5.6	8.3	7.7
3.8	7.5	7.0	8.9	8.4
6	7.9	7.9	9.1	8.8
11	8.1	8.0	8.7	8.4
15	8.3	8.1	8.8	8.4
20	8.1	7.7	7.6	7.3

Evolution des *Listeria* à 8°C pendant 20 jours

Temps (en jours)	<i>Listeria</i> du témoin (en Log)	<i>Listeria</i> de l'échantillon ensemencé avec <i>Listeria</i> (en Log)	<i>Listeria</i> de l'échantillon contenant la culture V41 et <i>Listeria</i> (en Log)	<i>Listeria</i> de l'échantillon contenant la culture lavée V41 et <i>Listeria</i> (en Log)
0	<1	4.6	4.7	4.8
0.83	<1	4.7	4.5	4.4
3.8	<1	4.7	3.1	4.7
6	<1	4.9	3.2	4.4
11	<1	4.7	3.6	4.6
15	<1	4.8	3.0	4.7
20	<1	5.4	3.9	4.7

Titre des bactériocines ( activité en UA/ml )

Temps (en jours)	Echantillon contenant la culture V41	Echantillon contenant la culture lavée V41
0	4000	ND
0.83	2000	ND
3.8	4000	ND
6	4000	ND
11	8000	ND
15	4000	ND
20	4000	ND

Dans l'échantillon contenant la culture de V41 et les *Listeria*, on note dans les quatre premiers jours, une chute de la population de *Listeria* contrairement aux expériences précédentes où la flore des *Listeria* ne croissait pas mais ne décroissait pas. Ceci est certainement lié au fait que les *Listeria* semblent fragilisées et sont donc plus sensibles aux bactériocines.

Cependant après 20 jours, on remarque une augmentation de cette population tout comme dans le témoin. Ce changement correspond peut-être à une modification du milieu ou à une adaptation de la flore. Il est aussi possible que lorsque la flore lactique atteint la phase de déclin, les *Listeria* prennent le dessus.

Dans l'échantillon contenant la culture lavée de V41 donc débarrassée des bactériocines, on constate que l'effet bactéricide n'est pas présent mais que toutefois la population de *Listeria* ne croît pas. De plus, la population de *Listeria* à J 20 contrairement aux autres échantillons ne croît pas, on peut ainsi penser qu'à la fin du délai de stockage, les cellules de V41 ont commencé à produire de la bactériocine, dans des doses non détectables par notre méthode de dosage. Cependant, cette différence qui n'apparaît que sur un seul point, n'est peut-être pas significative.

#### - Titre des bactériocines (tableau 9)

Pour l'échantillon contenant la culture V41, il apparaît une production de bactériocine qui confirme les résultats obtenus dans l'expérience précédente. De plus, on a observé que les cellules lavées pouvaient pousser dans le saumon fumé mais par contre, nous n'avons pas pu détecter la présence de bactériocine dans cet échantillon. Soit le lavage les a stressées et elles ne produisent pas de bactériocine, soit la production est à un taux trop faible pour être détectable.

#### - Conclusion

Cette expérience permet de confirmer le fait qu'une culture non-lavée de *Cb. divergens* V41 ajoutée au poisson est capable de produire des bactériocines.

Dans ce cas, il y a réellement un effet inhibiteur de cette population sur les *Listeria innocua* S. Cependant lorsque la culture est débarrassée des bactériocines, l'effet est encore bactériostatique et non bactéricide, ce qui nous permet de dire que le couple cellules-bactériocines est plus efficace.

Nous avons maintenant voulu voir, si l'inhibition observée grâce au surnageant et à la culture pouvait être améliorée avec de la bactériocine pré purifiée après précipitation.

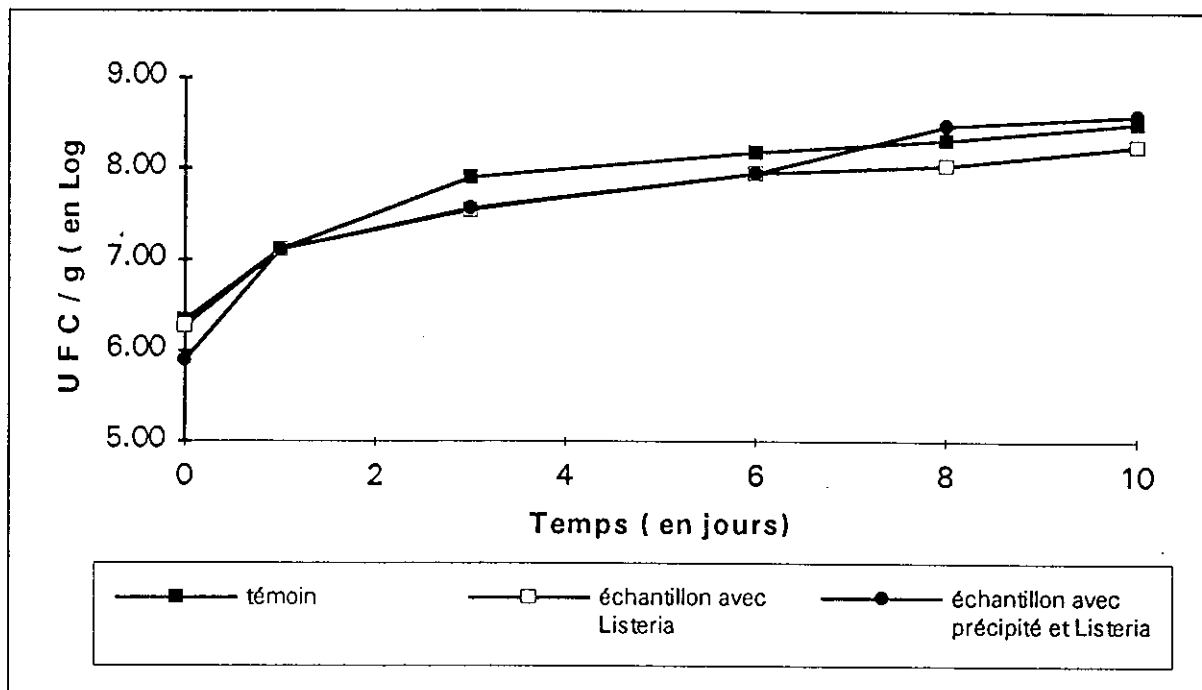


Figure 18: Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin, l'échantillon ensemencé avec *Listeria innocua* S et l'échantillon contenant du précipité de culture *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C.

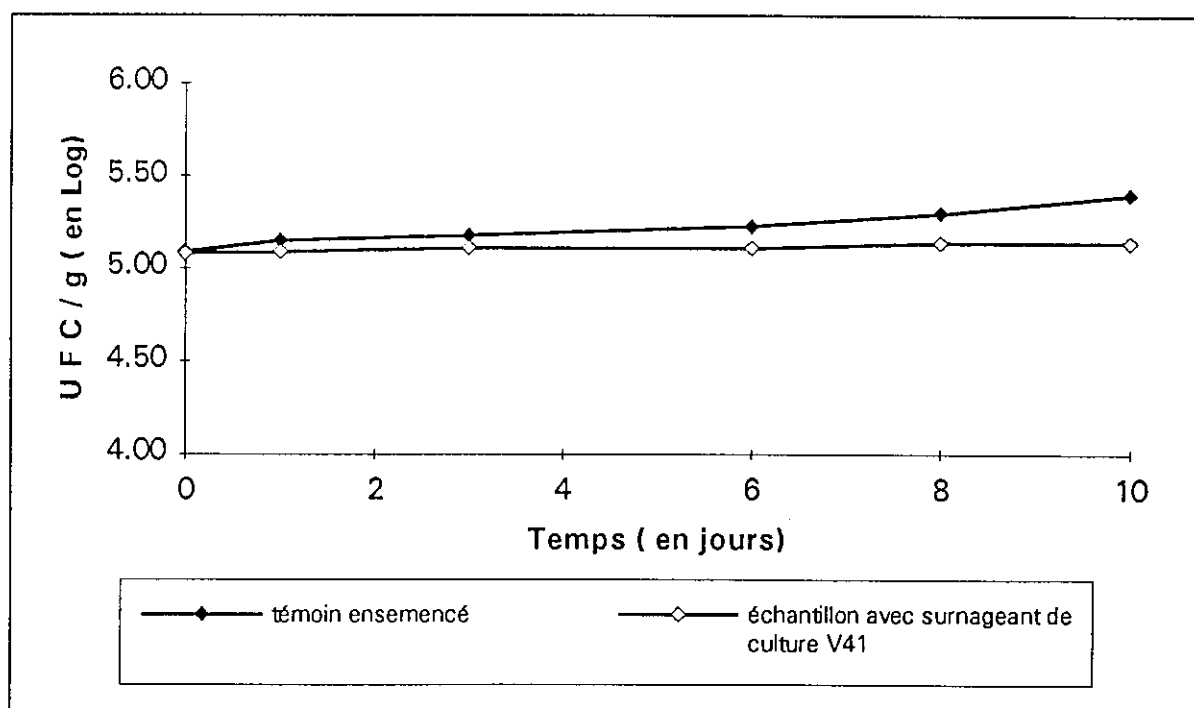


Figure 19: Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé ensemencé avec  $1.2 \cdot 10^5$  UFC/g de *Listeria innocua* S dans le témoin et l'échantillon contenant du précipité de culture *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C. (la population de *Listeria* du témoin reste inférieure à 10 UFC/g après 10 jours de stockage).

#### 2. 2. 1. 4. Par ajout de précipité non-dialysé

##### - Conditions de manipulation :

- Utilisation de 5% de précipité non-dialysé, obtenu par précipitation du surnageant de fermenteur avec 60% de sulfate d'ammonium, repris dans du tampon phosphate 20 mM
- Activité du précipité :  $10^9$  UA/ml ( dosée contre *Cb.piscicola* NCDO 2762)
- Broyat : 70g de saumon fumé +30g d'eau peptonée
- Inoculum :  $1,2 \cdot 10^5$  UFC de *Listeria innocua* S / g
- Température de stockage : 8°C
- Temps de stockage : 10 jours

##### - Evolution de la flore lactique (figure 18)

Dans ces conditions, la flore lactique du témoin ,de l'échantillonensemencé en *Listeria* et de l'échantillon avec le précipité et les *Listeria* se développe pendant les 10 jours de conservation à 8°C pour atteindre respectivement 8.5 Log UFC/g, 8.3 Log UFC/g et 8.6 Log UFC/g, soit un accroissement de 2.0 à 2.5 Log UFC/g de cette population. Dans ce cas encore, nous n'observons pas de différence de croissance entre le témoin et le témoinensemencé en *Listeria*. Il n'y a donc pas de compétition entre les 2 populations.

##### - Evolution des *Listeria* (figure 19)

La population en *Listeria innocua* S du témoin reste toujours inférieure au seuil de détection de 10 UFC/g pendant ce délai.

Cette même flore s'accroît de 0.3 Log UFC/g dans le témoinensemencé en *Listeria*, alors que cette augmentation était d'environ 2 Log UFC/g dans les expériences précédentes. Dans l'échantillon contenant le précipité et les *Listeria*, il n'y a pas de développement.

##### - Titre des bactériocines (tableau 10)

Nous n'avons pas détecté la présence des bactériocines dans l'échantillon contenant le précipité non-dialysé.

##### - Conclusion

Cette expérience ne met pas en évidence l'action inhibitrice de la bactériocine. On peut émettre l'hypothèse, que la bactériocine après précipitation a une configuration qui la rend inactive compte tenu des conditions du milieu.

Nous allons maintenant nous intéresser à la possibilité d'ajouter de la culture de *Cb. divergens* sur des filets de saumon fumé toujours conservés sous-vide pour se rapprocher des conditions de commercialisation de ce produit.

**Tableau 10 : Etude de l'inhibition de *Listeria innocua* S par ajout de 5% de précipité non-dialysé de culture *Cb.divergens* V41 dans le saumon fumé broyé dilué au 7/10 dans le tryptone-sel**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 10 jours :

Temps ( en jours)	Flore lactique du témoin non ensemencé ( en Log )	Flore lactique de l'échantillon avec <i>Listeria</i> ( en Log )	Flore lactique de l'échantillon avec le précipité et <i>Listeria</i> ( en Log )
0	6.3	6.3	5.9
0.13	-	6.3	6.3
0.2	-	-	6.3
1	7.1	7.1	7.1
3	7.9	7.5	7.5
6	8.2	7.9	7.9
8	8.3	8.0	8.5
10	8.5	8.2	8.6

Evolution des *Listeria* à 8°C pendant 10 jours :

Temps ( en jours)	<i>Listeria</i> du témoin ( en Log )	<i>Listeria</i> du témoin ensemencé ( en Log )	<i>Listeria</i> de l'échantillon contenant le précipité ( en Log )
0	<1	5.0	5.1
0.13	<1	5.1	5.0
0.2	<1	-	5.0
1	<1	5.1	ND
3	<1	5.2	5.1
6	<1	5.2	5.1
8	<1	5.3	5.1
10	<1	5.4	5.1

Titre des bactériocines ( activité en UA/ml) :

Temps ( en jours)	Echantillon avec précipité de culture V41
0	ND
0.13	ND
0.2	ND
1	ND
3	ND
6	ND
8	ND
10	ND

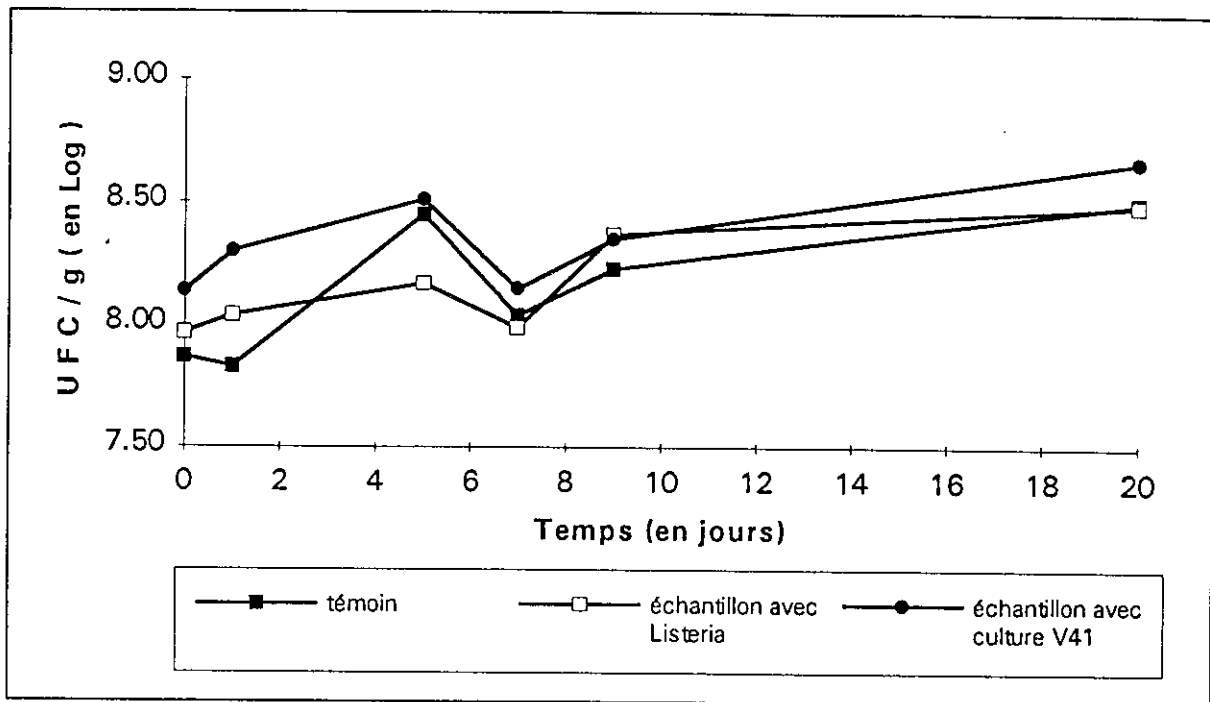


Figure 20 : Evolution de la flore lactique du filet de saumon fumé dans le témoin, l'échantillon ensemencé en *Listeria* et l'échantillon contenant la culture de *Cb. divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C

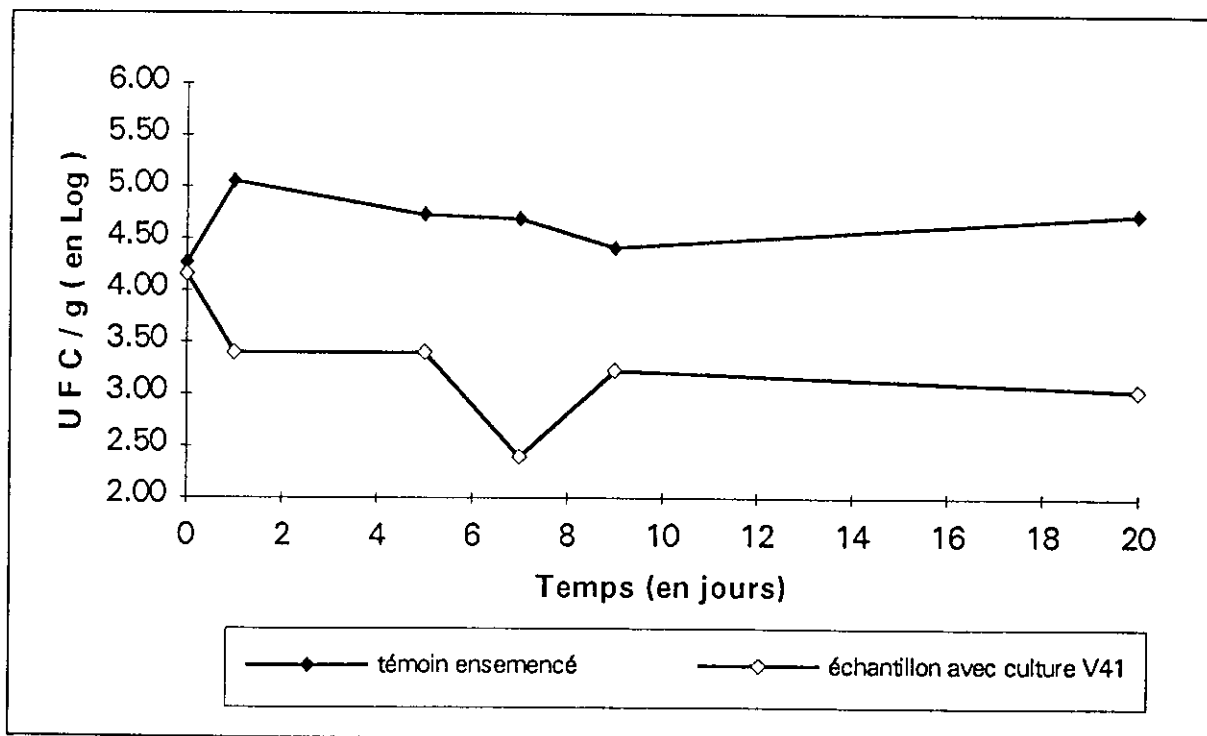


Figure 21 : Evolution des *Listeria* du filet de saumon fumé ensemencé avec  $1,6 \cdot 10^4$  UFC/g de *Listeria innocua* S dans le témoin et l'échantillon contenant la culture de *Cb. divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C.  
(la population de *Listeria* du témoin reste inférieure à 10 UFC/g après 20 jours de stockage).

## 2. 2. 2. Sur filet entier, par ajout de culture

### - Conditions de manipulation :

- Utilisation de 5% d'une culture de V41 de fermenteur en début de phase stationnaire d'une activité de  $10^5$  UA/ml ( dosée contre *L. innocua*) et de  $10^3$  UA/ml ( dosée contre *Cb.piscicola* NCDO 2762)
- filet entier d'environ 70 à 80 g
- Inoculum :  $1,6 \cdot 10^4$  UFC de *Listeria innocua* S / g
- Température de stockage : 8°C
- Temps de stockage : 20 jours

### - Evolution de la flore lactique (figure 20)

La flore lactique du témoin, de l'échantillon avec *Listeria* et de l'échantillon avec la culture de V41 augmente pour atteindre respectivement 8,5 ; 8,5 et 8,7 Log UFC/g.

Nous n'observons pas de différence significative de développement de cette flore entre les différents échantillons.

### - Evolution des *Listeria* (figure 21)

La population en *Listeria* dans le témoin reste toujours inférieure au seuil de détection de 10 UFC/g pendant les 20 jours de stockage à 8°C.

Dans le témoinensemencé en *Listeria*, on note une augmentation de la flore pendant les premières 24 heures, puis les valeurs se maintiennent aux alentours de 4,7 Log UFC/g jusqu'au vingtième jour.

Dans l'échantillon contenant la culture V41 et les *Listeria*, on observe une chute de la population pendant les premières 24 heures ensuite celle-ci reste voisine de 3,4 Log UFC/g. Dans ce cas, l'effet inhibiteur des bactériocines est effectif avec une chute de la population de *Listeria* jusqu'à 2,4 Log UFC/g qui est cependant suivie par un léger développement de J 9 à J 20.

Etant donné que, pour cette expérience, nous avons utilisé du poisson non broyé, il est possible que le contact entre les *Listeria* et la culture à la surface des filets, soit beaucoup plus important que dans un broyat et explique cet effet inhibiteur plus important dans cette expérience. Cependant ce résultat devrait être répété pour être confirmé.



**Tableau 11 : Etude de l'inhibition de *Listeria innocua* S par ajout d'une culture de *Cb. divergens* V41 dans du filet de saumon fumé entier**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 20 jours

Temps ( en jours )	Flore lactique du témoin ( en Log )	Flore lactique de l'échantillon avec <i>Listeria</i> ( en Log )	Flore lactique de l'échantillon contenant la culture V41 et <i>Listeria</i> ( en Log )
0	7.8	7.9	8.1
1	7.8	8.0	8.3
5	8.4	8.1	8.5
7	8.0	7.9	8.1
9	8.2	8.3	8.3
20	8.5	8.5	8.6

Evolution des *Listeria* à 8°C pendant 20 jours

Temps ( en jours )	<i>Listeria</i> du témoin non-ensemencé ( en Log )	<i>Listeria</i> de l'échantillon ensemencé avec <i>Listeria</i> ( en Log )	<i>Listeria</i> de l'échantillon contenant la culture V41 et <i>Listeria</i> ( en Log )
0	<1	4.3	4.1
1	<1	5.0	3.4
5	<1	4.7	3.4
7	<1	4.7	2.4
9	<1	4.4	3.2
20	<1	4.7	3.0

Titre des bactériocines ( activité en UA/ml )

Temps ( en jours )	Echantillon contenant la culture de V41 et <i>Listeria</i>
0	ND
1	ND
5	ND
7	ND
9	ND
20	ND

### - Titre en bactériocines (tableau 11)

Dans ce cas, nous n'avons pas pu détecter la présence de bactériocines probablement présentes en faible quantité. En effet, leur action se serait produite dans les premières heures et l'on a déjà constaté que même lorsque l'on ne pouvait plus détecter une activité titrable dans l'échantillon, on observait un effet inhibiteur des *Listeria* après ajout de culture de V41 ou de sa bactériocine.

### - Conclusion

Cette expérience avait pour but de se rapprocher des conditions de commercialisation du saumon fumé et nous avons pu constater un effet bactéricide dans les premières heures de stockage, sur la population de *Listeria*, puis une inhibition dans le développement pendant les 9 premiers jours. Ensuite, le délai de conservation du poisson atteint, les résultats obtenus sont difficiles à interpréter compte tenu du très haut niveau de flore totale atteint et de la dégradation de la matière première déjà avancée.

Nous avons maintenant voulu vérifier que l'inhibition observée sur *L. innocua* S s'appliquait aussi à *L. monocytogenes* et en particulier *L. monocytogenes* Scott A.

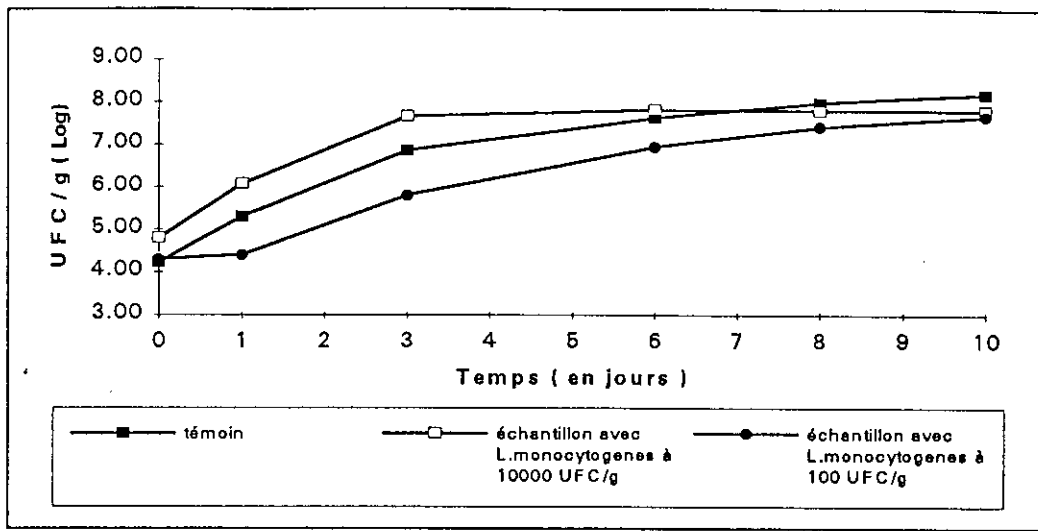


Figure 22: Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin et les échantillons contenant le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% et *L.monocytogenes* Scott A respectivement aux taux de  $10^4$  et  $3 \cdot 10^2$  UFC/g au cours de leur stockage à  $8^\circ\text{C}$ .

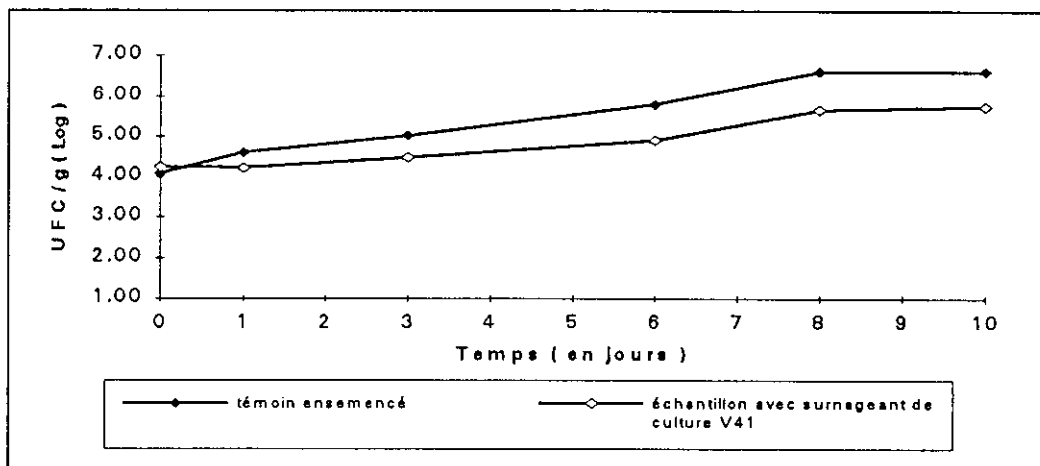


Figure 23: Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé ensemencé avec  $10^4$  UFC/g de *Listeria monocytogenes* Scott A dans le témoin et l'échantillon contenant le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à  $8^\circ\text{C}$  ( la population en *Listeria* du témoin reste inférieure à 10 UFC/g).

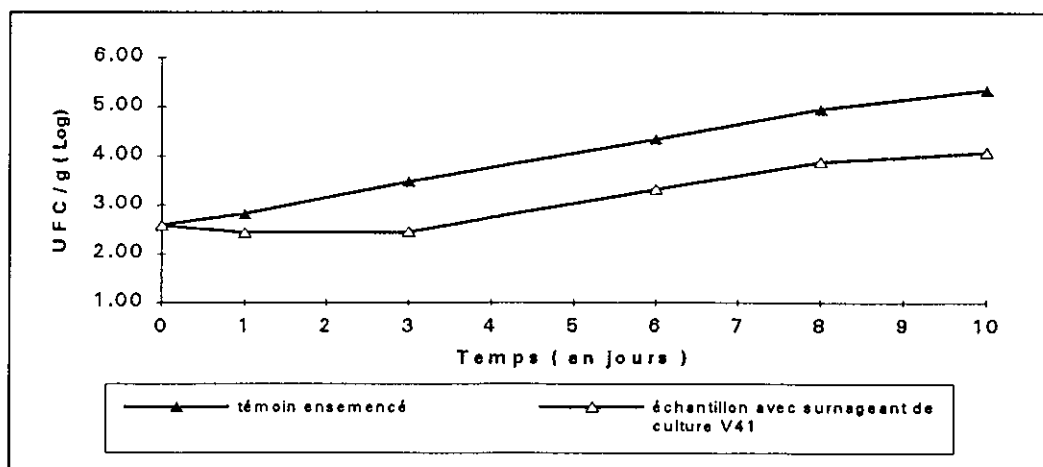


Figure 24: Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé ensemencé avec  $3 \cdot 10^2$  UFC/g de *Listeria monocytogenes* Scott A dans le témoin et l'échantillon contenant le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à  $8^\circ\text{C}$  ( la population en *Listeria* du témoin reste inférieure à 10 UFC/g).

## 2. 3 .INHIBITION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* SCOTT A DANS LE SAUMON FUME

### 2. 3. 1. Par ajout de surnageant de culture

#### - Conditions de manipulation :

- Ajout de 5% de surnageant de culture V41 d'une activité de  $10^6$  UA/ml (dosée sur *Listeria innocua* F) et de  $10^4$  UA/ml ( dosée sur *Cb.piscicola* NCDO 2762)
- Broyat : 70g de saumon fumé +30g d'eau peptonée
- Utilisation de *Listeria monocytogenes* Scott A au taux de  $10^4$  et  $10^2$  UFC/g
- Température de stockage : 8°C
- Temps de stockage : 10 jours

Les manipulations sur *Listeria monocytogenes* ont été réalisées au laboratoire de la DSV de Nantes.

#### - Evolution de la flore lactique (figure 22)

La flore lactique du témoin et des échantillonsensemencés en *L.monocytogenes* Scott, A se développe pendant 10 jours de stockage pour atteindre respectivement 8.2 Log UFC/g, 7.6 Log UFC/g et 7.8 Log UFC/g.

#### - Evolution des *Listeria* (figure 23 et 24)

La population en *Listeria* du témoin reste inférieure au seuil de détection de 10 UFC/g. Les *Listeria monocytogenes*ensemencées au taux de  $10^4$  UFC/g dans le témoin se développent et atteignent un niveau de 6.6 Log UFC/g après 10 jours de conservation à 8°C, soit une augmentation de 2,6 Log UFC/g.

L'action de la bactériocine met en évidence une réduction de 1 Log UFC/g environ de la population de *L. monocytogenes* de l'échantillon par rapport à celle du témoinensemencé. Cependant, on note un léger développement de cette souche à partir du quatrième jour dans l'échantillon contenant la bactériocine. Ce résultat différent de ceux obtenus sur *L.innocua*, peut s'expliquer par la plus faible activité de la bactériocine utilisée lors de ces expériences.

Lors de l'ensemencement du saumon fumé par *L. monocytogenes* au taux de  $10^2$  UFC/g, (figure 24) on observe des résultats analogues à ceux obtenus dans l'expérience précédente. Toutefois, on observe dans cet essai, une inhibition légèrement supérieure de la bactériocine sur *L. monocytogenes* : la réduction de la population de cette souche est de 1.3 Log UFC/g dans ce cas, alors qu'elle était de 0.9 Log UFC/g dans l'expérience précédente.

#### - Titre des bactériocines (tableau 12)

Le titre en bactériocine de surnageant est seulement de 1000 UA/ml contre 4000 UA/ml lors des essais précédents.

#### - Conclusion

La bactériocine inhibe le développement de *L.monocytogenes* Scott A au moins pendant les trois premiers jours. Après 10 jours de conservation du saumon fumé, on observe une population 10 fois supérieure à celle du témoin.

Nous allons donc choisir maintenant de tester le mélange cellules-bactériocines pour inhiber le développement de *L.monocytogenes* Scott A .

**Tableau 12 : Etude de l'inhibition de *Listeria monocytogenes* Scott A par ajout de 5% de surnageant de culture *Cb.divergens* V41 dans le saumon fumé broyé dilué au 7/10 dans le tryptone-sel**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 10 jours :

Temps (en jours)	Flore lactique du témoin (en Log)	Flore lactique de l'échantillon avec surnageant de culture V41 ensemencé en <i>Listeria</i> à 10 <sup>4</sup> UFC/g	Flore lactique de l'échantillon avec surnageant de culture V41 ensemencé en <i>Listeria</i> à 10 <sup>2</sup> UFC/g
0	4.2	4.8	4.3
1	5.3	6.8	5.9
3	6.8	7.6	6.9
6	7.6	7.8	7.4
8	7.9	7.8	7.6
10	8.2	7.8	7.6

Evolution des *Listeria* aux taux de 10<sup>4</sup> UFC/g pendant 10 jours à 8°C :

Temps (en jours)	<i>Listeria</i> du témoin (en Log)	<i>Listeria</i> du témoin ensemencé (en Log)	<i>Listeria</i> de l'échantillon avec surnageant de culture V41 (en Log)
0	< 1	4.1	4.2
0.2	< 1	4.3	4.2
1	< 1	4.6	4.2
3	< 1	5.0	4.5
6	< 1	5.8	4.9
8	< 1	6.6	5.6
10	< 1	6.6	5.7

Evolution des *Listeria* aux taux de 10<sup>2</sup> UFC/g pendant 10 jours à 8°C :

Temps (en jours)	<i>Listeria</i> du témoin (en Log)	<i>Listeria</i> du témoin ensemencé (en Log)	<i>Listeria</i> de l'échantillon avec surnageant de culture V41 (en Log)
0	< 1	2.6	2.6
0.20	< 1	2.3	2.4
1	< 1	2.8	2.4
3	< 1	3.5	2.4
6	< 1	4.3	3.3
8	< 1	4.9	3.9
10	< 1	5.3	4.1

Titre des bactériocines (activité en UA/ml) :

Temps (en jours)	0	1	3	6	8	10
Echantillon avec surnageant de culture V41	1000	ND	ND	ND	ND	ND

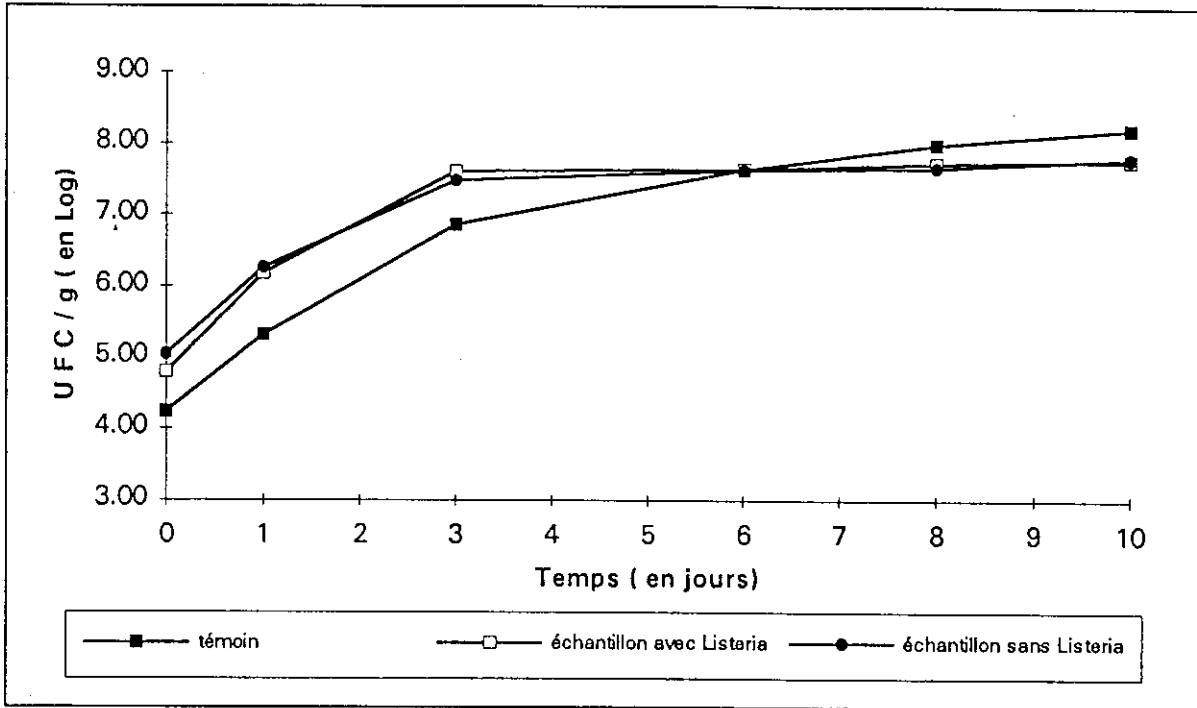


Figure 25: Evolution de la flore lactique du saumon fumé broyé dans le témoin, l'échantillon ensemencé avec *Listeria monocytogenes* Scott A et la culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% et l'échantillon ensemencé avec *Cb.divergens* V41 au cours de leur stockage à 8°C.

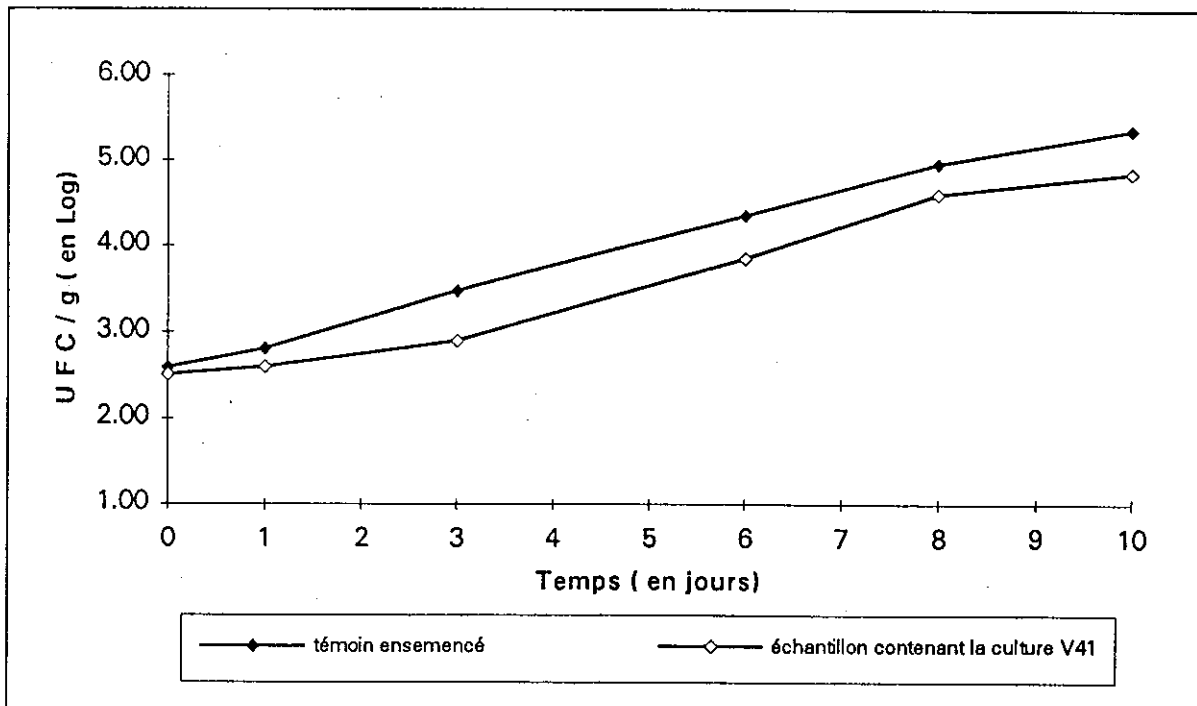


Figure 26: Evolution des *Listeria* du saumon fumé broyé ensemencé avec  $4 \cdot 10^2$  UFC/g de *Listeria monocytogenes* Scott A dans le témoin et l'échantillon contenant la culture de *Cb.divergens* V41 au taux de 5% au cours de leur stockage à 8°C (la population de *Listeria* du témoin reste inférieure à 10 UFC/g après 10 jours de stockage).

### 2. 3. 2 Par ajout de culture

#### - Conditions de manipulation :

- Ajout de 5% d'une culture de V41 en fermenteur en début de phase stationnaire d'une activité de  $10^5$  UA/ml (dosée sur *Listeria innocua* F) et de  $10^3$  UA/ml ( dosée sur *Cb.piscicola* NCDO 2762)
- Broyat : 70g de saumon fumé + 30g d'eau peptonée
- Utilisation de *Listeria monocytogenes* Scott A au taux de  $10^2$  UFC/g
- Température de stockage : 8°C
- Temps de stockage : 10 jours

#### - Evolution de la flore lactique (figure 25)

La flore lactique du témoin et des échantillonsensemencés en *L.monocytogenes* se développe pendant 10 jours de stockage pour atteindre respectivement 8.2 Log UFC/g, 7.7 Log UFC/g et 7.8 Log UFC/g, soit un accroissement de 3 à 4 Log UFC/g environ pendant ces 10 jours de conservation à 8°C.

#### - Evolution des Listeria (figure 26)

La population en Listeria du témoin reste inférieure au seuil de détection de 10 UFC/g. Les *Listeria monocytogenes* ensemencées dans le témoin se développent et atteignent un niveau de 5.4 Log UFC/g en fin du même délai.

L'action de la bactériocine est à l'origine d'une réduction de 0.5 Log UFC/g de la population de *L. monocytogenes* inoculée à  $10^2$  UFC/g. Cependant, on note un léger développement de cette souche à partir du sixième jour dans l'échantillon contenant la bactériocine. Ce résultat est semblable au précédent et peut s'expliquer par la plus faible activité de la bactériocine dans la culture de V41 ajoutée lors de cette expérience.

#### - Titre des bactériocines (tableau 13)

Nous n'avons pas détecté la présence de bactériocine dans l'échantillon contenant la culture V41. Pour cette expérience, le saumon fumé utilisé est celui qui est très riche en matière grasse, ce qui a peut-être rendu difficile le dosage de la bactériocine.

#### - Conclusion

Malgré une activité bactériocinique plus faible de la culture de *Cb.divergens* V41, on observe cependant une inhibition de *L.monocytogenes* Scott A par cette culture avec une réduction de 0.5 Log UFC/g de la population par rapport à celle du témoin ensemencé.

**Tableau 13 : Etude de l'inhibition de *Listeria monocytogenes* Scott A par ajout de 5% d'une culture de *Cb.divergens* V41 dans le saumon fumé broyé dilué au 7/10 dans le tryptone-sel**

Evolution de la flore lactique à 8°C pendant 10 jours :

Temps (en jours)	Flore lactique du témoin non ensemencé ( en Log)	Flore lactique de l'échantillon avec culture V41 et <i>Listeria</i> ( en Log )	Flore lactique de l'échantillon avec culture V41 seule ( en Log )
0	4.2	4.8	5.0
1	5.3	6.2	6.2
3	6.8	7.6	7.4
6	7.6	7.6	7.6
8	7.9	7.7	7.6
10	8.2	7.7	7.8

Evolution des *Listeria* à 8°C pendant 10 jours :

Temps (en jours)	<i>Listeria</i> du témoin ( en Log)	<i>Listeria</i> du témoin ensemencé ( en Log)	<i>Listeria</i> de l'échantillon contenant la culture V41 ( en Log)
0	< 1	2.6	2.5
1	< 1	2.8	2.6
3	< 1	3.5	2.9
6	< 1	4.3	3.8
8	< 1	4.9	4.6
10	< 1	5.3	4.8

Titre des bactériocines (activité en UA/ml) :

Temps (en jours)	0	1	3	6	8	10
Echantillon contenant la culture V41	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Témoin des bactériocines	ND	ND	ND	ND	ND	ND



## CONCLUSION

Les expériences menées sur l'utilisation de *Carnobacterium divergens* V41, producteur de bactériocine, pour inhiber le développement de *Listeria* dans le saumon fumé, ont conduit aux résultats suivants :

A 7°C, *Carnobacterium divergens* V41 inoculé dans le saumon fumé broyé dans le tryptone-sel au taux de 7/10 se développent plus rapidement qu'à 4°C. Leur population s'accroît de 2 à 4 Log UFC/g au cours des 20 jours de stockage. Elles poussent en général beaucoup plus rapidement pendant les 3 premiers jours de stockage qui correspondent à la phase exponentielle de croissance. Leur temps de doublement est seulement de 12 heures environ à 7°C.

De la même manière, *Listeria innocua* S et *Listeria monocytogenes* Scott A se développent à la température de 8°C. La population de *L.innocua* S s'accroît de 1.5 à 2 Log UFC/g après 20 jours de stockage. La souche *L.monocytogenes* Scott A se développe plus rapidement, puisqu'elle augmente de 2.5 Log UFC/g après seulement 10 jours de stockage, à cette même température.

A 8 C, pendant les 20 jours de stockage, le surnageant de culture de *Cb.divergens* V41, ajouté au taux de 5% au saumon fumé broyé, inhibe le développement de *L.innocua* S inoculée au taux de  $10^5$  UFC/g environ, alors que la population du témoin s'accroît de 1 à 2 Log UFC/g. On observe une activité bactériocinique dans le broyat de saumon fumé seulement pendant les 24 premières heures. On peut émettre l'hypothèse, que la bactériocine se combine avec certains composants du milieu dans un premier temps, puis est progressivement relarguée.

Une activité inhibitrice vis à vis de *L.innocua* S de la culture de *Cb.divergens* V41 a été mise en évidence dans le broyat de saumon fumé. On note aussi un résultat intéressant mettant en évidence la capacité de ces cellules à produire de la bactériocine pendant le stockage. L'inhibition semble être légèrement plus élevée qu'en présence de surnageant seul. De plus, lorsque la culture est débarrassée des bactériocines, l'effet bactériostatique de celle-ci est observable avec cependant un effet inférieur à celui de la culture entière.

Enfin, les expériences conduites sur *L.monocytogenes* Scott A ont montré l'activité inhibitrice de la divercine les 3 premiers jours après ajout de celle-ci dans le saumon fumé. *L.monocytogenes* Scott A est capable ensuite de se développer. Le fait que l'activité de la bactériocine et des souches utilisées dans cet essai soit inférieure à celle des expériences précédentes peut expliquer cet effet moins inhibiteur de cette substance vis à vis de *L.monocytogenes* Scott A. Ce résultat reste donc à confirmer.

L'ajout de bactériocine pré purifiée n'a pas conduit à une inhibition. Ce résultat peut s'expliquer par les conditions de milieu, qui ont pu rendre la bactériocine inactive ou la dégrader.

Sur filet entier de saumon fumé, l'ajout d'une culture de V41 à 5% conduit à une chute de la population de *Listeria innocua* S de 0,8 Log UFC/g pendant les premières 24 heures, ce qui laisserait penser que la culture utilisée dans ces conditions a un effet plus important par rapport au broyat de poisson. Pendant les 20 jours de stockage ultérieur, les *Listeria* ne se développent pas dans le filet.

Dans la très grande majorité des essais, la population de *Listeria* des témoins reste inférieure au seuil de détection de 10 UFC/g après 20 jours de stockage à 7°C. L'ajout de la culture ou de surnageant de *Cb.divergens* V41 pourrait donc apporter un complément intéressant pour la qualité hygiénique du saumon fumé au cours de son stockage au froid en assurant une meilleure sécurité vis-à-vis de *Listeria*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**BAIN N., HODGKISS W., SHEWAN J.M.**, 1958. - The bacteriology of salt used in fish curing. *Proc. Intern. Symposium Food Microbiol.* 2nd Symposium, Cambridge, Engl., p 1-11.

**BARRE R.**, 1992. - Etude de bacteriocines produites par des bacteries lactiques d'origine marine, *Rapport de DEA à l'Université de Nantes* ; 26 p.

**BELIARD E., THUAULT D.**, 1989. - Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques, *Microbiologie alimentaire*, tome 2 ,ch.2, .282-297 .

**BHUNIA A.K., JOHNSON M.C., RAY B., KALCHAYANAND N.**, 1991. - Mode of action of pediocin Ach from *Pediococcus acidilacti* H on sensitive bacterial strains, *Journal of applied Microbiology*, 70 , 25-33.

**BRACKETT R.E.**, 1988. - Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water, *Food technology* - 4, 162 .

**BUCHANAN R.L., KLAWITTER L.A.**, 1992. - Characterisation of a lactic acid bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK5, with activity against *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures, *J.of Food Safety* 12, 199-217 .

**BUCHANAN R.L.**, 1989. - Comparison of Lithium Chloride-Phenylethanol-Moxalactam and Modified Vogel Johnson Agars for Detection of *Listeria spp.* in Retail-Level Meats, Poultry and Seafood, *Applied and Environmental Microbiology* 55, N°3, 599-603 .

**COLLINS M. D., FARROW J.A.E., PHILLIPS B.A., FERUSU S., JONES D.**, 1987. - Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int J. System. Bacteriol.* 37 , 310-316.

**DE ROISSART H.B.**, 1993. - Bactéries lactiques, *Microbiologie industrielle*, ch.1, 343-354 .

**DILLON R.M., PATEL T.R.**, 1992. - *Listeria* in Seafoods : A review , *J. of Food Protection* 55, N°3,1009-1015 .

**DODDS K.L.**, 1992. - A Retail Survey of Smoked Ready-to-eat Fish to Determine Their Microbiological Quality , *J.of Food Protection* 55, N°3 , 208-210 .

**FARBER J.M.**, 1991. - *Listeria monocytogenes* in Fish Products , *J.of Food Protection* 54, N°12 , 922-934 .

**FARBER J.M.**, 1993. - Current Research on *Listeria monocytogenes* in Foods : an Overview, *J.of Food Protection* 56, N°7, 640-643 .

**GARRIDA M., HUGAS M. et al., 1993.** - Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages, *J. of Applied Bacteriology* **75**, 142-148 .

**GEIS A., SINGH J., TEVRER M., 1983.** - Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Applied and environmental Microbiology*, **45**, 205-211

**GILLILAND S.E., SPECK M.L., 1975.** - Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in non fermented refrigerated foods. *J. Food Sci.* **40**, 903-905.

**GUYER S., JEMMI T., 1991.** - Behavior of *Listeria monocytogenes* during Fabrication and Storage of Experimentally Contaminated Smoked Salmon, *J. of Applied and Environmental Microbiology* **57**, N°5, 1523-1527 .

**HANGARD-VIDAUD N., NICOLAS J.A., BOSGIRAUD C., CORNUEJOLS M.J., et coll, 1989.** - Recherche de *Listeria* chez les poissons d'eau douce, *Microbiologie-Aliments-Nutrition* **7**, 421-423 .

**HARRIS L.J., FLEMING H.P., KLAENHAMMER T.R., 1991.** Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 Scott A and UAL500 to Nisin, *J. of Food Protection* **54**, N°11, p.836-840 .

**HECHARD Y., RENAULT D., CENATIEMPO Y., LETELLIER F et al., 1993.** - Les bactériocines contre *Listeria* : une nouvelle famille de protéines? , *Lait* **73** , 207-213 .

**HILDENBRANDT G., EROL I., 1988.** - Sensorical and microbiological investigation of sliced vacuum-packed smoked salmon, *Arch. fur Lebensmittelhyg.* **39**, 120-123 .

**HOBBS G., HODGKISS W., 1982.** - The microbiology of fish handling and processing, in *Developments in food Microbiology*, 71-177, Davies R (Ed.), Applied Science publisher.

**HOMO V., 1993.** - Etude de l'évolution de la flore de contamination du poisson en présence de souches de bactéries lactiques sélectionnées et en fonction de variations de paramètres physicochimiques du milieu, *Rapport de DEA de Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire à l'Université de Caen* .

**ICMSF, 1985.** - Microorganisms in Foods. Blackwell, *Scientific Publications*, Oxford.

**JACQUET CH., ROCOURT J., 1993.** - Microbiologie des *Listeria* et épidémiologie de la listériose humaine. L'information du biotechnicien, **Tome 1, N°1**, 11-18.

**JEMMI T., 1990.** - Actual knowledge of *Listeria* in meat and fish products. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* **81**, 144-157.

**JEMMI T., 1993.** - *Listeria monocytogenes* in smoked fish : an overview , *Archiv. fur Lebensmittelhyg.* **44**, 1-24 .

**JUILLARD V. et al., 1987.** - Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière , *Le Lait* **67 (2)**, 149-172 .

**KLAENHAMMER T.D., 1988.** - Bacteriocins of lactic bacteria. *Biochimie*, 70 , 337-349.

**LARSEN A.G., VOGENSEN F.K. , JOSEPHSEN J., 1993.** - Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterisation of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401, *J.of Applied Bacteriology* 75 , 113-122 .

**LARSEN A.G., NORRUNG B., 1993.** - Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401, *Letters in Applied Microbiology* 17 , 132-134 .

**LISTON. J, 1980.** - Microbiology in fishery science in Advance in fish science, 138-157; Fishing new Books Ltd.

**LOVETT J. et al. 1991.** - Quantitative Comparison of Two Enrichment Methods for Isolating *Listeria monocytogenes* from Seafoods , *J.of Food Protection* 54, N°1, 7-11.

**MAUGUIN S. 1991.** - Caractérisation de bactéries lactiques isolées de produits marins, *Thèse de l'Université de Caen*.

**MEIGNEN B., 1993** - Purification et caractérisation partielle d'une bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* , *Rapport de DEA à l'Université de Nantes* .

**MENARD J.L., SERIEYS F., 1993.** - *Listeria* à la ferme, *Revue laitière française* N°525, 27 .

**NETTLES C.G., BAREFOOT S.F., 1993.** - Biochemical and Genetic Characteristics of Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria, *J.of Food Protection* 56, N°4, 338-356

**NOAH C.W. et al., 1991.** - Detection of *Listeria* spp. in Naturally Contaminated Seafoods Using Four Enrichment Procedures, *J.of Food Protection* 54, N°3 , 174-177.

**PARENTE E., HILL C., 1992.** - A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria, *J.of Applied Bacteriology* 73 , 290-298 .

**PARENTE E., HILL C., 1992.** - Inhibition of *Listeria* in Buffer, Broth and Milk by Enterocin 1146, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium*, *J.of Food Protection* 55, N°7 503-508 .

**PELROY G.A. et al., 1994.** - Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Cold-process (Smoked) Salmon by Sodium Lactate, *J.of Food Protection* 57, N°2, 108-113 .

**PELROY G.A, PETERSON M., PARANJPYE R., ALMOND J., EKLUND M., 1993.** - Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Cold-process (Smoked) Salmon by Sodium Nitrite and Packaging Method, *J. of Food Protection* 57, N°2 , 114-119.

PETERSON M.E., PELROY G.A., PARANJPYE R., POYSKY F.T., ALMOND J., EKLUND M. et al., 1993. - Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in Smoked Fishery Products: Sodium Chloride and Packaging Method, *J. of Food Protection* 56, N°11 , 938-943 .

PIARD J.C., DESMAZEAUD M., 1992. - Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances, *Le Lait* 72 , 113-142 .

PILET M-F., PIARD J.C., DESMAZEAUD M., NOVEL G., DOUSSET X., 1993. - Evidence for a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* isolated from fish products. Poster. Abstract p: 127 in FEMS Microbiology Reviews. Lactic acid bacteria - Noordwijkerhout, septembre 1993.

PILET M-F., PIARD J.C., DESMAZEAUD M., NOVEL G., DOUSSET X., 1994. - Isolement et purification de la "divercine" bactériocine produite par *Carnobacterium divergens*. Société Française de Microbiologie. Dijon 9 et 10 mars 1994. Poster publié dans les recueils du colloque.

PILET M-F., DOUSSET X., DESMAZEAUD M., NOVEL G., PIARD J.C., 1994. - Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* et *Carnobacterium divergens* isolated from fish products. *J. of Food Protection*. (soumis à publication).

PRICE R.J., 1970. - Inhibition of *Pseudomonas species* by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J. Milk and Food Technol.* 33, 13-18.

RAKOW D., 1977. - Bacterial load on commercial smoked fish, *Arch. Lebensmittelhyg.* 28 , 192-195 .

RAVOMANANA D., RICHARD N., ROSEC J.P., 1993. - Etude comparative de trois protocoles de recherche de *Listeria sp.* et *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires. *IAA*, vol 110, 10 , 730-732.

RICHARD J., 1993. - Effets de la flore de surface , *Revue laitière française*, N°525, 28-29 .

ROCOURT J., 1989. - *Listeria* et listériose humaine , La décennie 1979-1989. *Annales de l'Institut Pasteur/ Actualités*.

SAINCLIVIER M., 1983. - L'industrie alimentaire halieutique, vol 1 "La matière première : le poisson" , ed *Sciences agronomiques Rennes*.

SEELIGER H.P.R., JONES D., 1986. - *Listeria*, *Bergeys' manual of systematic Bacteriology* vol 2, p : 1235-1245.

SHEWAN J.M., 1949. - The biological stability of smoked and salted fish. *Chem and Ind.*, London, 501-505.

SHEWAN J.M., 1961. - The Microbiology of Sea-Water Fish , *Fish as food* 1, ch.14, 511-520 .

**SHEWAN J.M., 1971.** - The microbiology of fish and fishery products. A progress report. *J. Applied Bacteriology*, **34**, 299-315.

**SHRODER K., CLAUSEN E., SANDBERG A.M., RAA J., 1981.** - Psychrotrophic *Lactobacillus plantarum* from fish and its ability to produce antibiotic substances. In "Advances in fish Sci. and Techno."- Confer. CONNELL J.J.; 480-483.

**STOFFELS G., NES I.F., GUOMUNSDOTTIR, 1992.** - Isolation and properties of a bacteriocin producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. of Applied Bacteriology*, **73**, 309-316.

**TAGG J.R., DAJANI A.S., WANNAMAKER L.W., 1976.** - Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Bacteriological Reviews*, **40**, 722-756.

**TALERICO T.L., CASAS I.A., CHUNG T.C., DOBROGOS Z.W.J., 1988.** - Production and isolation of reuteri, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents Chemother*, **32**, 1854-1858.

**TALAAAT E. et al., 1993.** - Inactivation and Attachement of *Listeria monocytogenes* on Beef Muscle Treated with Lactic Acid and Selected Bacteriocins, *J.of Food Protection* **56**, N°1, 29-33 .

**THUAULT D., 1993.** - Bactéries lactiques contre *Listeria*, *Revue laitière française*, N°525, 30-31 .

**VON BELKUM M.J., HAYEMA B.J., GEIS A., VENEMA G., 1989.** - Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 1187-1191.

**WEAGANT S.D., SADO P.N., COLBURN K.G, TORKELSON J.D. et al., 1988.** - The Incidence of *Listeria* Species in Fronzen Seafood Products, *J.of Food Protection* **51**, N°8 , 655-657 .

# ANNEXES



## ANNEXE 1

Principales bactériocines synthétisées par les bactéries lactiques	I
--	---

## ANNEXE 2

Milieux	VI
<b>I- Milieux de pré enrichissement</b>	VII
I-1 Bouillon Elliker	VII
I-2 Bouillon MRS	VII
<b>II- Milieux pour dénombrement</b>	VIII
II-1 Solution de tryptone-sel	VIII
II-2 Gélose MRS	VIII
II-3 Gélose PALCAM	IX
II-4 Gélose PCA	IX
<b>III- Milieux de fermentation</b>	X
III-1 Milieu de fermentation	X
III-2 Milieu MRS sans Tween	X
III-3 Solution de glucose	XI
III-4 Eau distillée stérile	XI
<b>IV- Milieux d'identification</b>	XI
IV-1 Gélose au sang	XI
IV-2 Galerie API-Listeria	XII
<b>V- Milieux de titration des bactériocines</b>	XII
V-1 Tampon phosphate	XII
V-2 Eau physiologique	XIII
V-3 Gélose Elliker à 1% d'agar	XIII
<b>VI- Milieu de lavage des cellules</b>	XIII

## ANNEXE 3

Normes microbiologiques du J.O. du saumon fumé	XIV
--	-----

## ANNEXE 4

Régression donnant la relation entre la densité optique et le nombre de cellules de <i>Listeria innocua</i> F	XVII
---	------

**ANNEXE 1 : PRINCIPALES BACTERIOCINES SYNTHETISEES PAR DES  
BACTERIES LACTIQUES**

Tableau 3 : Principales bactériocines synthétisées par des bactéries lactiques

bactériocine	Organisme producteur	Masse moléculaire	Stabilité	Sensibilité	Paramètres de production	Spectre d'action	Localisation du gène	Mode d'action
Série A : Lactococci								
pliococcine	Lactococcus lactis subsp cremoris 346	5.300 (séquencage)	-75°C, SDS	chymotrypsine, trypsine, pronase, pepsine, température >4°C	lait, bouillon M17 au début phase stationnaire	Lactococcus lactis subsp cremoris	plasmide conjuguant de 83kb	arrêt de la synthèse des acides nucléiques, baisse de la synthèse protéique
clostrepines	L. lactis subsp lactis, cremoris, diacetylactis, non productrices de nisine	>10.000	121°C 10 min, pH<5.0	chymotrypsine, trypsin, pronase, lipases, pH >7.0	lait, bouillon complexe culture non agitée, début phase exponentielle	Lactococci groupe A,C et G; Streptococci; B. cereus, Lb helveticus, Lb citovorrum, Lb paracitovorrum	non déterminé	non déterminé
clostrepine S	L. lactis subsp cremoris 202	> 20.000 (SDS-PAGE)	121°C 10 min, pH<5.0	trypsine, pronase, lipase A	culture statique, début phase exponentielle	Lactococci	non déterminé	efflux des ions, interférence avec le transport de l'uridine, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et protéique
stococcine I	L. lactis subsp cremoris AC1	6.000	SDS, 100°C 30 min, pH 4.5-7.0	enzymes protéolytiques	lait, bouillon lactique, phase exponentielle	Lactococci, Clostridia	plasmide conjuguant de 60 kb	non déterminé
stococcine A	L.lactis subsp diacetylactis WM4, L. lactis subsp cremoris LMG2130.9B4	3.400 (données génétiques)	-20° C dans 60% ethanol phosphate de sodium 2.5 mM (pH7.3), 100°C 30 min, chymotrypsine	endoprotéase glu-C, trypsine	lait, bouillon M17, phase stationnaire et début phase stationnaire	L. lactis subsp cremoris subsp diacetylactis, Clostridia	plasmide conjuguant 55 kb (fragment 1.2 kb), plasmide conjuguant 60 kb (fragment 18.4 kb), plasmide conjuguant 131.1. kb (fragments 9.5 kb et 13.4 kb)	furtive des composants intercellulaires
stococcines M et N	L. lactis subsp cremoris 9B4	69 acides aminés (données génétiques)	non déterminé	non déterminé	non déterminé	non déterminé	plasmide conjuguant 60 kb (fragment 1.8 kb)	non déterminé
stococcine B	L. lactis subsp cremoris 9B4	5.300	non déterminé	non déterminé	non déterminé	non déterminé	plasmide conjuguant 60 kb (fragment 1.2 kb)	non déterminé
stococcine	L.lactis subsp lactis, différentes souches	3.500 (monomère, données génétiques)	100°C 10min, pronase, trypsine, pepsine dans un milieu acide	chymoprisine,	lait, bouillon complexe tamponné, phase exponentielle	Lactococci, Bacilli, Clostridia, S. aureus, Micrococci	plasmide ou ADN chromosomique (fragment 8.5 kb)	efflux des acides aminés et des cations, disparition du potentiel de membrane
stococcine 481	L.lactis subsp lactis CNRZ 481	1.300-2700 (estimé)	100°C 60 min	enzymes protéolytiques	bouillon EGP pH 5.5, au début phase stationnaire	Lactococci, Lactobacilli, Leuconostocs, Cl tyrobutyricum	plasmide	non déterminé

actériocine	Organisme producteur	Masses moléculaire	Stabilité	Sensibilité	Paramètres de production	Spectre d'action	Localisation du gène	Mode d'action
ac	Lactococcus sp	non déterminé	100°C 30 min pH 4.5-7	α-chymotrypsine, pronase, proteinase K	Elliker, M17, Lait phase exponentielle	Lactococci, Lactobacilli, E faecalis, Clostridia, Pediococci, Leuconostocs	non déterminé	non déterminé
partie B : Pediococci								
diocine AcH	Pediococcus acidilactici H	2.700 (SDS-PAGE)	121°C 15min 6 m urée pH 2.5-9.0	trypsine, ficine, papaine, protéinase K, chymotrypsine	bouillon TGE complémenté, pH 6.5 phase stationnaire	Lactobacilli, Leuconostocs, S. aureus, Cl perfringens, L. monocytogenes, P. putida	plasmide 11.4 kb	inhibition de la synthèse d'ATP, perturbation des systèmes de transport non déterminé
diocine PA-1	P. acidilactici PA 1.0	4.600 (séquençage)	lipase, phospholipase, lysozyme, DNase, 80-100°C 10 min pH 4-7	pepsine, papaine, chymotrypsine, protéase	bouillon, phase stationnaire	Pediococci, Lactobacilli, L. mesenteroïdes, Listeria monocytogenes	plasmide 9.4 kb	non déterminé
diocine A	P. pentosaceus FB B61	non déterminé	100°C 60 min, -20°C	pronase	sur Agar	Pediococci, Lactobacilli, S. aureus, Cl perfringens, Cl botulinum	plasmide 2.1 kb	non déterminé
ans nom	P. cercvesia FB B63	non déterminé	non déterminé	non déterminé	non déterminé	Pediococci, Lactobacilli, Leuconostocs	plasmide 16 kb	non déterminé
ans nom	P. acidilactici PC	non déterminé	lipase, 100°C 60 min, pH 4.8	chymotrypsine, ficine, protéase, trypsine	bouillon MRS ou bouillon sémidéfini (pH 6.0)	Cl perfringens, Listeria spp, Leuconostocs, Pediococci	plasmide 8.47 kb	non déterminé
partie C : Leuconostocs								
esenterocine 5	Leuconostoc mesenteroïdes	4.500 (SDS-PAGE)	100°C 30 min	pronase, chloroforme	début phase stationnaire	L. monocytogenes, E. faecalis, B. linens, Pediococcus pentosaceus	non déterminé	bactériostatique
ucocine A	L. gelidum UAL 187	3.900 (données génétiques)	lipase, pH 2-3, urée, chloroforme, 62 °C 30 min	protease, chymotrypsine, trypsine, papaine, pepsin, pH>7.0	bouillon MRS, pH 6.0, début phase exponentielle	Leuconostocs, Lactobacilli, Pediococci, L. monocytogenes, E. faecalis,	plasmide 11.7kb (localisé en fragments de 2.9 kb)	non déterminé
ucocine S	L. para-mesenteroïdes OX	2.000 (SDS-PAGE)	60°C 30 min, 0.1% SDS	amylase, chymotrypsine, trypsine, pronase E, protéinase K	bouillon ATP, pH 6.15	Lb sake, L. monocytogenes, S. aureus, Y. enterocolitica, A hydrophila	non déterminé	bactériostatique, perturbation du potentiel de membrane
arnocine	L. carnosum LA44A	2.500-6.000 (SDS-PAGE)	100°C 15 min, pH 2-10	chymotrypsine, trypsine, amylase, 121°C 15min	bouillon MRS modifié (pH 6.5), 18H à 25°C ou 148H à 10°C	Lactobacilli, Carnobacteria, Enterococci, Pediococci, Leuconostocs, Listeria spp.	non déterminé	non déterminé

Bactériocine	Organisme producteur	Masse moléculaire	Stabilité	Sensibilité	Paramètres de production	Spectre d'action	Localisation du gène	Mode d'action
Partie D : Carnobacteria								
arnobactériocine A1, A2, A3	Carnobacterium piscicola LV17A	5.100, 5.123, 5.127 (spectrométrie de masse)	62°C 30 min	enzymes protéolytiques	bouillon début de la croissance	bactéries lactiques	plasmide 75kb	non déterminé
arnobactériocine B1, B2	Carnobacterium piscicola LV17B	4.541, 4.969 (spectrométrie de masse)	62°C 30 min	enzymes protéolytiques	bouillon début de la croissance	bactéries lactiques	plasmide 61 kb	non déterminé
arnobactériocine U149	Carnobacterium piscicola	3.610 (composition en acides aminés)	121°C 15 min pH<8	enzymes protéolytiques	bouillon 24-48 H	Lactobacilli, Pediococci, Carnobacteria	non déterminé	non déterminé
arnobactériocine sans nom	Carnobacterium piscicola LK5	non déterminé	100°C 5 min	Trypsine, papaine, pepsine, chymotrypsine	bouillon 5°C	Listeria monocytogenes	non déterminé	non déterminé
Partie E: Lactobacilli								
arnobactériocine fermenti	Lactobacillus fermenti	non déterminé	pH, 96°C 30 min, urée, lysozyme	trypsine, pepsine	surnageants d'une culture en bouillon d'une nuit	Lactobacilli	non déterminé	non déterminé
arnobactériocine A	L. plantarum C-11	>8.000 (dialyse)	100°C 30min, pH 4-6.5	protease	bouillon, milieu de phase exponentielle	Lactobacilli, Pediococci, Leuconostocs, Lactococci	non déterminé	non déterminé
arnobactériocine B	L. plantarum NCDO1103	non déterminé	non déterminé	lipase, amylase, pronase, pepsine, trypsine, chymotrypsine	sur agar, diffusion à travers la gélose	L.b plantarum, Leuconostoc mesenteroides, P. damnosus	non déterminé	non déterminé
arnobactériocine A	L. sake 706	non déterminé	100°C 20min, -20°C	trypsine, pepsine	bouillon, milieu fin de phase exponentielle à 25 °C	Leuconostocs, Lactobacilli, Enterococci,	plasmide 27.2 kb	non déterminé
arnobactériocine M	L. sake 148	4.640 (exclusion diffusion)	80°C 60 min, 150°C 9min	trypsine, pepsine, papaine, proteases XIV, II	milieu semi synthétique à 32°C	Listeria monocytogenes Lactobacilli, Leuconostocs, Carnobacteria, S. aureus, L. monocytogenes	non déterminé	bactériostatique, non déterminé
arnobactériocine P	L. sake LTH673	3.000-5.000 (SDS-PAGE et séquençage)	pepsine, 100°C 7min	proteïnase K, trypsine	bouillon MRS (pH 6.5)	Lactobacilli, Leuconostocs, Carnobacteria, Enterococci, Brochothrix thermosphacta	non déterminé	non déterminé
arnobactériocine S	L. sake L45	< 13.700 (exclusion diffusion)	100°C 30min,	protéase, trypsine	bouillon sans Tween 80, fin phase exponentielle	Pediococci, Leuconostocs, Lactobacilli	plasmide 50 kb	attachement possible à la membrane des cellules sensibles non déterminé
arnobactériocine A	L. curvatus LTH1174	3.000-5.000 (SDS-PAGE et séquençage)	100°C 30min pepsine	proteïnase K, trypsin,	bouillon MRS (pH 6.5)	Lactobacilli, Leuconostocs, Carnobacteria, Listeria spp, Micrococci, Staplylococci	non déterminé	non déterminé

actériocine	Organisme producteur	Masse moléculaire	Stabilité	Sensibilité	Paramètres de production	Spctre d'action	Localisation du gène	Mode d'action
revicine 37	L. brevis 37	> 10.000 (ultrafiltration)	121°C 60min, pH 1-11	pronase E, trypsine, chloroforme, pH>12 à 25°C	suragants d'une culture en bouillon	Pediococi, Leuconostocs, Lactobacilli, N coralina	non déterminé	non déterminé
aseicine 80	L. casei B80	40.000-42.000 (exclusion diffusion)	pH<5.0	pronase E, trypsine, T>60°C, pH>5.0	inductible par la mitomycine C en milieu synthétique contenant de la peptone	Lb casei	non déterminé	non déterminé
lantaricine BN	L. plantarum BN	>10.000 (SDS-PAGE)	pH<5.0	non déterminé	agar BHI, pH 6.9, 15°C	Lb sake	non déterminé	bactéricide, non déterminé
lantaricine S	L. Plantarum	non déterminé	100°C 5min, 60°C 10 min	α-chymotrypsine, ficine, pronase, proteinase K, thermolysine, dextranase, α-amylase, lipase, phospholipase	bouillon MRS pH 5.0 parallèle à la courbe de croissance	Lactobacilli, Leuconostocs, Lactococci, Pediococci	non déterminé	non déterminé
bavaricine MN	L. bavaricus MN	22.600 (SDS-PAGE)	100°C 5min, 60°C 10 min	non déterminé	agar ATP, pH 6.5, 30°C	Lb sake	non déterminé	bactéricide, non déterminé
actocine 27	L. helveticus LV 27	12.400 (SDS-PAGE)	Ficine, chloroforme, 100°C 60min, SDS	trypsine, pronase	bouillon, diffuse dans la gélose	Lb acidophilus, Lb helveticus	ADN chromosomique, plasmides non détectables	Efflux d'ions potassium, influx d'ions sodium
helveticine J	L. helveticus 481	37.000 (SDS-PAGE et données génétiques)	lipase, SDS 0.1 %, lysozyme	chaleur, proteinase K, ficine, trypsine, pronase, pepsine, subtilisine, guanidine 6 mM HCl, β-mercapto-éthanol 0.2%	bouillon en anaérobose, pH 5.5, en fin de phase exponentielle début de la phase stationnaire	Lb bulgaricus, Lb lactis, Lb helveticus	ADN chromosomique	non déterminé
helveticine V-1829	L. helveticus V-1829	non déterminé	agents dissociants, 45°C 120min, pH 2.5-6.5	50°C 30 min proteinase K, trypsine, ficine, pronase, pH>7.0	bouillon MRS, pH 5.5, en anaérobose, phase exponentielle	Lactobacilli	ADN chromosomique	non déterminé
actacine F	L. acidophilus 11088	2.500 (SDS-PAGE et données génétiques)	SDS, 121°C 15min	proteinase K, trypsine, ficine, subtilisine	bouillon pH 7.0 contrôlé	Lactobacilli, E. faecalis	Episome	non déterminé

ANNEXE 2 : MILIEUX

## MILIEUX

### I Milieu de pré enrichissement.

#### I-1 Bouillon Elliker.

Composition en g/l d'eau distillé :

- tryptone	20
- extrait autolytique de levure	5
- gélatine	2.5
- lactose	5
- saccharose	5
- glucose	5
- acétate de sodium	1.5
- chlorure de sodium	4
- acide ascorbique	0.5

#### Ingrédients :

Liste	Fournisseur	quantité pour 1 litre (g)
Elliker broth	Biokar	48.5

#### Préparation :

La préparation du bouillon se fait conformément aux indications portées par le fabricant sur l'emballage. Il est réparti à raison de 10 millilitres en tubes.

#### I-2 Bouillon MRS.

Composition en g/l d'eau distillée :

- polypeptone	10
- extrait de viande	10
- extrait autolytique de levure	5
- glucose	20
- tween 80	1.08
- phosphate dipotassique	2
- acetate de sodium	5
- citrate d'ammonium	2
- sulfate de magnesium	0.2
- sulfate de manganèse	0.05



Ingrédients :

Liste	Fournisseur	quantité pour 1 litre (g)
MRS broth	Biokar	55.0

Préparation :

La préparation du bouillon se fait conformément aux indications portées par le fabricant sur l'emballage. Il est réparti à raison de 50 millilitres en flacons de 90 millilitres.

**II Milieu pour dénombrement.**

**II-1 Solution de tryptone-sel.**

Ingrédients :

Liste	Fournisseur	quantité pour 1 litre (g)
Tryptone	Biokar	1
NaCl	Merck	8.5

Préparation :

Le mélange se fait dans 1 litre d'eau distillée. La solution de tryptone-sel est ensuite distribuée dans des tubes à essai à raison de 9 ml/tube et dans des flacons à raison de 90 ml/flacon, à l'aide du diluteur . Les tubes serviront à réaliser des dilutions au 1/10 pour les dénombrements. Ces tubes sont bouchés et stérilisés 15 min à 121°C ( 1 bar ).

**II-2 Gélose MRS.**

Composition : identique au bouillon, additionné de 15 g/l d'agar agar

Ingrédients :

Liste	Fournisseur	quantité pour 1 litre (g)
MRS gélose	Biokar	70.3

Préparation :

La préparation de la gélose se fait conformément aux indications portées par le fabricant sur l'emballage. La préparation ainsi que la répartition en boîtes de Pétri sont réalisées à l'aide de auto préparateur. Le barème de stérilisation est 15 minutes à 121°C.

### II - 3 Gélose PALCAM

PALCAM Agar selectif pour Listeria selon Van Netten et al. (MERCK)  
Composition en g/l :

Base	
- peptones	23.0
- amidon	1.0
- chlorure de sodium	5.0
- agar-agar	13.0
- D(-)Mannitol	10.0
- ammonium-fer III citrate	0.5
- esculine	0.8
- glucose	0.5
- chlorure de lithium	15.0
- rouge de phénol	0.08

Supplément sélectif PALCAM-Listeria selon Van Netten et al.

Composition d'un flacon

- sulfate de polymyxine	5.0 mg
- ceftazidine	10.0 mg
- acriflavine	2.5 mg

Liste	Fournisseur	quantité pour 500 g
PALCAM gélose	Merck	34.4 g
PALCAM supplément	Merck	1 flacon

### II- 4 Gélose PCA

Composition en g/l :

- tryptone	5
- extrait autolytique de levure	2.5
- glucose	1
- agar-agar	10.5

Liste	Fournisseur	quantité pour 1 litre (g)
PCA gélose	Biokar	23.5

### III Milieu de fermentation.

#### III-1 Milieu de fermentation.

Ce milieu est un milieu MRS standard, mais sans tween. Il est obtenu en mélangeant dans le fermenteur et dans les conditions de stérilité les divers composants

Ingrédients	Caractéristiques	quantité (ml)
MRS sans tween	concentré 2 fois	500
Glucose	200 g/l	100
Eau distillée stérile		400

Le pH est ajusté après obtention de la température souhaitée soit à l'aide d'acide chlorhydrique normal ou d'hydroxyde de sodium six molaire.

#### III-2 Milieu MRS sans tween.

Ce milieu est la base nécessaire à la réalisation du milieu de fermentation ; il correspond à un milieu MRS normal auquel on aurait soustrait le glucose, le tween et qui aurait été concentré une fois.

##### Ingrédients :

Liste	Fournisseurs	quantité pour 0.5 litre (g)	quantité pour 2 litres (g)
Polypeptones (peptone de caséine obtenue par digestion trypsique ou tryptone)	Merck Biokar	10	40
Extrait de levure (autolysat de levure)	Biokar	5	20
Extrait de viande	Merck	10	40
Hydrogénophosphate de potassium trihydraté (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O)	Merck	2	8
Acétate de sodium (CH <sub>3</sub> COO Na 3H <sub>2</sub> O)	Merck	5	20
Citrate d'ammonium (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Merck	2	8
Sulfate de magnésium (Mg SO <sub>4</sub> )	Merck	0.2	0.80
Sulfate de manganèse (Mn SO <sub>4</sub> )	Merck	0.05	0.20

##### Préparation :

Les ingrédients sont pesés séparément et additionnés à la quantité d'eau distillée désirée (pesés précisément). La dissolution se fait par agitation et chauffage modéré sur un agitateur magnétique. Le milieu est ensuite réparti à raison de 500 millilitres en flacons d'un litre. L'autoclavage est de 15 minutes à 121°C (1 bar).

Remarque : le surplus est également autoclavé en flacons de 90 millilitres, il servira à faire le blanc pour les mesures de DO.

### III-3 Solution de glucose.

Cette solution est préparée et autoclavée séparément pour éviter les réactions de Maillard avec les autres ingrédients du milieu de fermentation. C'est une solution à 200 grammes de glucose par litre.

#### Ingrédients :

Liste	Fournisseur	quantité pour 1 litre (g)
Glucose	Merck	200

#### Préparation :

On ajoute la quantité d'eau suffisante pour obtenir le volume désiré à la quantité de glucose préalablement pesée. La dissolution se fait par agitation et chauffage modéré sur un agitateur magnétique. La solution est ensuite répartie à raison de 100 millilitres en flacons de 150 millilitres. L'autoclavage est de 15 minutes à 121°C (1 bar).

### III-4 Eau distillée stérile.

Pour des raisons de commodité, les quantités d'eau sont préalablement pesées et réparties en flacons de 500 millilitres.

## IV - Milieux d'identification

### IV-1 Gélose au sang

Composition du milieu de base en g/l :

- proteose peptone 15
- hydrolysate de foie 2.5
- extrait de levure 5
- chlorure de sodium 5
- agar-agar 12

Composition du milieu complet :

- milieu de base 4 g
- eau 100 ml
- suspension d'hématies 5 à 7 ml  
ou sang défibriné

## IV - 2 Galerie API-Listeria

La galerie API-Listeria comporte 10 microtubes contenant des substrats qui permettent la réalisation de tests enzymatiques ou des fermentations de sucres.

**TABLEAU DE LECTURE**

TESTS	REACTIONS	RESULTATS	
		NEGATIF	POSITIF
[DIM]	Différenciation <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	<u>ZYM B &lt; 3 mn</u>	
		orange pâle rose beige gris beige	orange
ESC	ESCulline (Hydrolyse)	jaune pâle	noir
$\alpha$ MAN	$\alpha$ -MANnosidase	incolore	jaune
DARL	D-ARabitol (Acidification)	rouge rouge orangé	jaune jaune orangé
XYL	D-XYlose (Acidification)		
RHA	RHAMnose (Acidification)		
MDG	$\alpha$ -Méthyl-D-Glucoside (Acidification)		
RIB	RIBose (Acidification)		
G1P	Glucose-1-Phosphate (Acidification)		
TAG	D-TAGatose (Acidification)		

## V Milieu de titration des bactériocines.

### V-1 Tampon phosphate

Le tampon phosphate est constitué d'un mélange de 2 solutions A et B dans des quantités bien définies pour avoir le pH souhaité.

A : solution de monophosphate de sodium ( 0.2 M )

B : solution de diphosphate de sodium ( 0.2 M ).

x ml de A + y ml de B , ajusté avec de l'eau distillée jusqu'à 200 ml

pH	x (ml)	y (ml)
6.5	68.5	31.5

Les solutions de tampon sont ensuite stérilisées 15 min à 121°C ( 1 bar ).

### V-2 Eau physiologique.

#### Ingrédients :

Liste	Fournisseur	quantité pour 1 litre (g)
Chlorure de sodium	Merck	8.5

#### Préparation :

La quantité de NaCl désirée est pesée puis dissous, en chauffant, dans 1 litre d'eau distillée. La solution est mise en flacons de 150 ml et est autoclavée 15 min à 121 °C.

### V-3 Gélose Elliker à 1% d'agar

#### Ingrédients :

Liste	Fournisseur	quantité pour 1 litre (g)
Elliker broth	Biokar	48.5
Agar	Biokar	10

#### Préparation :

La préparation de la gélose molle se fait conformément aux indications portées par le fabricant sur l'emballage en utilisant l'auto préparateur.

Elle est répartie dans des flacons de 125 ml qui seront stérilisés 15 min à 121°C. Avant leur utilisation , ils sont mis à fondre dans un bain-marie.

### VI Milieu de lavage des cellules

#### **Liquide de Ringer**

#### Composition :

Chlorure de sodium	9 g
Chlorure de potassium	0.54 g
Chlorure de calcium	0.48 g
Bicarbonate de sodium	0.2 g

Répartir en flacons

Autoclaver 15 min à 120°C.

**A N N E X E 3 : N O R M E S M I C R O B I O L O G I Q U E S D U J . O . D U S A U M O N F U M E**

Art 9 - Les critères microbiologiques relatifs aux semi-conserves à base de denrées animales ou d'origine animale sont les suivants :

DESIGNATION	MICROORGANISMES aérobies 30 °C (par gramme).	COLIFORMES (par gramme).	STAPHYLOCOCCUS aureus (par gramme).	ANAÉROBES SULF. réducteurs 46 °C (par gramme).	SALMONELLA dans 25 grammes.
Semi-conserves pasteurisées (1).....	10 <sup>4</sup>	Absence.	Absence.	Absence.	Absence.
Semi-conserves non pasteurisées (1) :					
• Rollmops, harengs saurs, anchois, au sel ou à l'huile .....	10 <sup>5</sup>	Absence.	Absence.	Absence (2).	Absence.
• Saumon fumé, haddock et autres poissons légèrement salés et fumés.....	10 <sup>6</sup> (3)	Absence.	1	Absence.	Absence.

(1) Revivification de la suspension mère pendant deux heures à la température du laboratoire pour les semi-conserves et pendant trente à quarante-cinq minutes pour les semi-conserves non pasteurisées.

(2) Cas particulier des anchois en saumure: anaérobies sulf. réducteurs 46 °C: moins de 10 par gramme.

(3) Dénombrement en milieu à l'eau de mer ou à défaut à l'eau de salinité 35 p. 1 000 et à une température d'incubation de 20 °C pendant cinq jours.



**A N N E X E 4 : REGRESSION DONNANT LA RELATION ENTRE LA DENSITE  
OPTIQUE ET LE NOMBRE DE CELLULES POUR *LISTERIA INNOCUA* F**

## Régression donnant le nombre de cellules en fonction de la densité optique (DO)

Cette analyse est réalisée à l'aide du logiciel Statgraphic et nous donne l'équation :

$$\begin{aligned} \text{nbcell} &= a + b (\text{DO}) \\ \text{soit } \text{nbcell} &= -2,73 \cdot 10^7 + 2,55 \cdot 10^8 (\text{DO}) \\ &\text{avec un coefficient de corrélation de } 0,978 \end{aligned}$$

Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + bX$

Dependent variable: nbcell

Independent variable: DO

Parameter	Estimate	Standard Error	T Value	Prob. Level
Intercept	-2.73143E7	1.08222E7	-2.52391E0	0.03256
Slope	2.54953E8	1.80743E7	1.41058E1	0.00000

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	Prob. Level
Model	7.8044E16	1	7.8044E16	1.990E2	0.00000
Residual	3.5301E15	9	3.9223E14		
Total (Corr.)	8.1574E16	10			

Correlation Coefficient = 0.978123      R-squared = 95.67 percent  
 Std. Error of Est. = 1.98048E7

La relation de corrélation est représentée par la courbe suivante :

