

Efficacité en laboratoire puis en exploitations de procédures de nettoyage / désinfection sur la sélection positive des biofilms

C. LAITHIER (1), Y.M. CHATELIN (2), R. TALON (3), J. BARRAL et H. TORMO (4), Y. LEFRILEUX (5)

(1) Institut de l'Élevage, Actipôle, 5 rue Hermann Frenkel, 69364 Lyon cedex 07

(2) Institut de l'Élevage, 149 rue de Bercy, 75595 Paris cedex 12

(3) INRA de Theix, S.R.V., 63122 Saint-Genès Champanelle

(4) Centre Fromager de Carmejane, 04510 Le Chaffaut Saint Jurson

(5) PEP Caprin Rhône Alpes, 4 avenue de l'Europe Unie, BP 114, 07001 Privas

RESUME - Dans un souci de valorisation de la flore indigène et donc de préserver la flore utile en exploitations fromagères fermières, les travaux menés sur 3 ans en filière caprine fromagère avaient pour but dans un premier temps de mieux connaître les biofilms présents sur les supports au contact du lait et des fromages, d'identifier leur rôle sur la qualité des fromages (en particulier l'acidification) pour tester ensuite, dans un second volet présenté ici, des procédures de décontamination ciblées (détruisant la flore indésirable et préservant la flore d'intérêt technologique) des surfaces afin de favoriser l'implantation de biofilms "positifs".

Les résultats au laboratoire concernant la décontamination sélective étaient prometteurs : l'utilisation de lessives alcalines avec suppression du chlore remplacé par de plus ou moins grandes quantités de Na_2SO_4 permettait de préserver la flore utile tout en détruisant la flore d'altération et, en augmentant la dose de sel, toute la flore pathogène. En exploitations, au niveau des biofilms de la machine à traire, les résultats obtenus sont différents. Ils mettent en évidence l'intérêt de supprimer le chlore pour améliorer les paramètres d'acidification, favoriser les flores d'affinage. Cependant, le risque de présence de *Pseudomonas* dans le lait est accru, même si cette observation concerne les laits UHT mis en circulation dans la machine à traire et non les laits de mélange. La suppression du chlore est donc à envisager avec précaution, suivant la situation propre de chaque éleveur. L'addition de sel en grande quantité ne semble pas éliminer ce problème dans les conditions de l'essai effectué (utilisation sur une période courte dans une seule ferme expérimentale).

Effectiveness in laboratory then in farms of cleaning/desinfection processes on positive selection of biofilms

C. LAITHIER (1), Y.M. CHATELIN (2), R. TALON (3), J. BARRAL et H. TORMO (4), Y. LEFRILEUX (5)

(1) Institut de l'Élevage, Actipôle, 5 rue Hermann Frenkel, 69364 Lyon cedex 07

SUMMARY - In order to valorise indigenous flora and thus to preserve the useful flora in farm cheese-making exploitations, this work was undertaken over 3 years ago. The purpose of the study was initially to become more familiar with biofilms present on the supports in contact with milk and cheese, to identify their role on the quality of cheese (in particular acidification), to test then in a second shutter presented here targeted procedures of decontamination (destroying the undesirable flora and preserving the technological flora of interest) surfaces in order to support the "positive" establishment of biofilms.

The results at the laboratory concerning selective decontamination were promising: the use of alkaline detergents with removal of chlorine replaced by more or less great quantities of Na_2SO_4 made it possible to preserve the useful flora while destroying the flora of deterioration, and by increasing the amount of salt, all the pathogenic flora. On the biofilms of the milking machine on the exploitations, the results obtained were different. They highlight the interest of removing chlorine to improve the parameters of acidification and to support the flora of refining. However, the risk of a presence of *Pseudomonas* in milk was increased, even though this observation was related to UHT milks put into circulation in the milking machine and not milks used for fabrication. The removal of chlorine is thus to be considered with precaution, according to the situation of each farmer. The addition of salt in great quantity did not seem to eliminate this problem under the conditions of the current test (used over one short period on only one experimental farm).

INTRODUCTION

La filière fromagère fermière utilisant une technologie valorisant la flore indigène constate depuis plusieurs années une perte de typicité des fromages et une recrudescence de certains accidents de fabrication (notamment d'acidification). Les fromagers fermiers attribuent ce phénomène à un appauvrissement de la matière utile en flore naturelle du fait de l'utilisation de mesures de nettoyage/désinfection drastiques. Mis en évidence dans les années 40, les biofilms ont fait l'objet de nombreux travaux. Il s'agit de communautés microbiennes immobilisées sur une surface et souvent enfouies dans une matrice fibreuse de polymères extracellulaires. Les biofilms se forment inévitablement sur les surfaces humides comme les équipements laitiers (machine à traire, tank à lait), fromagers

(planches d'affinage) (Richard, 1997 ; Wong et Cerf, 1995). De nombreuses études ont montré que les bactéries présentes dans les biofilms sont moins sensibles à l'action des détergents et des désinfectants que les bactéries présentes à l'état libre (Bourion, 1995). Dans les ateliers agro-alimentaires, cette propriété a le plus souvent pour conséquence la mise en œuvre de mesures d'hygiène drastiques, non sélectives, qui visent à l'éradication complète des flores microbiennes présentes. Les travaux menés il y a quelques années dans le cadre du programme UNIR (Ultra Propre Nutrition Industrie Recherche) sur l'écologie microbienne dirigée ont démontré l'existence de techniques de désinfection des surfaces permettant l'élimination de la flore nuisible tout en préservant les souches d'intérêt technologique. C'est l'approche du groupe UNIR que nous souhaitons tester dans le cadre de ce programme.

Il a été notamment démontré l'existence de combinaisons de stress osmotique / alcalin ou osmotique / alcalin / biocide qui permettaient l'élimination de concentrations très élevées de *Listeria monocytogenes* et de *Pseudomonas*, tout en épargnant certaines souches d'intérêt technologique (*Brevibacterium linens* et *Staphylococcus xylosus*) (Vasseur, 1999). D'autres auteurs ont aussi mis en évidence l'existence de biofilms capables de s'opposer à l'implantation de germes indésirables comme *Listeria* (Briandet *et al.*, 1999 ; Leriche et Carpentier, 2000). Malgré ces résultats encourageants, d'autres études préalables aux travaux du groupe UNIR ont mis en évidence l'existence de biofilms de *Pseudomonas*, qui favoriseraient l'implantation des *Listeria* (Sasahara et Zottola, 1993).

1. TESTS EN LABORATOIRE

1.1. MATERIELS ET METHODES

Les biofilms ont été reconstitués en laboratoire à partir de 6 souches de bactéries : flore utile pour la fabrication (*Lactococcus lactis subsp. lactis* (NCW1), *Leuconostoc mesenteroides subsp. lactis* (CNRZ 483)), flore d'altération (*Pseudomonas fluorescens* 58, *Escherichia Coli* K 12, DH5a), flore pathogène (*S. aureus* 65-8T, *L. monocytogenes* EGD_e). Les souches d'intérêt technologique ont été choisies en fonction des résultats du premier volet du programme s'intéressant à la composition des biofilms en exploitations. Les microcoques et corynébactéries étaient également présentes dans la population dominante mais il n'était pas possible de reconstituer les biofilms avec plus de 6 flores.

Un seul test a été effectué sur des biofilms monomicrobiens reconstitués à partir de l'une des 4 souches de bactéries "sauvages" isolées d'ateliers fromagers étudiés dans le premier volet (2 souches d'entérocoques et 2 de lactocoques). La croissance des bactéries en biofilms a été effectuée selon la technique de Trémoulet *et al.*, 2002.

Les biofilms ont été implantés sur des filtres en fibre de verre (adhésion de 4 heures ou croissance à 20°C pendant 18 h pour simuler une traite). La concentration était au minimum de 10⁶ UFC/filtre pour les flores d'intérêt et de 10⁵ UFC/filtre pour les autres souches. Les biofilms ont ensuite été soumis à des procédures de nettoyage/désinfection (50°C, 10 minutes sauf pour l'eau chaude : 65°C, 10 minutes).

Les procédures de nettoyage /désinfection utilisées étaient celles habituellement utilisées en exploitation ainsi que celles ayant donné des résultats intéressants au niveau du programme UNIR (tableau 1).

Tableau 1 : traitements appliqués sur les biofilms mixtes reconstitués

Traitement appliqué	Technique d'adhésion
Eau à 65°C	4 h
Alcalin chloré	4 h
Dérivé chloré	4 h
Acide phosphorique	4 h
Acide formulé (phosphorique+sulfurique)	4 h
Acide oxydant	4 h
Alcalin pH =11,9	4 h et Croissance de 18h
Alcalin +0,05 % Na ₂ SO ₄ , pH = 11,7	Croissance de 18h
Alcalin +5 % Na ₂ SO ₄ , pH =11,6	4 h et Croissance de 18h
Alcalin +10 % Na ₂ SO ₄ , pH =11,7	4 h et Croissance de 18h
Alcalin +10 % Na ₂ SO ₄ +biocide à 20 ppm, pH =11,7	Après croissance de 18 h

Les produits utilisés étaient dilués à 0,5 % dans l'eau avant l'ajout éventuel de sel ou de biocide. Les filtres étaient rincés deux fois dans 20 ml de tryptone sel avant d'être dénombrés.

1.2. RESULTATS

1.2.1. Efficacité des traitements de nettoyage / désinfection sur les souches en cultures mixtes

Pour les biofilms mixtes traités après une adhésion de 4 heures, les traitements : eau à 65°C, dérivé chloré, alcalin chloré, acide phosphorique, acide formulé et acide oxydant détruisent toutes les flores, même si elles sont présentes à des niveaux très élevés. Deux procédures ont donné des résultats intéressants en terme de décontamination sélective : il s'agit d'une lessive alcaline non chlorée à laquelle on ajoute très peu de sel-Na₂SO₄ (0,05 %) ou davantage (10 %). Les résultats après 18 h de croissance pour ces solutions sont reportés dans le tableau 2. Le traitement alcalin en présence de très faible concentration de Na₂SO₄ (0,05 %) préserve bien les flores d'intérêt technologique (1 à 1,5 log de réduction), permet l'élimination des flores d'altération mais réduit les flores pathogènes d'environ 1 log uniquement. La solution alcaline + Na₂SO₄ à 10 %, pH=11,7 inhibe les flores d'altération et pathogène, tout en préservant très partiellement les flores d'intérêt technologique. L'ajout de biocide ne présente pas d'intérêt supplémentaire.

1.2.2. Traitement des biofilms constitués de flores sauvages

Les souches sauvages d'*Enterococcus* et de *Lactococcus* isolées des ateliers fromagers ont été testées après une adhésion de 4 heures puis traitées avec le traitement alcalin additionné de 10 % de Na₂SO₄. On observe que les deux souches de lactocoques sont plus résistantes que les souches de référence avec des réductions très faibles de 0,2 à 0,5 log (contre 1,4 pour la souche de référence). Les deux souches d'*Enterococcus* sont également très résistantes à ce traitement avec des réductions de 0,2 à 0,5 log.

Tableau 2 : Traitement des filtres après croissance en biofilms de 18 h (résultats exprimés en log10UFC/filtre)

		<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>P. fluorescens</i>
Traitement alcalin + sel 0,05 %	T18h	4,22±0,20	7,07 ± 0,51	3,92±0,23	7,45±0,17	7,16 ±0,09	6,63±0,36
	Traitement	2,92±0,30	5,67 ± 0,40	<1,30	6,55 ±0,20	5,66±0,16	<2,30
	Réduction	1,3	1,4	>2,6	0,9	1,5	>4,3
Traitement alcalin+ sel 10 %	T18h	4,68	7,04	4,49	7,2	6,8	6,5
	Traitement	<2,30	[2,67 ; <2,30]	<1,30	[3,33 ; 4,64]	[3,12 ; 4,99]	<2,30
	Réduction	>4,3	>4,8	>3,7	3,1	2,7	>4,2
Traitement alcalin+sel 10 % +biocide	T18h	4,14±0,38	7,21±0,66	3,38±0,15	7,39±0,61	-	6,70±0,19
	Traitement	<2,30	3,1,	<1,30	5,05±0,11	-	<2,30
	Réduction	>1,8	4,1	>2,1	2,3	-	>4,4

* seuil de détection : 1,3 log CFU/filtre pour 1 mlensemencé dans les boîtes et 2,3 log CFU/filtre pour 0,1 mlensemencé dans les boîtes

1. 3. CONCLUSION

La solution alcaline + Na₂SO₄ à 0,05 %, pH=11,7 très efficace contre les flores d'altération a alors été testée en ferme expérimentale puis en exploitations fermières. En effet, la flore de contamination principale dans les exploitations fermières est une flore d'altération avec des risques de défauts liés surtout aux *Pseudomonas*. Cette solution présente aussi l'avantage de ne pas trop altérer la flore technologique. Par contre son efficacité est plus limitée contre la flore pathogène, impliquant son utilisation en situation de maîtrise sanitaire. Ce traitement est directement applicable sur le terrain car le sel peut être introduit dans la solution de départ, qui est alors dilué à 0,5 % dans les exploitations.

La solution alcaline + Na₂SO₄ à 10 %, pH=11,7 inhibe les flores d'altération et pathogène, tout en préservant très partiellement les flores d'intérêt technologique. Dans tous les cas, cette solution testée en laboratoire n'est pas applicable sur le terrain car les éleveurs doivent ajouter eux mêmes le sel dans les solutions de lavage, ce qui n'est pas envisageable en pratique. Cette solution sera alors testée uniquement à la ferme expérimentale du Pradel.

2. TESTS EN EXPLOITATIONS

2.1. MATERIELS ET METHODES

2.1.1. Tests en exploitations de la solution alcaline non chlorée +0,05 % de sel

2.1.1.1. Protocole

Huit exploitations de production et de transformation de lait de chèvre ont été sélectionnées dans la région Provence-Alpes-Côtes-d'Azur, de même que la Ferme expérimentale du Pradel en Ardèche. Les principaux critères de sélection étaient : machine à traire équipée d'un lactoduc, utilisation d'un programmeur de lavage, rigueur des pratiques de nettoyage-désinfection pour la machine à traire, utilisation régulière de produits alcalins chlorés pour le nettoyage de la machine à traire. Il a été choisi de faire cette étude sur une période relativement courte, pour s'affranchir de l'effet "saison".

Durant les trois premières semaines de l'étude, les éleveurs ont conservé l'utilisation de leur produit alcalin classique. Au bout de cette période, l'utilisation de la lessive "sélective" à la place de l'alcalin du producteur a commencé. Trois semaines après (temps laissé pour l'installation du biofilm), trois séries de prélèvements ont été effectuées sur 3 semaines consécutives. Chaque journée de prélèvement consistait à :

- la récupération le matin de lait mis en fabrication
- à faire passer 8 à 10 litres de lait UHT dans la machine à traire (pour récupérer les biofilms) avant la traite du soir.

Les échantillons ont ensuite subi des analyses microbiologiques : flore mésophile aérobie totale, flore acidifiante mésophile, *Leuconostoc spp*, entérocoques, microcoques et corynébactéries, *Pseudomonas fluorescens*, coliformes totaux, staphylocoques coagulase moins et coagulase positive, *Listeria monocytogenes*.

L'aptitude acidifiante des laits stériles passés dans la machine à traire et des laits de mélange a été évaluée en incubant un flacon de lait à 22°C pendant 48 heures et en enregistrant en parallèle le pH de façon continue (laits UHT) ou à 5 temps différents (laits de mélange).

Les courbes d'acidification obtenues dans les deux cas ont été modélisées (Laithier *et al.*, 2004) pour en extraire les paramètres clefs d'acidification.

2.1.1.2. Traitement des résultats

La procédure Mixed de SAS a été utilisée pour les variables continues en posant l'effet "éleveur" en effet aléatoire, et les effets "produit", "classe" et "Flore Totale Recalculée" (pour donner le même poids quel que soit le niveau initial de flores calculé en faisant la somme des différentes flores dénombrées) en effet fixe.

La procédure Glimix de SAS a été mise en œuvre pour les variables discrétisées : coliformes, *P. fluorescens* dans les deux types de lait ; *S. aureus* dans les laits de mélange.

2.1.2. Test à la ferme expérimentale de la solution alcaline non chlorée +10 % de sel

L'utilisation de la solution "essai" pendant une semaine a été encadrée par 2 semaines avant et après avec les lessives témoins. Pour mieux visualiser l'effet de la solution à tester, celle-ci a été utilisée de façon continue sans alternance avec l'acide, contrairement à ce qui est pratiqué habituellement (semaines témoin). La technique retenue pour évaluer la présence de biofilms est le passage de lait UHT dans la machine à traire.

2.2. RESULTATS

2.2.1. Tests en exploitations de la solution alcaline non chlorée +0,05 % de sel

Tableau 3 : effets de la solution testée sur les dénombrements microbiens des laits UHT passés dans les machines à traire.

Paramètres	Différence des moyennes (solution testée - produit habituel)	Probabilité
FMAR (log UFC/ml)	+ 0,481	<0,001
Flore acidifiante (log UFC/ml)	-0,257	<0,001
Leuconostocs (log UFC/ml)	-0,186	0,032
Entérocoques (log UFC/ml)	-0,246	<0,001
Microcoques et corynébactéries (log UFC/ml)	+ 0,280	0,023
Staphylocoques coagulase moins (log UFC/ml)	+0,723	<0,001
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Proba de présenceX2	0,0026
PH final	-0,241	<0,001
Delta pH (final/initial)	+ 0,089	0,01
Temps-inflexion (min)	-57	0,012
Temps de latence (min)	+ 67	0,005

La solution testée entraîne une légère diminution des flores acidifiantes. En revanche son utilisation permet une augmentation de la flore d'affinage et des staphylocoques coagulase-, ainsi qu'une amélioration des paramètres d'acidification (malgré la présence moins importante de flores acidifiantes). On constate également que le risque d'avoir des *Pseudomonas* est multiplié par deux. L'utilisation de la nouvelle lessive n'a pas eu de conséquence sur les dénombrements en coliformes et levures/moisissures. *S. aureus* était très rarement présent dans les échantillons de laits UHT et a été exclu de l'analyse des données. *Listeria monocytogenes* n'a jamais été retrouvée quel que soit l'échantillon analysé.

Les analyses effectuées sur les laits mis en fabrication montrent que l'utilisation de la solution entraîne également une augmentation de la flore d'affinage et des staphylocoques coagulase-. Il est intéressant de noter que le risque de contamination par *Pseudomonas fluorescens* évoqué pour les laits UHT ne s'est pas répercuté sur les laits mis en fabrication.

2.2.1. Test à la ferme expérimentale de la solution alcaline non chlorée +10 % de sel

Tableau 4 : moyenne de dénombrement des flores des laits UHT ayant circulé dans la MAT en fonction des périodes (en log 10 UFC/ml)

Nature de la flore	Avant (n=4)	Pendant (n=5)	Après (n=4)
Flore totale	4,16	4,05	4,52
Flore acidifiante	3,96	3,94	4,37
Leuconostocs	2,22	2,46	2,66
Entérocoques	3,73	3,80	4,29
Levures et moisissures	1,98	1,76	2,10
Microcoques et corynébactéries	1,70	1,51	2,29
Staphylocoques coagulase moins	2,06	2,33	2,59
Staphylocoques coagulase plus	0,08	0,12	0,00
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,08	0,18	0,28
Coliformes totaux	0,00	0,06	0,19

Ce produit testé sur une période courte ne semble pas dans les conditions de cet essai complémentaire favoriser les flores d'intérêt technologique tout en détruisant les flores pathogènes et d'altération (tableau 4). On note une tendance à une légère augmentation des différents niveaux de flores. Cela concerne cependant toutes les flores, qu'elles soient d'intérêt ou nuisibles en production fermière.

3. DISCUSSION

Les résultats obtenus en exploitations sont assez différents de ceux obtenus en laboratoire. Au delà des aléas du terrain, il faut rappeler que les flores initiales sur les biofilms artificiels sont présentes en quantité environ de 1 000 fois à 10 000 fois plus importante que la moyenne obtenue dans les élevages. De plus, les biofilms en laboratoire étaient constitués de 6 souches de bactéries alors que d'autres peuvent être présentes comme les microcoques et corynébactéries, les entérocoques. Les interactions microbiennes peuvent modifier considérablement les propriétés des biofilms (Carpentier et Chassaing, 2004). Par ailleurs, les souches utilisées en laboratoire ne correspondent pas à celles présentes sur le terrain, même si elles ont été isolées au départ du milieu laitier. En particulier, les propriétés d'adhésion des bactéries diffèrent suivant les conditions environnementales et leurs origines (Briand et Bellonfontaine, 1998).

Le support des biofilms est également de nature différente entre le laboratoire et ceux présents en exploitations. Or, l'état du support (plus ou moins lisse, rayé...) va avoir une incidence sur la formation des biofilms mais aussi sur l'efficacité des techniques de nettoyage/désinfection à détacher les biofilms (Lomander *et al.*, 2004). En exploitations, les biofilms sont plus âgés qu'en laboratoire les rendant plus résistants aux procédures de nettoyage/désinfection (Leriche *et al.*, 2003). Sur le terrain, la diminution de la sensibilité des biofilms aux agents de nettoyage/désinfection peut être amplifiée par la présence de composés organiques sur les surfaces (lait, caillé) susceptibles d'interagir avec ces agents diminuant ainsi leur efficacité (Briand et Bellonfontaine, 2000). On a cherché à évaluer l'efficacité des procédures de nettoyage/désinfection en laboratoire par rapport à la destruction des micro-organismes mais pas par rapport à leur capacité à détacher cette matrice. Celle-ci n'est pas forcément retirée lors du nettoyage et peut favoriser l'implantation d'autres bactéries, d'autant plus qu'elle a des propriétés différentes des résidus alimentaires (Lomander *et al.*, 2004).

De plus, les températures de lavage et les doses de produits sont différentes selon les exploitations et on a pu identifier un effet important de l'Éleveur sur les profils de biofilms obtenus, dépendant en partie des pratiques de nettoyage.

CONCLUSION

Les résultats obtenus au niveau du laboratoire étaient prometteurs en terme de décontamination sélective.

Du fait de conditions d'utilisation très différentes, les résultats obtenus ne sont pas les mêmes en exploitations.

En conditions réelles, les résultats mettent en évidence l'intérêt de supprimer le chlore dans les solutions alcalines de nettoyage/désinfection de la machine à traire (remplacé par de petites quantités de Na₂SO₄) pour améliorer les paramètres d'acidification et favoriser les flores d'affinage. Cela permet aussi de réduire le risque d'avoir des résidus. Cependant, le risque de présence de *Pseudomonas* dans le lait est accru, même si cette observation concerne les laits UHT mis en circulation et non les laits de mélange. La suppression du chlore est donc à envisager avec précaution, suivant la situation propre de chaque éleveur. L'addition de sel en grande quantité ne semble pas éliminer ce problème dans les conditions de l'essai effectué. L'orientation des biofilms est une question complexe. D'autres pistes restent à explorer : autres types de produits sélectifs comme les huiles essentielles (Rhee *et al.*, 2003) ou l'acide acétique associé à la monolaurine (Ammor *et al.*, 2004); ajustement des paramètres de nettoyage ; séchage des installations qui permet de lutter efficacement contre *Pseudomonas* (Sommer, 1999). Il faut veiller à réaliser les essais dans des conditions proches de la réalité.

Par ailleurs, la décontamination sélective des biofilms ne constitue pas le seul moyen de récupérer de la flore positive au niveau de la production fermière. De façon générale, les réservoirs de flores et en particulier de flores utiles au niveau des exploitations (litière, peau des animaux, air...) méritent d'être mieux connus pour être ensuite maîtrisés.

Ammor S., Chevallier I., Laguet A., Labadie J., Talon R., Dufour E., 2004. *Food Microbiology*. 21:11-17.

Bourion F., 1995. Thèse doctorale. ENSIAA.

Briand et Bellon-Fontaine M.N., 1998. 5^e congrès de la société française de microbiologie, 27 au 29 avril 1998, Lille.

Briand et Bellonfontaine M.N., 2000. Salles Propres, 9, 1-17.

Briand et Meylheuc T., Maher C., Bellon Fontaine M.N., 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, n°12 : 5328-5333.

Carpentier B., Chassaing D., 2004. *Int. J. of food Microbiology*, 97 (2), 111-122.

Laithier C., Chatelin Y.M., David V., Tormo H., Lefrileux Y. et Gäuzère Y., 2004. 11^e 3 R, Paris. 11, 95-98.

Leriche V. Briand et R, Carpentier B., 2003. *Environ. Microbiology*, 5, 64-71.

Leriche V., Carpentier B., 2000. *J. Appl. Microbiol.* 88 : 594-605.

Lomander A., Schreuders P., Russek-Cohen E., Ali L., 2004. *Bioresource Technology*. 94 : 275-283.

Richard J., 1997. C.R. Acad. Agric. Fr., 83, n°5, p27-34.

Rhee M.S., Lee S.Y., Dougherty R.H., Kang D.H., 2003. *Appl. and Environ. Microbiology*, 69, 2959-2963.

Sasahara K.C., Zottola E.A., 1993. *J. of Food Prot.*,56,1022-1028.

Sommer P., 1999. Thèse de l'université de Bourgogne.

Trémoulet F., Clement E., Martinie B. et Labadie J., 2002. *Sci. Aliments*, 22 :305-315.

Vasseur C., 1999. Thèse doctorale. Université de Clermont-Ferrand 2.

Wong A.C.L., Cerf O., 1995. *Bulletin of the IDF* 302.