

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

N° d'ordre :
N° de série :

Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie-Microbiologie
Mémoire de Fin d'Etudes pour l'Obtention du Diplôme de Magistère
Option : Biotechnologies Microbiennes

Incidence de *Listeria spp.* et interaction phylogénétique avec la flore bactérienne isolée de laits crus

Présentée par : **AZIZI Nassima**

Soutenue le : ../12/2010

Devant le jury :

Président : Mr. BOUSSEBOUA H. Professeur. Université Mentouri Constantine.

Rapporteur : Mr. HAMIDECHI M.A Maître de conférences Université Mentouri Constantine.

Examineurs: Mr. BERARHI L. Maître de conférences Université Mentouri Constantine.

Mr. KITOUNI M. Maître de conférences Université Mentouri Constantine.

Mr. ARHAB R. Maître de conférences Université de Tébessa.

Année Universitaire : 2009-2010

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

En préambule de ce travail, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur **HAMIDECHI M.A.** Maître de conférence Université Mentouri Constantine qui, en tant que Directeur de mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans lui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

J'exprime ma gratitude à Monsieur **BOUSSEBOUA H.** Professeur. Université Mentouri Constantine d'avoir accepté la présidence du jury de ce travail.

J'exprime également ma reconnaissance à Monsieur **KITOUNI M.** Maître de conférences Université Mentouri Constantine, Monsieur **ARHAB R.** Maître de conférences Université de Tébessa, et Monsieur **BERARHI L.** Maître de conférences Université Mentouri Constantine qui ont accepté de participer à ce jury et d'avoir bien voulu juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à **Mr. MAIZI** Médecin Chef de Laboratoire Central de la Wilaya de Skikda, pour sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges professionnelles.

Un grand remerciement pour tous nos enseignants pour leurs contribution dans notre cursus universitaire, dans le Département de Biochimie /Microbiologie, Université Mentouri Constantine.

MERCI À TOUS ET À TOUTES

DEDICACES

DÉDICACE

Je tiens à dédier ce modeste travail à :

- **Mes** très chers parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience ; et qui ont tous sacrifié pour que ce jour arrive
- **Ma** très cher *YAMA* pour sa tendresse et sa gentillesse
- **Mes** sœurs : *KAOUTHER, HOUDA, NOUA*
- **Mes** frères : *WALID, CHAWKI*
- **Mes** amies : *NASSIMA, WIDAD, MIMI, WASSILA, FATIMA*
- **Tous** mes collègues de promotion
- **Ma** grande famille

Nassima

**TABLE
DES
MATIERES**

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: ETUDE DU GERME	3
1 Position taxonomique.....	3
2 Caractères bactériologiques.....	4
2.1 Morphologie et structures.....	4
2.2 Caractères biochimiques, métaboliques et cultureux.....	4
3 Caractères infra-spécifiques.....	7
3.1 Typage phénotypique.....	7
3.2 Typage génotypique.....	9
4 Caractères physiologiques.....	10
4.1 Influence de la température.....	10
4.2 Influence du pH.....	10
4.3 Influence de l'activité de l'eau.....	10
4.4 Influence de teneur en Na Cl.....	11
4.5 Interactions <i>L. monocytogenes</i> et autres microorganismes.....	11
5 Physiopathologie moléculaire et Listériose.....	12
CHAPITRE 2: CONTAMINATION DES LAITS CRUS PAR <i>Listeria spp</i>	14
CHAPITRE 3 : TAXONOMIE BACTERIENNE ET PHYLOGENIE.....	15

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

1. Prélèvements.....18
2. Méthodes d'analyses.....19
2.1 Analyses microbiologiques19

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats.....27
2. Discussion.....43

PARTIE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....51

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....53

ANNEXES.....

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractères biochimiques communs au genre <i>Listeria</i>	5
Tableau 2 : Différenciation des espèces de <i>Listeria</i>	5
Tableau 3 : Distribution des sérovars dans les espèces de <i>Listeria</i>	8
Tableau 4: Incidence de <i>Listeria monocytogenes</i> dans le lait cru.....	14
Tableau5 : Identification des prélèvements de laits crus.....	18
Tableau 6 : Les tests d'identification présomptive des souches isolées.....	23
Tableau 7: Dénombrement de FTAM en UFC /ml dans la wilaya de TEBESSA	27
Tableau 8: Dénombrement de FTAM en UFC /ml dans la wilaya de SKIKDA	28
Tableau 9: Identification présomptive des souches isolées de la région de SKIKDA	30
Tableau 10: Identification présomptive des souches isolées de la région de TEBESSA	31
Tableau 11: Répartition des souches isolées selon le Gram.....	32
Tableau12 : Matrice des distances des souches à Gram positif.....	35
Tableau13 : Matrice des distances des souches à Gram négatif.....	36
Tableau14 : Incidence de <i>Listeria spp</i> dans le lait cru de ferme dans l'Est algérien (TEBESSA et SKIKDA).....	46
Logigramme 1 : La démarche de la taxonomie numérique	16
Logigramme 2 : Les étapes de recherche de <i>Listeria spp</i>	24

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Différenciation biochimique des <i>Listeria</i>	6
Figure 2: Différenciation biochimique des <i>Listeria</i> selon Gorski L.....	6
Figure 3: Les gènes de virulence de <i>L. monocytogenes</i>	13
Figure 4: Etapes pour l'isolement des colonies de la FTAM.....	20
Figure 5: Aspect des colonies de <i>Listeria spp.</i> sur gélose Palcam.....	25
Figure 6: Test CAMP.....	25
Figure 7: Aspect des colonies de <i>L.cf monocytogenes</i> sur gélose au sang frais.....	33
Figure 8: Aspect des colonies de <i>Listeria spp.</i> sur gélose TSA.....	33
Figure 9: Arbre UPGMA des souches à Gram positif	37
Figure 10: Arbre NJ des souches à Gram positif.....	38
Figure 11: Arbre UPGMA des souches à Gram négatif.....	39
Figure 12: Arbre NJ des souches à Gram négatif	39
Figure 13: Arbre UPGMA construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram positif.....	40
Figure 14: Arbre NJ construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram positif	41
Figure 15: Arbre UPGMA construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram négatif	42
Figure 16: Arbre NJ construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram négatif.....	42
Figure 17: Moyenne mensuelle des températures minimales et maximales quotidiennes relevées sur Skikda et sur Tébessa.....	44
Figure 18 : Valeurs moyennes des précipitations (mm) relevées sur la wilaya de Skikda et la wilaya de Tébessa.....	44

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH : Arginine di hydrolase

LDC : Lysine décarboxylase

ODC : ornithine décarboxylase

ONPG: 2-nitrophényl- β D-galactopyranoside

ONPG: 2-nitrophényl- β D-galactopyranoside

TDA : Tryptophane désaminase

INTRODUCTION

Introduction

La sécurité sanitaire des aliments a été au centre des préoccupations de l'humanité, dès les premières civilisations. Au cours des dernières décennies, la découverte des microorganismes dans l'industrie alimentaire a rendu nécessaire l'adoption de diverses mesures de sécurité sanitaire des aliments.

Un des effets les mieux connus des microorganismes contaminants nos aliments est la dégradation de la qualité hygiénique et la qualité marchande. Tous nos produits alimentaires peuvent être le siège de prolifération microbienne, prolifération d'autant plus variée que le produit est "riche" en éléments nutritifs et placé dans des conditions favorables à la croissance microbienne, citant l'exemple des produits laitiers à base de lait cru :

Les germes de l'environnement trouvent dans le lait un excellent milieu de culture. Ceci le rend dangereux pour le consommateur, selon les critères d'hygiène alimentaire. La recherche dans ce cas portera sur les germes fécaux (entérobactéries en général) et certains germes particuliers dont *Listeria monocytogenes*.

L'hétérogénéité phénotypique et génotypique de *L. monocytogenes* a été évoquée pour expliquer la colonisation des niches écologiques dans lesquelles survit cette bactérie. (Gilmour, 2004). Elle est communément trouvée dans les sols, l'eau et dans les végétaux, particulièrement ceux en décomposition. Cet environnement est considéré comme l'habitat naturel du germe (Rocourt et al., 1985).

L. monocytogenes est un germe ubiquiste responsable d'une maladie invasive rare, mais grave : la listériose ; ses manifestations les plus caractéristiques sont une méningite et une septicémie périnatale. *L. monocytogenes* est considérée comme un agent pathogène important en santé publique puisqu'il est à l'origine d'épidémies alimentaires à travers le monde.

De nombreuses études ont montré la présence de *L. monocytogenes* dans les produits laitiers surtout à base de lait cru, avec une incidence qui varie d'un pays à un autre. Un calcul d'incidence peut être réalisé pour les pays qui disposent d'un système de surveillance permettant de recenser les cas au niveau national. L'Italie recense 30% des cas de listérioses par rapport aux maladies infectieuses ; les états unis ont une surveillance active sur quelques états permettant de calculer une incidence extrapolée à l'ensemble de la population du pays ; l'analyse microbiologique a montré que 3 % des échantillons de laits crus sont contrôlés positifs concernant la présence de *L. monocytogenes* (Lund et al., 1991) ; en Allemagne, 17,6% des échantillons de végétaux crus contiennent *L. monocytogenes*

et en Grande-Bretagne, après la nette diminution consécutive à la fin de l'épidémie en 1987-1989, l'incidence demeure faible, comprise entre 1,6 et 2,5 cas par million d'habitants.

En France, plusieurs enquêtes effectuées en 1984, 1986, 1987 et 1988 auprès de l'ensemble des laboratoires hospitaliers (*Goulet et Brohier 1989*) avaient montré que l'incidence variait au cours de ces années entre 11 et 14 cas/million d'habitants.

Notre recherche bibliographique a révélé qu'il existe peu de données algériennes publiées sur l'incidence de la contamination des laits crus par *Listeria spp.*, surtout dans les régions de l'Est algérien, bien que le JORADP exige sa recherche dans les produits laitiers, et toutes les denrées alimentaires. Des résultats ont confirmé la présence de *L. monocytogenes* au taux de 2.61% (Mossadek ; 2007) qui prouve qu'on n'est pas à l'abri d'une éventuelle épidémie.

C'est par rapport à cette situation que nous avons tracé les objectifs suivants:

- Etudier l'incidence écologique de *Listeria spp.* dans deux wilayas de l'Est algérien à savoir TEBESSA et SKIKDA.
- Mettre en évidence les interactions phylogénétiques de *Listeria spp.* avec la flore bactérienne isolée des différents laits crus.
- Confronter nos résultats d'identification aux séquences de DNA r 16S relevées sur *GenBank*. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>]

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE 1 : ETUDE DU GERME

1-Position taxonomique

C'est en Angleterre, à Cambridge, en 1926, Murray, Webb et Swann isolèrent un petit bacille à Gram positif du sang de lapins atteints d'une mononucléose sanguine qu'ils nommèrent "*Bacterium monocytogenes*".

En outre, le germe a été isolé par Pirie à partir de gerbille sauvages infectés. Pirie a proposé le nom de *Listerella* pour le genre en honneur au chirurgien "Lord Lister".

Murray et Pirie réalisèrent qu'ils ont procédé à l'isolement de la même espèce bactérienne et ainsi ils combinèrent les noms pour former *Listerella monocytogenes* qui sera changé pour des raisons de taxonomie en *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940).

En 1961, Prévot proposa l'appellation de *Listeria denitrificans* pour une unique souche bactérienne isolée en 1948 par Sohier, Benazet et Piéchaud à partir de sang de bœuf chauffé. Ultérieurement, ont été décrites les espèces *Listeria grayi* et *Listeria murrayi*. Ces quatre espèces ont été retenues dans les *Approved Lists of Bacterial Names* mais, depuis la parution de ces listes, la systématique du genre *Listeria* a été profondément modifiée.

Le genre *Listeria* appartient à la branche phylogénétique des *Clostridium*, avec *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Brochothrix* et *Bacillus*. (Bergey's, 1994).

Les *Listeria* font partie des *Listeriaceae*. Cette position, au sein des bactéries à Gram positif est devenue évidente avec les résultats de la Taxonomie numérique, puis s'est imposée sans ambiguïté avec ceux du séquençage de l'ARN ribosomique 16S. (Larpen, 2000). Depuis, d'autres espèces de *Listeria* ont été décrites et, notamment grâce aux méthodes d'analyses génétiques, la systématique du genre *Listeria* a été affinée. En effet, le genre *Listeria* regroupe six espèces : *monocytogenes*, *innocua*, *ivanovii*, *welshimeri*, *seeligerri*, *grayi*. (Farber et Peterkin, 1991)

2- Caractères bactériologiques

2.1- Morphologie et Structures

Listeria sont des bacilles à Gram positif. Se présentent sous forme de bâtonnets courts et réguliers de 0,4 à 0,5 µm de diamètre sur 0,5 à 2 µm de long, aux extrémités arrondies; certaines cellules pouvant toutefois être incurvées. Elles se présentent de manière isolées ou groupées en V ou en L, en palissade ou en courte chaînette.

Les *Listeria* sont des bactéries non acido-alcool-résistantes, non capsulées, non sporulées, non pigmentées et sans structure extra-cellulaire telle que les fimbriae.

Lorsque la culture est réalisée à 20-25°C, elles sont mobiles grâce à quelques flagelles de type péritriches, mais sont immobiles ou faiblement mobiles à 37°C.

2.2- Caractères biochimiques, métaboliques et cultureux

Listeria est une bactérie aéro-anaérobie facultative. Sur gélose nutritive, elle forme en 24-48 h à 37°C des colonies de 0,5 à 1,5 mm de diamètre, translucides, à reflets bleutés en lumière oblique. Sur gélose au sang de mouton ou de cheval, elle donne des colonies β-hémolytiques. *L. monocytogenes* se développe bien sur les milieux empiriques riches (milieu cœur cerveau, milieu à la peptone de caséine et de soja additionné d'extrait de levure).

En milieux synthétiques, ses exigences de base concernent certains amino-acides, des vitamines, mais pas de bases nucléiques (*Premaratne et al., 1991*).

Sur le milieu synthétique de *Welshimer* (1968), sa croissance est stimulée par l'addition de fer (Fe³⁺) et cet effet stimulant est proportionnel à la concentration de fer ajouté (*Sword, 1966*). L'apport d'esculine et de citrate stimule aussi sa croissance.

Les caractères biochimiques communs au genre *Listeria* sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractères biochimiques communs au genre *Listeria* (Larpent, 2004).

Réactions Positives	Réactions Négatives
Mobilité à 22 °C	ONPG
Catalase	Oxydase = AAF
Acidification du glucose, fructose, mannose, amygdaline, salicine, cellobiose, maltose, tréhalose, arabitol	Production de gaz sur glucose
Rouge de méthyle	Uréase
Voges-Proskauer	Production de l'indole
Type respiratoire : aéro-anaérobie	Gélatinase
Réduction du lait tournesolé	Production d'H ₂ S
Hydrolyse de l'esculine	Xylose , ribose , mannitol

Les espèces de *Listeria* peuvent être différencier sur la base de plusieurs caractères. Le tableau 2 résume cette distinction.

Tableau 2 : Différenciation des espèces de *Listeria*. (Rocourt et Jacquet, 2000).

	Hémolyse	CAMP test <i>S. aureus</i>	CAMP test <i>R. equi</i>	D-xylose	L-rhamnose	D-mannoside	Ribose	Mannitol
<i>L.monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. ivanovii</i> (<i>sub.ivanovii</i>)	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>L.ivanovii</i> (<i>sub.iondoni.</i>)	+	-	+	+	-	d	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	d	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	+	d	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-	Non définie	-	+

(+) : positif, (-) : négatif, (d) : différencié

Comme, on peut distinguer les espèces en se basant sur la clé dichotomique (figure 1).

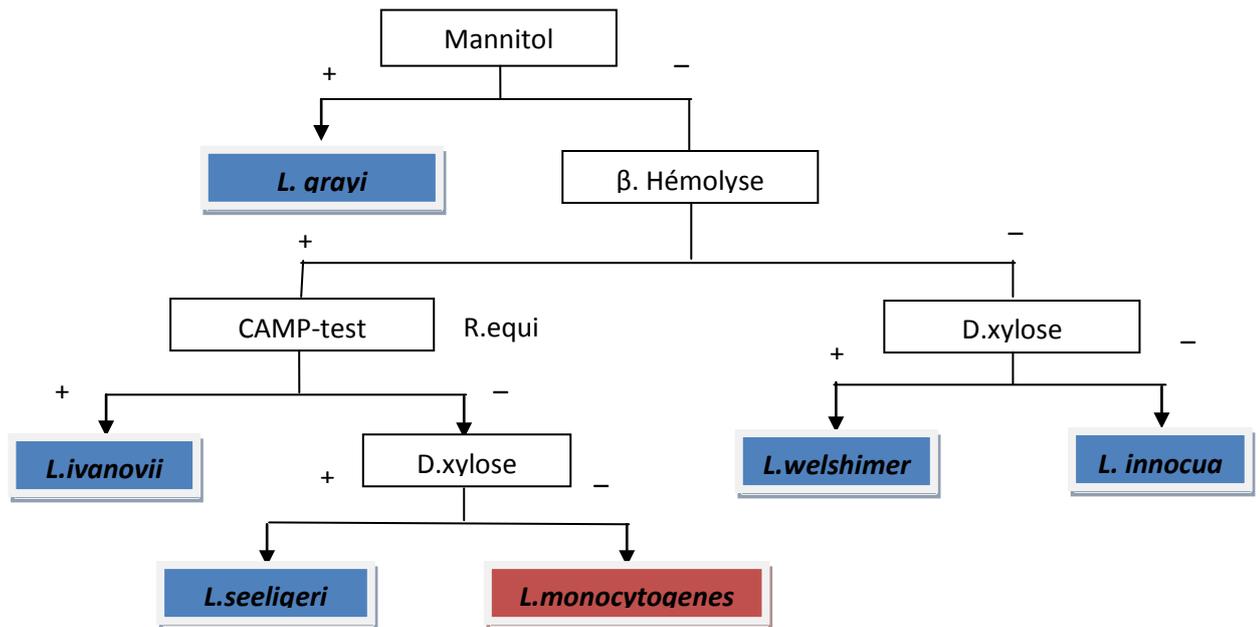


Figure 1 : Différenciation biochimique des *Listeria*.

Alors que Gorski L. (2008), quant à elle, propose le chemin dichotomique suivant :

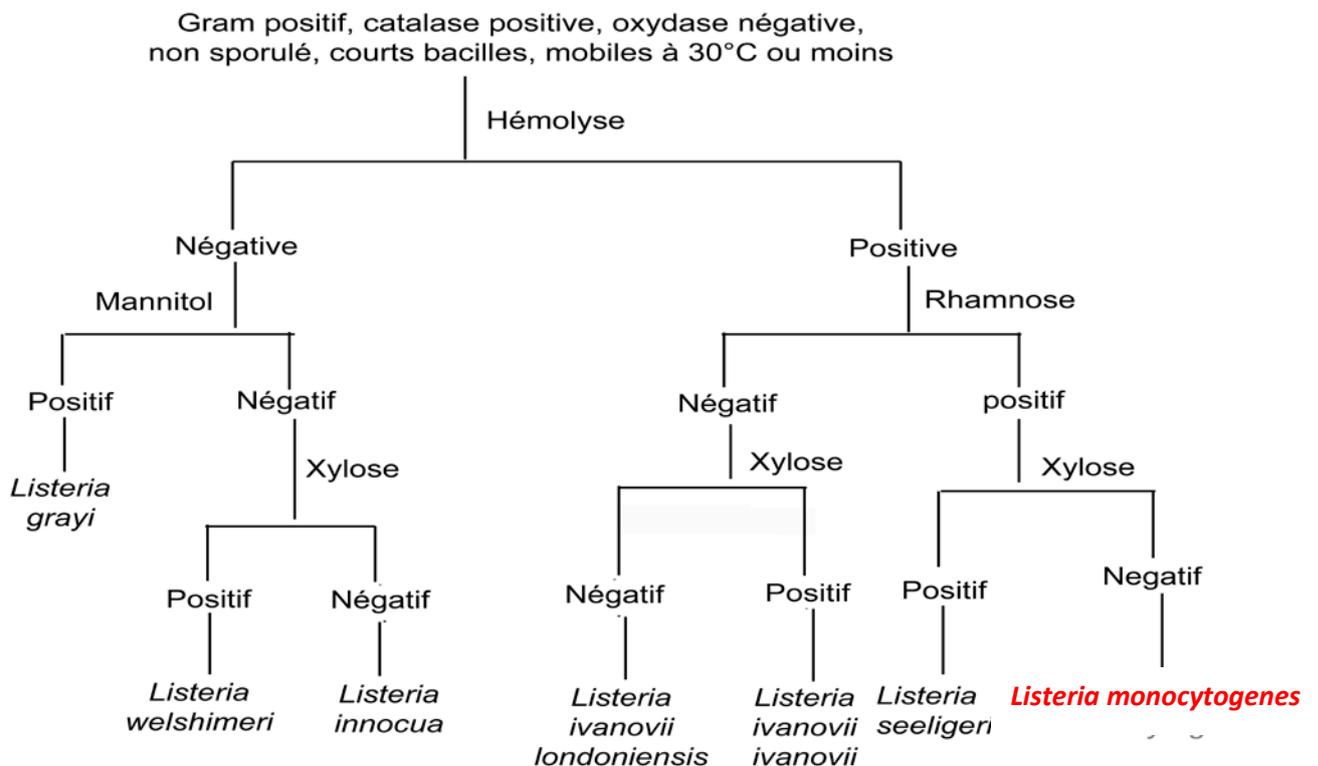


Figure 2 : Différenciation biochimique des *Listeria* selon Gorski L. (2008)

3-Caractères infra-spécifiques

3.1-Typage phénotypique : Le typage des souches permet de subdiviser les groupes bactériens à un degré inférieur à celui de l'espèce et ainsi de comparer finement les isolats. Il est alors possible de suivre la dissémination des bactéries dans l'environnement et d'identifier l'origine des contaminations. C'est un outil indispensable pour une meilleure connaissance de l'écologie de la bactérie.

3.1.1-Sérotypie : On distingue, au sein du genre *Listeria* ; 15 antigènes somatiques O (notés de I à XV) et 5 antigènes flagellaires H (notés de A à E). La combinaison de ces différents facteurs dans une même bactérie permet de reconnaître actuellement 17 sérovars. (Donker-Voet, 1972 ; Garcia et al., 1990; Larpent, 2004) (tableau 3).

3.1.2 - Lysotypie : fondée sur la sensibilité aux bactériophages et permet de subdiviser les souches d'un même sérovar. Actuellement, 219 phages sont répertoriés. (Larpent, 2004).

3.1.3-Électrophorèse d'isoenzymes: (Multi Locus Enzym Electrophoresis : MLEE). Elle consiste en l'analyse de la mobilité électrophorétique de plusieurs enzymes métaboliques. Les différents profils électrophorétiques permettent d'analyser les variations génétiques au sein d'une population bactérienne.

Pour *L. monocytogenes* l'analyse des électrotypes permet d'individualiser deux grandes subdivisions : une constituée par les sérovars 1/2b, 3b, et 4b, comporte au moins 22 électrotypes différents et l'autre, constituée par les sérovars 1/2a, 1/2c et 3a, comporte au moins 45 électrotypes différents (Euzéby, 2000).

Tableau 3 : Distribution des sérovars dans les espèces de *Listeria*.

Sérotype	Antigène O	Antigène H	Espèces
1/2a	I, II	A, B	<i>L.monocytogenes, L.seeligeri, L.welshimeri</i>
1/2b	I, II	A, B, C	<i>L.monocytogenes, L.seeligeri</i>
1/2c	I, II	B, D	<i>L.monocytogenes, L.seeligeri</i>
3a	II, IV	A, B	<i>L.monocytogenes</i>
3b	II, IV	A, B, C	<i>L.monocytogenes</i>
3c	II, IV	B, D	<i>L.monocytogenes</i>
4a	(V), VII, IX	A, B, C	<i>L.monocytogenes</i>
4ab	V, VI, VII, IX	A, B, C	<i>L.monocytogenes, L.innocua</i>
4b	V, VI	A, B, C	<i>L.monocytogenes, L.seeligeri</i>
4c	V, VII	A, B, C	<i>L.monocytogenes, L.seeligeri, L.welshimeri</i>
4d	(V), VI, VIII	A, B, C	<i>L.monocytogenes, L.seeligeri</i>
4e	V, VI, (VIII), (XI)	A, B, C	<i>L.monocytogenes</i>
5	(V), VI, (VIII), X	A, B, C	<i>L.ivanovii</i>
6a	V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C	<i>L.innocua, L.welshimeri</i>
6b	(V), (VI), (VII), IX, X, XI	A, B, C	<i>L.innocua, L.seeligeri, L.welshimeri</i>
7	XII, XIII	A, B, C	<i>L.monocytogenes</i>
<i>L.grayi</i>	(III), XII, XIV	E	<i>L.grayi</i>

Remarque : Les spécificités antigéniques O entre parenthèses ne sont pas toujours présentes.

3.2-Typage génotypique : Les méthodes de typage phénotypiques, très anciennes, sont complétées, par des méthodes génotypiques plus récentes qui reposent sur la caractérisation du génome et s'appliquent à de nombreuses espèces bactériennes. Elles ont été particulièrement bien développées et rapidement appliquées à *L. monocytogenes* en raison de l'importance du problème épidémiologique posé par la listériose :

- La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism Pattern) : qui consiste à analyser le polymorphisme électrophorétique de certains gènes chromosomiques à partir d'une électrophorèse d'ADN total couplé à un transfert et une hybridation avec certains fragments d'ADN. (*Paillard et al., 2003 in Churchil*).
- Le ribotypage : est une technique fondée sur le même principe que RFLP. La sonde utilisée étant une séquence d'ADN s'hybridant avec les gènes codant pour l'ARNr. C'est une technique très largement utilisée pour la caractérisation de nombreuses espèces bactériennes (*Grimont et Grimont, 1986*).
- La technique de Détermination du profil de restriction de l'ADN après électrophorèse en champ pulsé PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis): fondée sur l'électrophorèse de gros fragments d'ADN généré après l'action d'enzyme de restriction. Cette électrophorèse s'effectue selon un procédé qui permet la migration de gros fragments d'ADN. (*Murchie et al., 2005*), la technique est l'une des plus discriminantes pour le typage de *L. monocytogenes*. (*Gianfranceschi et al., 2009*)
- La technique RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA): fondée sur l'amplification génique ; les amorces choisies sont utilisées au hasard. Cette méthode est plus rapide à mettre en œuvre mais manque parfois de reproductibilité.
- Enfin des méthodes se sont développées telles que la PCR-Ribotyping, la REP-PCR et l'ERIC-PCR. Ces techniques sont mises en œuvre conjointement lors d'enquête ou d'étude en épidémiologie. (*Vanegaz et al., 2009*)

4- Caractères physiologiques

4.1 Influence de la température

Listeria est une bactérie psychrotrophe dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. La croissance est démontrée expérimentalement entre -2°C et +45°C (Augustin, 1999). Les températures minimales de croissance observables sur gélose tripticase-soja dans une durée d'incubation de 10 jours sont comprises entre +0,5°C et +3,0°C, avec une moyenne de +1,1°C (Junttila et al., 1988). D'autre part *L. monocytogenes* n'est pas considérée comme un germe thermorésistant et elle est rapidement détruite à 60°C (Bréand et al., 1998).

4.2 Influence du pH

L. monocytogenes se multiplie entre pH 4,6 et pH 9,6 avec un optimum à pH 7,1 à l'optimum thermique (Pearson et Marth, 1990). Ces valeurs « pH cardinaux » dépendent toutefois de la nature et de la concentration de l'acide, et de la nature du milieu.

L. monocytogenes est rapidement détruite au-dessus de pH 10 ou aux pH inférieurs au pH min (Vasseur et al., 1999). Elle peut toute fois survivre pendant de très longues périodes à des pH proches de 4 comme c'est le cas dans les ensilages de maïs sans que l'on connaisse l'origine génétique ou adaptative du phénomène (Ryser et al., 1997). Un stress alcalin (NaOH, pH 9) est rapidement surmonté par *L. monocytogenes* (Cheroutre-Vialette et al., 1998).

4.3 Influence de l'activité de l'eau

L'activité de l'eau (A_w) minimale pour la croissance de *L. monocytogenes* est de 0,90 (Farber et al., 1992). Le glycérol est utilisé pour ajuster ce facteur dans le milieu, de 0,92 ou 0,93 avec du NaCl ou avec du saccharose si le milieu employé est à base d'extrait de viande (Nolan et al., 1992).

Listeria se développe à un optimum de $A_w = 0,97$, mais elle peut se développer à 0,943. Un A_w inférieure à 0,939 ne semble pas permettre la croissance. La bactérie reste viable plusieurs jours pour des valeurs d' A_w plus faibles (Larpen 2004).

4.4 Influence de teneur en Na Cl

L. monocytogenes ne se développe en général pas dans les solutions contenant plus de 10 % à 11 % de Na Cl (Nolan *et al.*, 1992). Toutefois, des souches peuvent survivre dans des saumures de fromagerie contenant de 13 à 14 % de Na Cl (Farber *et al.*, 1992). La survie dans une saumure à 25 % de Na Cl après un choc thermique de 1 h à 45°C a été décrite (Lou *et Yousef*, 1997). Kukharkova *et al.*, (1960) ont démontré que *L. monocytogenes* survivait plus de 60 jours dans la viande stockée à 4°C dans une solution de saumure à 30 % de Na Cl qui contenait aussi des nitrates.

4.5 Interactions *L. monocytogenes* et autres microorganismes

De très nombreuses interactions antagonistes de *L. monocytogenes* ont été décrites *in vitro* ou encore dans des produits laitiers à l'échelle du laboratoire. La plupart font appel à l'action de bactériocines produites par des ferments lactiques ou par des ferments d'aromatisation, parmi ces bactériocines: la nisine qui est la plus anciennement connue et son efficacité prouvée dans le lait (Kim *et al.*, 2008). De nombreuses autres bactériocines ont été décrites depuis 20 ans: lacticine, helveticine, sakacine, divercine, pediocine. (Huang *et al.*, 2009).

Indépendamment des bactériocines, des phénomènes de compétition ont été décrits, où intervient l'effet inhibiteur propre d'acides organiques issus de la fermentation des sucres ou du pH final des produits (Schaak *et Marth*, 1988 ; Breidt *et al.*, 1998).

Certaines espèces de *staphylococcus*, en particulier *Staphylococcus sciuri*, semblent freiner la colonisation des surfaces par *Listeria* sous forme de bio films (Leriche *et al.*, 2000) ; ces effets auraient pour origine la production par ces bactéries de surfactants inhibant partiellement l'adhésion de *L. monocytogenes* à la surface des environnements de fabrication.

5- Physiopathologie moléculaire et Listériose

L. monocytogenes est une bactérie intracellulaire facultative. Elle peut se multiplier dans les monocytes et les macrophages résidants des tissus, mais les polynucléaires neutrophiles lui sont très bactéricides (Czuprynski et al., 1984).

Cette bactérie peut aussi envahir et se multiplier dans de nombreuses autres cellules de l'hôte infecté, incluant les cellules épithéliales (anthérocytes), les fibroblastes, les hépatocytes et les cellules endothéliales (Havell, 1986). Cette multiplication intracellulaire est à l'origine de foyers granulomateux disséminés dans les tissus des hôtes infectés, constituant une miliaire infectieuse avec accumulation de cellules inflammatoires (polynucléaires, monocytes, lymphocytes, etc.). A partir des foyers granulomateux, *L. monocytogenes* peut disséminer par voie sanguine et infecter le système nerveux central et le placenta.

La porte d'entrée de l'infection chez l'homme est digestive ; à la suite de l'absorption d'aliments contaminés (Farber et Peterkin, 1991). L'existence de Listérioses cutanées dans des métiers à risque (vétérinaires, éleveurs) laisse penser que la contamination est dans ce cas, directe lors d'une manipulation d'animal infecté.

Le cycle de réplication intracellulaire se déroule en plusieurs étapes :

- Les bactéries adhèrent aux cellules par l'internaline qui est une protéine de surface de 80 kDa, codée par un gène chromosomique, le gène *inlA* (Gaillard et al., 1991). Cette protéine interagit avec des récepteurs de type E-cadhérine présents sur les cellules infectées (Mengaud et al., 1996). Cette interaction spécifique induit la phagocytose.
- Un gène adjacent à *inlA*, appelé *inlB* (Gaillard et al., 1991), codant une protéine de surface qui agirait en synergie avec l'internaline ; favorisant l'entrée dans les hépatocytes (Dramsi et al., 1995). Les bactéries ne peuvent pas se multiplier et vont tenter d'échapper au phagosome, où elles sont exposées à l'activité microbicide des cellules.
- Les bactéries accèdent au cytoplasme et se multiplient dans cet environnement favorable. Cet échappement se fait par destruction de la membrane du phagosome par l'action synergique de la listériolysine O qui est une exotoxine hémolytique de 58 kDa codée par le gène *hly* (Cossart et al., 1989), et d'une phosphatidylinositol phospholipase C codée par le gène *plcA* (Camilli et al., 1993).

- La réplication intracytoplasmique s'accompagne d'une polymérisation de l'actine F en actine G à la surface des bactéries (Tilney *et al.*, 1990). Cette polymérisation est due à la protéine bactérienne actA (Kocks *et al.*, 1992).
- Le mouvement intracellulaire de *L. monocytogenes* induit par la protéine actA entraîne la dissémination des bactéries aux cellules adjacentes.

Les gènes de virulence sont répartis en un îlot chromosomique de pathogénicité de part et d'autre du gène *hly* avec, en amont, l'opéron lécithinase rassemblant les gènes *mpl* (Poyart *et al.*, 1993), qui code une métallo protéase zinc-dépendante impliquée dans la maturation de la phosphatidyl-choline phospholipase C, et les gènes *actA* et *plcB* ; et en aval, l'opéron *prfA*, comprenant le gène *prfA* et le gène *plcA* (Dramsai *et al.*, 1993). Les gènes *inlA* et *inlB* se trouvent à une certaine distance sur le chromosome. L'ensemble des gènes de virulence est contrôlé positivement par l'activateur transcriptionnel *PrfA*. (Figure 03)

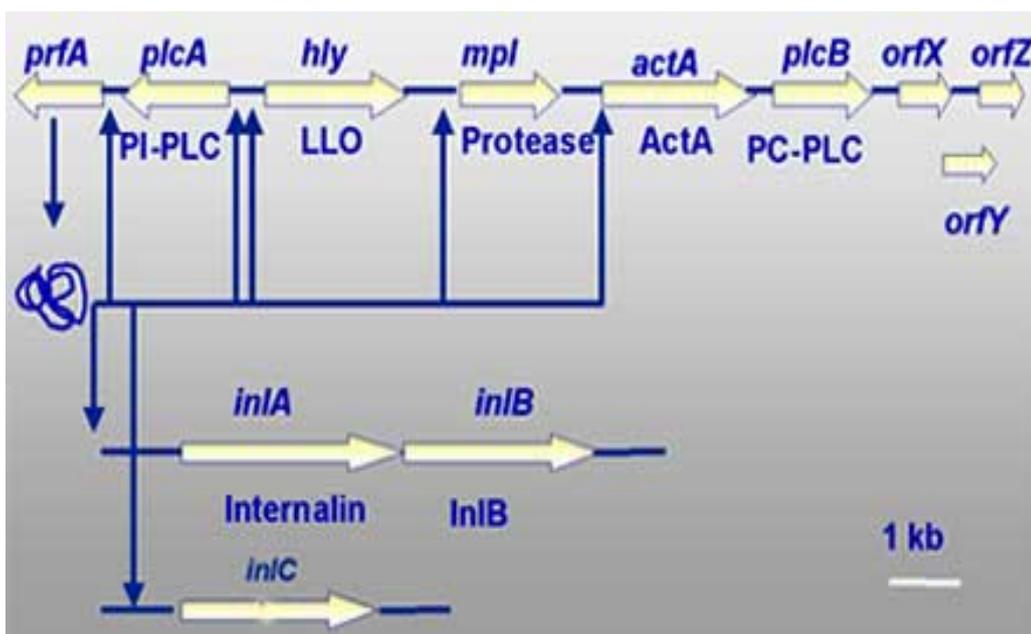


Figure 03 : Les gènes de virulence de *L. monocytogenes*

(**prfA** : opéron comprenant le gène *prfA* - **PI-PLC**: phosphatidyl-inositol-phospholipase C - **PC-PLC** : phosphatidyl-choline-phospholipase C - **LLO** : listeriolysine O - **hly** : gène codant la LLO - **mpl** : gène codant une métallo protéase - **ActA** : Actine A - **InIA** : internaline A - **InIB** : internaline B - **InIC** : internaline C)

CHAPITRE 2: CONTAMINATION DE LAITS CRUS PAR *listeria spp.*

Du fait de son caractère ubiquitaire, *Listeria* peut être retrouvée avec une fréquence variable dans toutes les denrées alimentaires, brutes ou transformées, présentées à la consommation à l'état cru ou peu cuit (produits végétaux, viandes et produits carnés, laits et produits laitiers, poissons et produits de la mer). (Larpen, 2004)

La contamination du lait cru peut être :

- Une contamination interne et directe : dans ce cas, la bactérie peut traverser le tractus intestinal de l'animal, passer dans la circulation sanguine et contaminer le lait au moment de son excrétion ; ce cas est rare.
- Une contamination externe et indirecte : celle-ci, viendra de l'environnement contaminé à savoir le paillage, les matières fécales, les trayons souillés de la vache, le matériel de traite mal nettoyé et mal désinfecté et ce, pendant la traite ou juste après ; ce cas est la principale source de contamination du lait cru à la ferme.

La fréquence de *L.monocytogenes* dans le lait cru de vache est très variable selon les études. Elle est présentée dans 1 à 45% des échantillons (Jouve et al., 1991) (tableau4). Cette fréquence de contamination varie avec la saison d'où un plus grand nombre de laits crus contaminés par *L. monocytogenes* au printemps et en été (Marth, 1986). Les données sur le lait de chèvre et de brebis sont plus rares ; la fréquence de contamination est d'environ 4% pour le lait de chèvre et de 1 à 2% pour le lait de brebis (Rodrigues et al., 1994). Ces fréquences peuvent varier selon les modalités d'élevage.

Tableau 4: Incidence de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru.

pays	Nombre d'échantillons analysés	% d'échantillons positifs	Références
France	349	11,7	Joure et Lahellec, 1991
USA	300	03	Lund et al., 1991
France	486	2,4	Broseta et al., 2003
Angleterre	18	4,4	Gilmour, 2004
Türkiye	47	00	Aygun et al., 2006
Algérie	153	2,6	Taha Mossadek, 2007
Iran	88	1,13	Abedi Jalali, 2008
UK	1819	2	Little et al., 2008
Colombie	81	25,9	Vanegas et al., 2009

CHAPITRE 3: TAXONOMIE MICROBIENNE ET PHYLOGENIE

La taxonomie est l'étude de la diversité des microorganismes et les interactions qui peuvent exister entre eux. Elle englobe trois domaines :

- La classification,
- La nomenclature,
- L'identification.

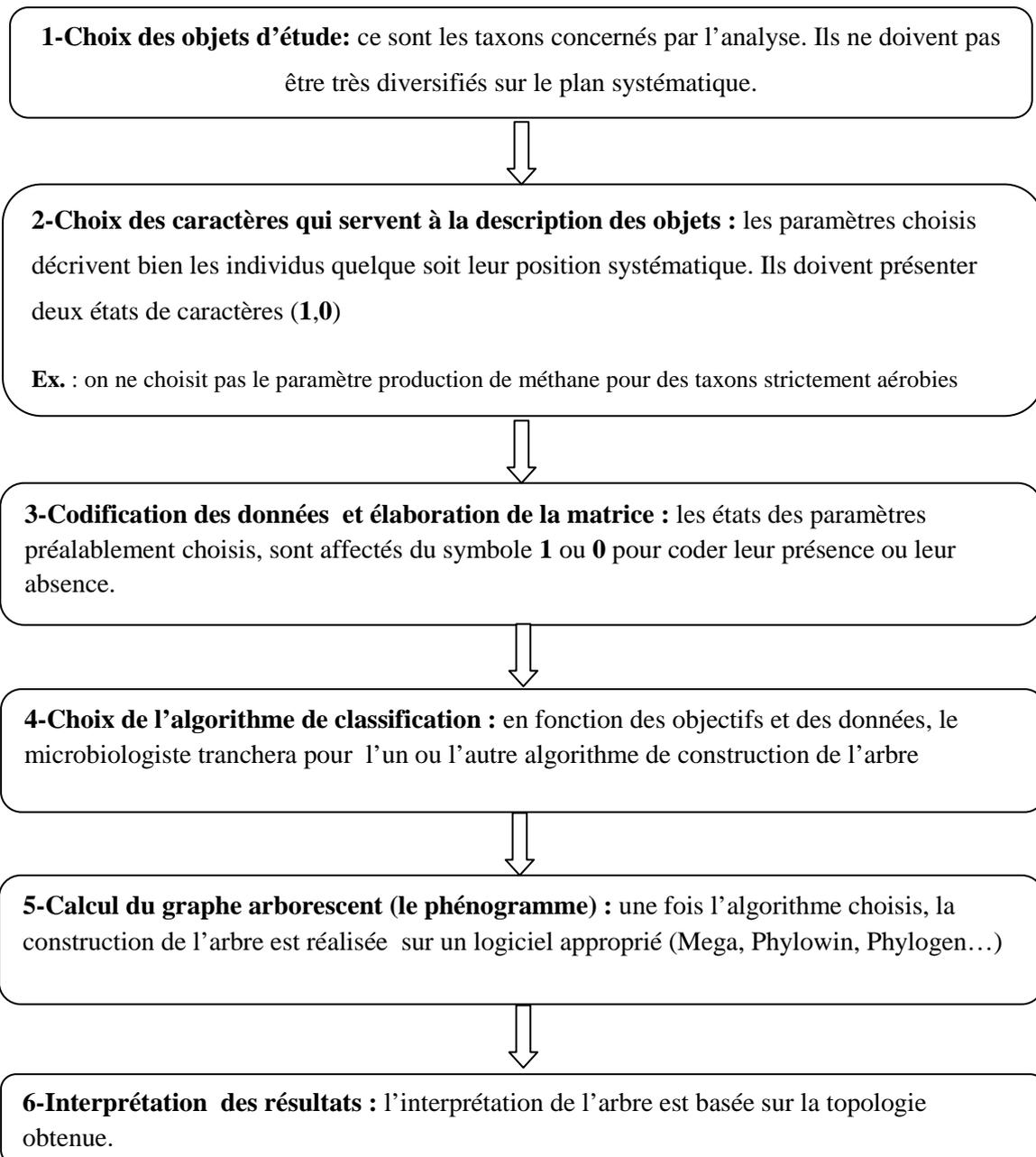
En fonction de la nature des données, les différentes approches taxonomiques sont :

- La taxonomie phénotypique: s'intéresse aux données anatomiques, histologiques, morphologiques.....
- La taxonomie numérique: concerne les patterns binaires (présence, nombre, 1,0).
- Chimio-taxonomie: l'examen des structures des acides gras, des acides aminés et autres; constituent les principaux caractères utilisés.
- La taxonomie moléculaire: concerne les séquences d'ADN et des protéines.

La taxonomie numérique est une démarche utilisée pour :

- Décrire un individu et le situer relativement à d'autres.
- classier des groupes systématiques peu étudiés.
- inclure des espèces nouvelles dans des classifications anciennes.

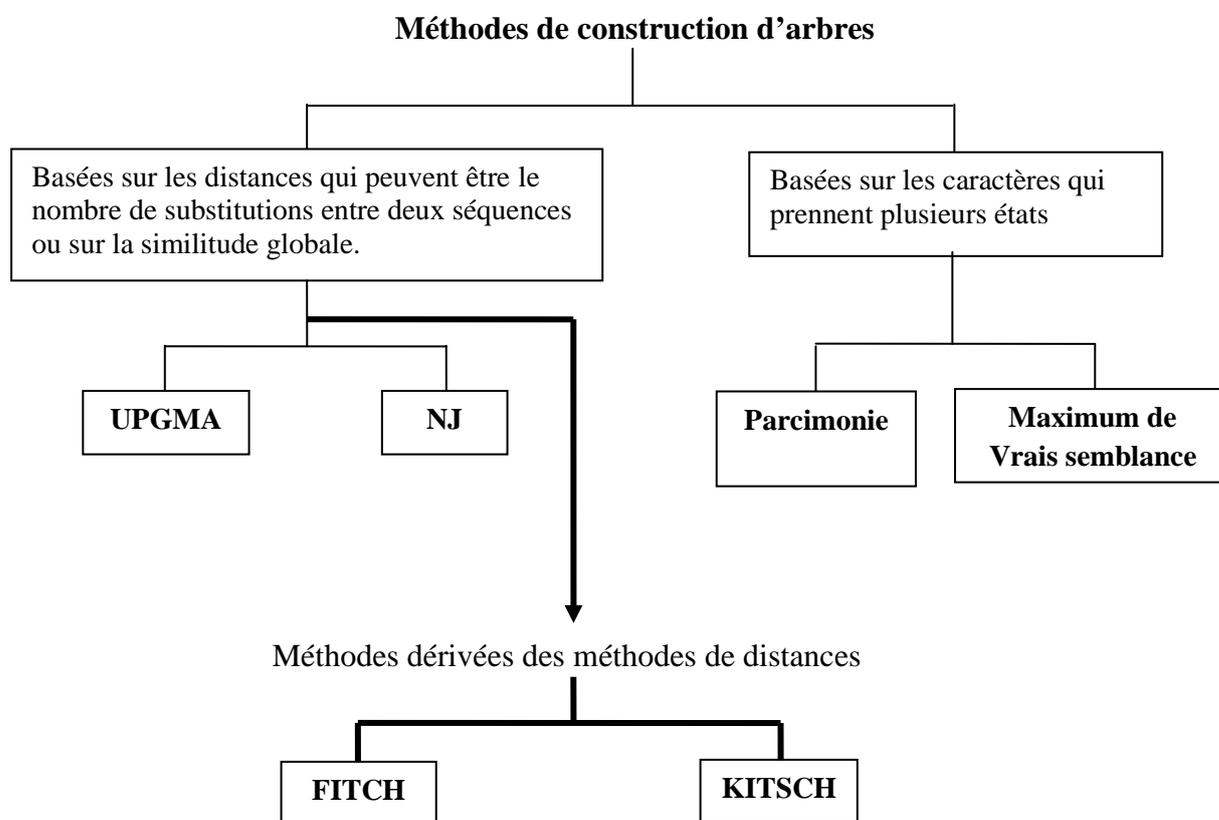
Selon *Anderegg (1973)*, les étapes qui composent la démarche de la taxonomie numérique sont les suivantes :



Logigramme 1 : La démarche de la taxonomie numérique (Anderegg, 1973).

Remarque : l'enracinement de l'arbre n'est pas une obligation absolue, mais une nécessité par rapport à la qualité des clades obtenus.

Il existe plusieurs méthodes pour calculer des arbres phylogénétiques ; ces méthodes peuvent se regrouper en deux catégories :



Les méthodes de distances sont basées sur l'utilisation d'une matrice où sont consignées les distances calculées pour toutes les combinaisons deux par deux des OTU_S (operationnal taxonomic units). L'application des algorithmes plus ou moins complexes permet de déduire, à partir de la matrice de distance, les relations phylogénétiques des OTU_S sous forme de dendrogrammes et de rassembler dans un même clade de similitude les espèces les plus rapprochées. On peut citer deux principales méthodes de construction d'arbres :

- La méthode UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean)
- La méthode de Neighbor-Joining (NJ)

MATERIEL
ET
METHODES

1. Prélèvements

Nous avons récolté le lait de vache à partir de huit fermes situées dans deux wilayas de l'Est algérien : SKIKDA (28 prélèvements) et TEBESSA (22 prélèvements) ; soit un total de 50 échantillons dont la description est portée sur le tableau 5.

Tableau5: Identification des prélèvements de laits crus.

REGION		DATE DE PRELEVEMENT	NOMBRE D'ECHANTILLON
WILAYA	COMMUNE		
SKIKDA	BENI BECHIR	19/12/2009	01
SKIKDA	HAMMADI KROUMA	24/12/2009	09
SKIKDA	RAMDANE DJAMEL	15/03/2010	06
SKIKDA	SIDI MAZGHICHE	14 /03/2010	03
SKIKDA	MEDJAZ DECHICHE	19/03/2010	03
SKIKDA	GUESSABA	31/03/2010	02
SKIKDA	SIDI MAZGHICHE	30/03/2010	04
TEBESSA	KOUIF	20/03/2010	22
Nombre de prélèvements			50

Notre travail a été réalisé, dans sa totalité, au laboratoire central de la wilaya de SKIKDA.

Le lait est prélevé aseptiquement à partir d'un pis propre : nettoyé à l'eau savonneuse, rincé à l'eau stérile. Les premiers jets de laits sont rejetés, car ils sont généralement plus contaminés par les microorganismes.

Le lait est récolté dans des flacons de 250 ml préalablement stérilisés et étiquetés. Il est ensuite transporté dans une glacière et conservé à 4°C au réfrigérateur du laboratoire. (Norme ISO 7218 : des indications précises de transport des échantillons et les températures requises).

La durée de transport de nos échantillons n'a pas dépassé les deux heures entre les prélèvements et les analyses effectuées.

2. Méthodes d'analyses

2.1-Analyses microbiologiques

Notre objet, après avoir acheminé tous les prélèvements au laboratoire, est d'effectuer un ensemble d'analyses microbiologiques visant :

- Un dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM).
- Isolement et identification présomptive des bactéries.
- Enrichissement des échantillons dans un milieu approprié pour la recherche de *Listeria spp.*

a) Dénombrement de la FTAM

Le dénombrement de la FTAM est réalisé sur gélose standard pour numération PCA (plate count agar) par ensemencement dans la masse de 1ml des dilutions de 10^{-2} à 10^{-4} . Les dilutions sont faites par l'eau physiologique.

Les boîtes ensemencées sont incubées couvercles en bas à 30°C pendant 72h avec :

- Première lecture à 24h.
- Deuxième lecture à 48h.
- Troisième lecture à 72h.

Le comptage des colonies ayant poussé sur les boîtes a été effectué en tenant compte des facteurs suivants :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies.
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de dilutions.
- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les mêmes dilutions.

Sur la base de l'aspect macroscopique, les colonies bactériennes ont été prélevées à partir de dilutions et repiquées sur la gélose TSA (tripticase soja agar) (cette gélose permet la croissance abondante de la plupart des bactéries aérobie et anaérobie, sans adjonction de substances nutritives) et sont placées à l'étuve à 30°C pendant 48h.

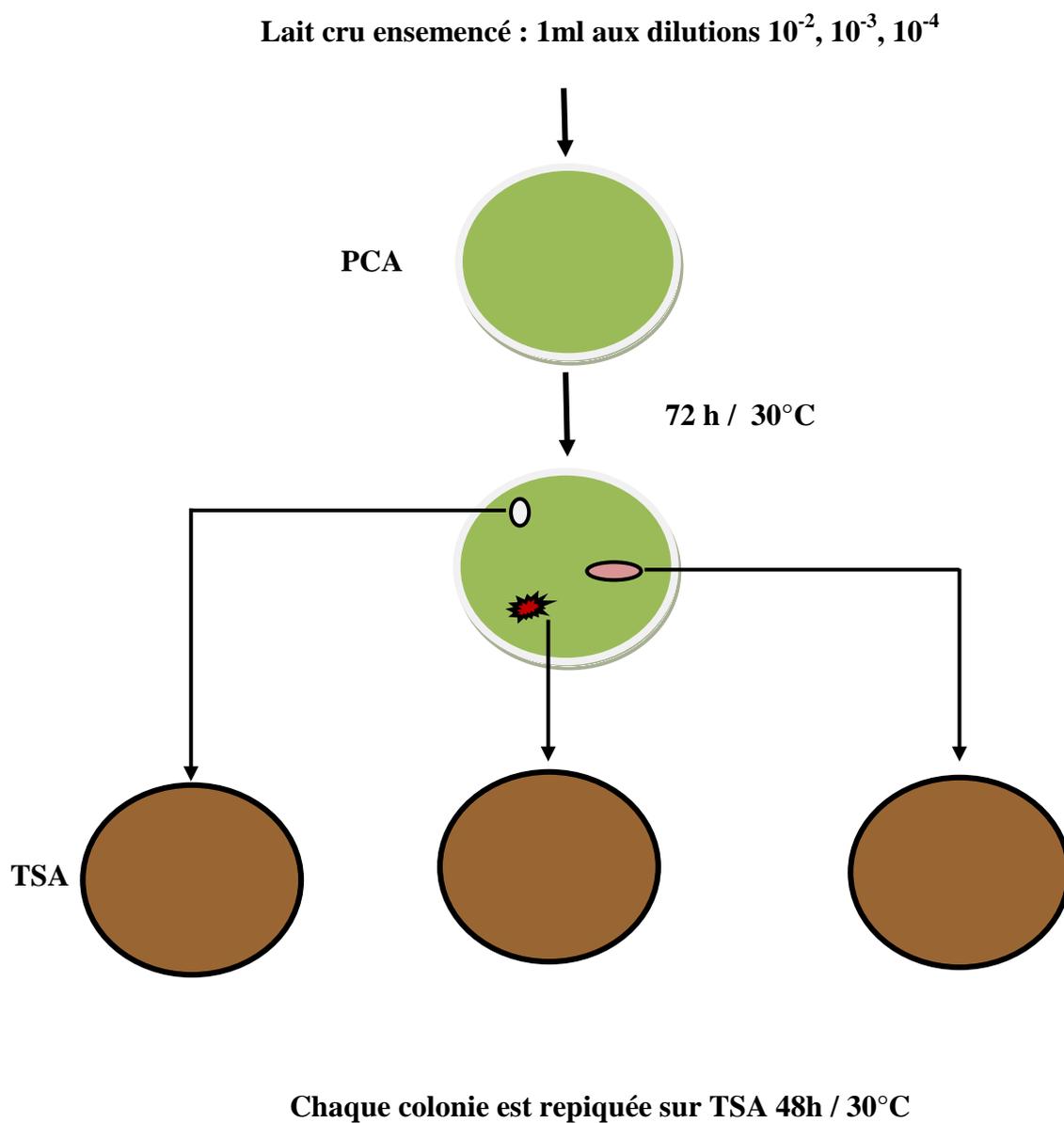


Figure 4 : Etapes pour l'isolement des colonies de la FTAM

La pureté des souches s'est effectuée sur trois jours successifs en phase alternative entre milieu solide et milieu liquide. L'ensemencement a été réalisé par la méthode de stries d'épuisement; dont les trois repiquages successifs assurent la pureté des souches (*Guy leryral et al., 2007*) sur lesquelles les tests d'identifications seront réalisés (Norme de techniques de base pour avoir une culture pure (*ISO : 7218*)).

b) Isolement et identification présomptive des bactéries

Basée sur plusieurs tests concernant leurs caractères morpho-physio- biochimiques. (tableau 6).

1. Tests Préliminaires: se basent sur l'observation macroscopique et microscopique dont le but est d'étudier les caractères morphologiques.

- L'Aspect Macroscopique : se basent sur les caractères des colonies : forme, surface, contour, élévation, consistance, opacité, taille et pigmentation.
- L'Aspect Microscopique : un examen à l'état frais a été fait pour examiner la mobilité, la forme des bactéries, l'arrangement des cellules suivi d'une coloration de Gram.
- Recherche de : la Catalase, l'Oxydase et l'ONPG.

2. Tests d'Identifications :

- Caractères Physiologiques : pour la détermination du caractère thermophile; des tests de croissance des souches pures à 10°C et à 42°C pendant 24 à 48 h ont été réalisés.
- Caractères Biochimiques : les bactéries ont été identifiées de manière présomptive au niveau de l'espèce à l'aide de galeries biochimiques API 20 ainsi que les galeries classiques selon la disponibilité, une comparaison des résultats obtenus avec les données de la littérature a été faite pour classer les différents taxons.

i) Métabolisme des Hydrates de Carbone

cette étude est réalisée sur un milieu semi solide M.E.VA.G (milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides) en utilisant les différentes sources de carbones testées à savoir : D- mannitol, D-glucose, mannose, inositol, sorbose, rhamnose, saccharose, melibiose, amylose, arabinose, D-ribose, D-xylose et le lactose.

Après chauffage du milieu au bain-marie, l'ajout des substrats carbonés a été réalisé avec une concentration de 1 %, puis, le milieu solidifié au réfrigérateur, puis ensemencé par pique centrale et incubé trois à sept jours à 30°C. Le virage de couleur des tubes positifs se fait du rouge au jaune.

ii) L'Utilisation du citrate comme une seule source de carbone

La pente du milieu (Citrate de Simmons) est ensemencée avec une strie sur toute la surface et l'incubation s'effectue à 37°C, pendant plusieurs jours.

Les autres tests biochimiques effectués sont mentionnés dans l'annexe.

3. Conservation des isolats

La conservation des souches pures est effectuée sur milieu solide incliné et dans des géloses de conservations de l'IPA (Institut Pasteur d'Alger). Après croissance, les cultures sont maintenues à 4°C dans un réfrigérateur et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines sur milieu Muller Hinton.

4. Codification des résultats

Une fois tous les tests réalisés, un codage numérique a été attribué à chaque caractère :

- Le code **1** pour un résultat positif.
- Le code **0** pour un résultat négatif.

5. Codification des Souches

Les souches isolées ont été codées en utilisant une lettre qui désigne la wilaya de prélèvements: (**S**) pour SKIKDA et (**T**) pour TEBESSA, et un chiffre qui désigne le numéro de l'échantillon (numéro d'ordre de la souche).

Tableau 6: Les tests d'identification présomptive des souches isolées.

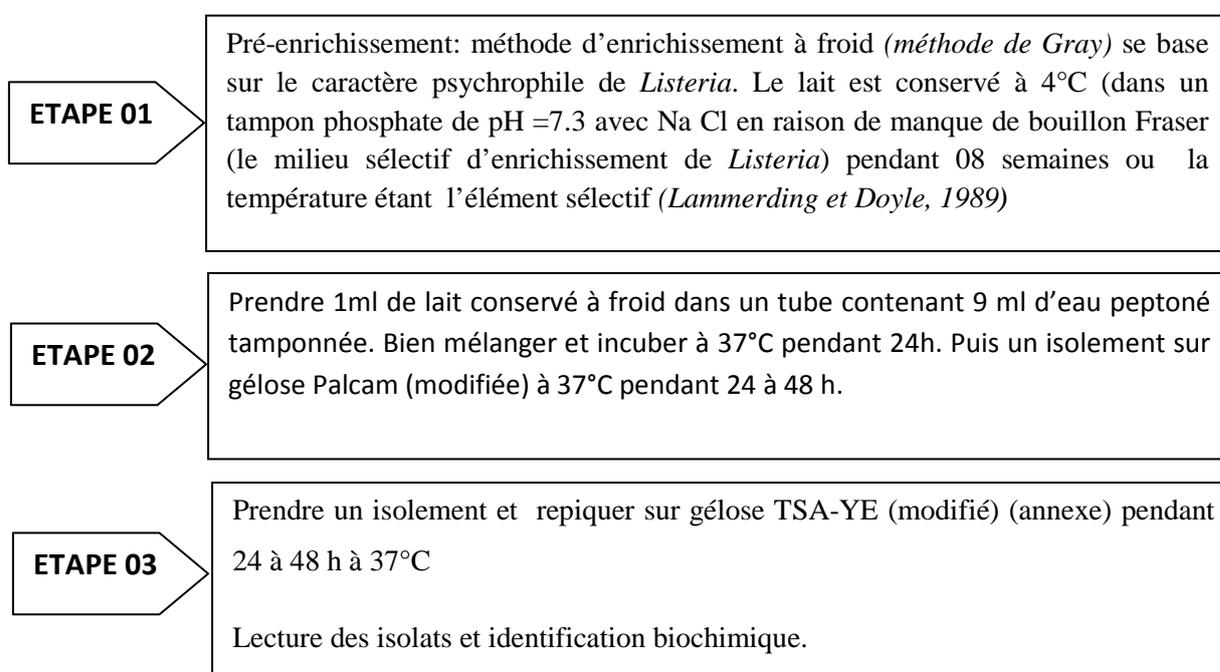
Caractères morphologiques		Caractères biochimiques		Caractères physiologiques	
macroscopiques	microscopiques	Capacité de métaboliser une molécule	Substrats carbonés	température	Présence d'enzymes
surface	forme	recherche de l'Uréase	citrate	10°C	Oxydase
contour	coloration de Gram	production d'indole	mannitol		
		réduction des nitrates	inositol		
		production d'acétoïne	sorbose		
élévation	mobilité	réaction du rouge de méthyle	rhamnose	37°C	O.N.P.G*
		production d'H ₂ S	saccharose		
consistance	présence d'endospores	hydrolyse de la gélatine	melibiose	42°C	Catalase
		hydrolyse de l'esculine	amylose		
			arabinose		
opacité	arrangements des cellules	ODC ¹	ribose		
		LDC ¹	xylose		
		ADH ¹	lactose		
taille		TDA ¹	Glucose ²		
pigmentation					

(1) : Voir listes des abréviations.

(2) : pour tester le dégagement de gaz.

- c) Enrichissement des échantillons dans un milieu approprié pour la recherche de *Listeria spp.* : méthode AFNOR : V08.055

La recherche de *Listeria spp.* s'est faite en trois étapes, selon le logigramme suivant :



Logigramme 2 : Les étapes de recherche de *Listeria spp.*

Lecture : observation des colonies verdâtres luisantes entourées d'un halo noir (hydrolyse de l'esculine) incrustées dans la gélose (dépression centrale) caractéristiques des colonies de *Listeria spp.* sur gélose Palcam (figure 5) puis effectuer les tests suivants :

- Identification du genre *Listeria* : coloration de Gram et recherche de la catalase.
 - Identification des espèces du genre *Listeria*
 - Mobilité : Observation à l'état frais entre lame et lamelle de petits bacilles à ciliatures péritriches ou encore sur gélose mannitol-mobilité en culture à 25°C pendant 24 à 48 h.
 - Test d'Hémolyse : utilisant deux méthodes
1. Sur Gélose au Sang de Mouton : après avoir isolé une colonie de gélose TSA-YE, puis incubé à 37°C pendant 24h, l'hémolyse obtenue traduit par une formation d'une zone claire autour des colonies.

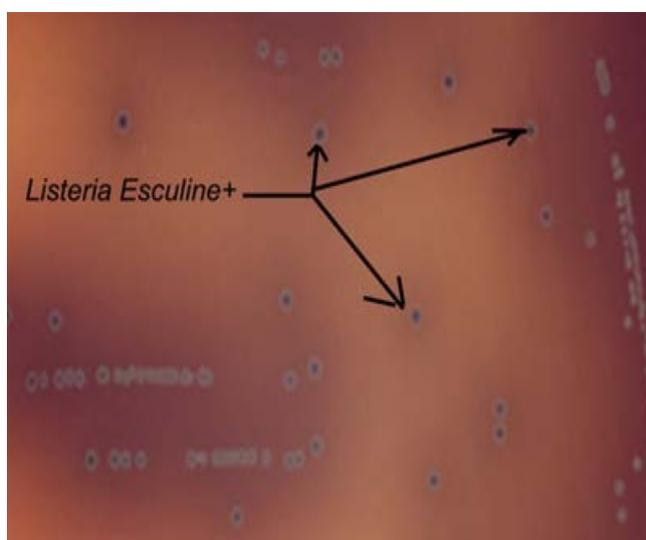


Figure 5: Aspect des colonies de *Listeria spp.* sur gélose Palcam

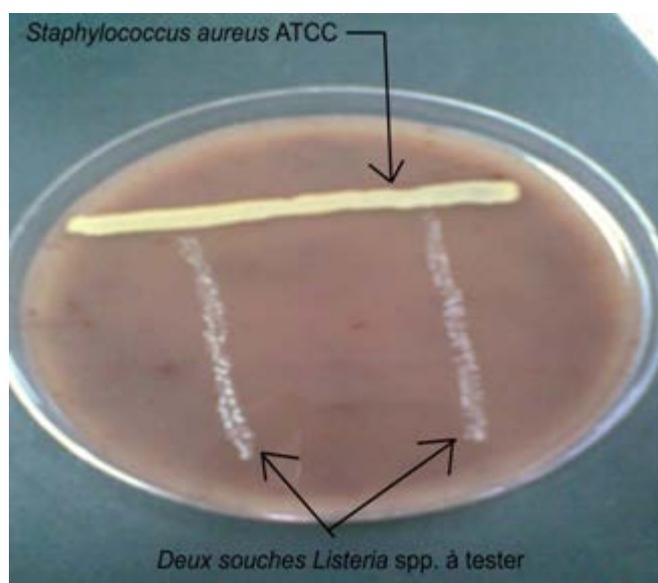


Figure 6 : Test CAMP

2. Test CAMP (Christie, Atkins et Munch-Petersen): ce test est réalisé avec une seule souche disponible référencée : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Ce test met en évidence la différenciation entre une souche hémolytique et une autre non hémolytique. Le CAMP test est réalisé sur gélose TSA (tripticase soja agar) additionné de 5% de sang de cheval, dans une boîte de pétri avec une première strie de la souche *Staphylococcus aureus* puis deux stries de la souche à tester perpendiculairement par rapport au première strie en se méfiant que les stries ne se touchent pas et restent à une distance au minimum de 2mm. Puis incubé pendant 24 à 48h à 37°C.

Une observation d'accentuation de l'hémolyse autour de la zone adjacente perpendiculairement à la strie de *Staphylococcus* sous forme d'une pelle confirme l'espèce de *L. monocytogenes* (figure 6).

- Identification Biochimique

En utilisant l'API-20, sur le plan biochimique *Listeria* est :

- aérobie-anaérobie facultative.
- Catalase (+), Oxydase (-), H₂S (-), Gaz (-)
- Esculine(+), urée-indole (-), TDA (-), VP (+), RM (+) (*Hitchins, 1995*).

La position phylogénétique de *Listeria spp.* avec le reste de la flore bactérienne isolée de laits crus a été effectuée par le logiciel MEGA 4.0 en utilisant les deux méthodes de construction à savoir UPGMA et NJ.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

1. RESULTATS

1.1 FTAM: Les colonies se présentent sous forme lenticulaire en masse. Nous avons sélectionné les boîtes où le nombre de colonies (n) varie entre 30 et 300. Le dénombrement a concerné les dilutions de 10^{-2} à 10^{-4} . Les calculs ont été faits selon la loi ; $N = nd$ où d : le facteur de dilution et N: le nombre de bactéries en UFC/ml. Les résultats des dénombrements sont mentionnés dans les tableaux 7 et 8 :

Tableau 7: Dénombrement de FTAM en UFC /ml dans la wilaya de TEBESSA

Code de l'échantillon	(UFC/ml)* 10^3	Observation
T 1	05	La valeur minimale
T 2	24	
T 3	64	
T 4	18	
T 5	32	
T 6	13	
T 7	09	
T 8	15	
T 9	39	
T10	33	
T11	09	
T 12	35	
T 13	10	
T 14	11	
T 15	236	La valeur maximale
T 16	12	
T 17	10	
T 18	46	
T 19	38	
T 20	10	
T 21	19	
T 22	30	

Tableau 8: Dénombrement de FTAM en UFC /ml dans la wilaya de SKIKDA

Code de l'échantillon	(UFC/ml)*10 ³	Observation
S 1	18	
S 2	06	La valeur minimale
S 3	18	
S 4	59	
S 5	34	
S 6	19	
S 7	31	
S 8	16	
S 9	58	
S 10	22	
S 11	36	
S 12	35	
S 13	142	
S 14	200	
S 15	241	
S 16	43	
S 17	257	La valeur maximale
S 18	120	
S 19	150	
S 20	102	
S 21	88	
S 22	62	
S 23	12	
S 24	103	
S 25	94	
S 26	96	
S 27	150	
S 28	112	

1.2 Identification des bactéries

Les résultats morpho-physio- biochimiques obtenus sont représentés dans une matrice binaire (Annexe 2) qui a concerné tous les échantillons récoltés dans les deux régions.

Les observations des examens macroscopiques et microscopiques des 50 échantillons sont mentionnées dans une matrice dans l'annexe.

L'identification présomptive des bactéries a été effectuée en comparant nos résultats avec ceux relevés sur des références de systématiques bactériennes (Bergey's, 1994 ; Joffin J.N, 1998).

La FTAM (42 souches) est composée de 59% de bactérie à Gram positif et de 41 % de bactéries à Gram négatif.

- La flore Gram positif renferme les *Bacillaceae* et les *Micrococcaceae* ainsi que des souches d'origine fécale ou pathogène appartenant aux genres *Staphylococcus* et *Streptococcus*.
- L'identification de la flore Gram négatif souligne une concentration importante en *Enterobactériaceae* dont le pourcentage de 27.8 % par rapport au 42 souches isolées et particulièrement la présence de *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*.
- Une présence majoritaire de bacilles par rapport aux cocci a été notée (74% et 26% respectivement).
- Tous les résultats sont mentionnés dans les deux tableaux suivants (tableaux 9 et 10):

Tableau 9: Identification présumptive des souches isolées de la région de SKIKDA

N°	Code des souches	Espèces bactériennes présumptives
1	S 1	<i>Staphylococcus epidermis</i>
2	S 2	<i>Bacillus cereus 01</i>
3	S 3	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
4	S 4	<i>Neisseria meningitidis</i>
5	S 5	<i>Campylobacter fetus</i>
6	S 6	<i>Bacillus cereus 01</i>
7	S 7	<i>Bacillus capsulé</i>
8	S 8	<i>Serratia biogroupe 1</i>
9	S 9	<i>Serratia polymuthica</i>
10	S 10	<i>Enterobacter intermedius</i>
11	S 11	<i>Salmonella ser pollurum</i>
12	S 12	<i>Staphylococcus capitis</i>
13	S 13	<i>Bacillus cereus 01</i>
14	S 14	<i>Chromobacterium violaceum</i>
15	S 15	<i>Listeria murrayi</i>
16	S 16	<i>Bacillus pasteurii</i>
17	S 17	<i>Citrobacter freundii</i>
18	S 18	<i>Bacillus pasteurii</i>
19	S 19	<i>Escherichia coli 2</i>
20	S 20	<i>Aerococcus viridans 2</i>
21	S 21	<i>Streptococcus adjacen</i>
22	S 22	<i>Escherichia coli 2</i>
23	S 23	<i>Bacillus megatherium</i>
24	S 24	<i>Citrobacter freundii</i>
25	S 25	<i>Bacillus sphaericus</i>
26	S 26	<i>Bacillus cereus 01</i>
27	S 27	<i>Bacillus cereus 02</i>
28	S 28	<i>Corynebacterium bovis</i>
29	S 29	<i>Staphylococcus aureus</i>
30	S 30	<i>Micrococcus lylae</i>

Tableau 10: Identification présomptive des souches isolées de la région de TEBESSA.

N°	Code des souches	Espèces bactériennes présomptives
1	T 1	<i>Proteus mirabilis</i>
2	T 2	<i>Neisseria meningitidis</i>
3	T 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4	T 4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
5	T 5	<i>Serratia marcescens</i>
6	T 6	<i>Campylobacter fetus</i>
7	T 7	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
8	T 8	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
9	T 9	<i>Klebsiella oxytoca</i>
10	T10	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
11	T11	<i>Salmonella ser.paratyphi</i>
12	T 12	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
13	T 13	<i>Bacillus sphaericus</i>
14	T 14	<i>Salmonella ser pollurum</i>
15	T 15	<i>Bacillus pasteurii</i>
16	T 16	<i>Brevibacillus brevis</i>
17	T 17	<i>Lactobacillus fermenticus</i>
18	T 18	<i>Listeria cf. monocytogenes</i>
19	T 19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
20	T 20	<i>Enterococcus faecium</i>
21	T 21	<i>Bacillus brevis</i>
22	T 22	<i>Listeria murrayi</i>
23	T23	<i>Edwardsiella tarda</i>
24	T24	<i>Bacillus circulans</i>
25	T25	<i>Serratia liquefaciens</i>
26	T26	<i>Aeromonas hydrophila G2</i>
27	T 27	<i>Enterobacter intermedius</i>

En éliminant les individus répétés (ayant les mêmes états de caractères), les isolats (au nombre de 42) identifiés sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 11: Répartition des souches isolées selon le Gram.

Gram	Familles ou Genres	Genre et espèces	%
BACTERIES A GRAM NEGATIF	<i>Entérobactéries</i>	<i>Proteus, Serratia, Klebsiella, Salmonella, Edwardsiella, Enterobacter, Escherichia, Citrobacter.</i>	27.8%
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.4%
	<i>Chromobacterium et Neisseria</i>	<i>C.violaceum, N.meningitidis</i>	4.8%
	<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter fetus</i>	2.4%
	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.4%
BACTERIES A GRAM POSITIF	<i>Staphylococcus et Micrococcus</i>	<i>S.epidermis, S.aureus, S.capitis, M.lylae.</i>	9%
	<i>Bactéries lactiques</i>	<i>Leuconostoc, Lactococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus, Aerococcus</i>	19%
	<i>Bacillus</i>	<i>B.sphaericus, B. brevis, B. circulans, B. pasteurii, B. cereus, B. megatherium</i>	19%
	<i>Corynebacterium</i>	<i>C. jeikeium, C.bovis</i>	4.8%
	<i>Brevibacterium</i>	<i>B. brevis</i>	2.4%
	<i>Listeria</i>	<i>L. murrayi, L. cf. monocytogenes</i>	6%

1.3 Isolement de *Listeria spp.*

1.3.1 Aspect des colonies sur les différents milieux

- Gélose Palcam : les colonies de *Listeria* sont de couleur vert marron foncé, leurs centres apparaissent enfoncés dans la gélose et elles sont entourées d'un halo noir (hydrolyse de l'esculine) (figure 5).
- Gélose au sang frais: les colonies sont entourées d'une zone claire étroite due à l'hémolyse des hématies (figure 7).
- Gélose TSA-YE : les colonies obtenues sont de petite taille de 1 à 2 mm, translucides et à bord irrégulier. L'examen montre des colonies bleutées et granuleuses (figure 8).



Figure7: Aspect des colonies de *L.cf monocytogenes* sur gélose au sang frais.



Figure 8 : Aspect des colonies de *Listeria spp.* sur gélose TSA

1.3.2 Aspect Microscopique : La coloration de Gram a révélé des petits bacilles, courts, réguliers, à Gram positif, aux extrémités arrondies, certaines cellules pouvant toutefois être incurvées. Elles se présentent de manière isolées ou groupées en V ou en L, en palissades ou en courtes chaînettes.

1.4 Analyse Phylogénétique

1.4.1 Calcul du Coefficient de Jaccard (I_S) : Indice non symétrique, quantifie la similitude pour chaque couple bactérien selon l'équation suivante :

$$I_S = \frac{(1,1)}{(1,1)+(1,0)+(0,1)}$$

(1,1) = les deux états sont présents dans les deux bactéries.

(1,0) = l'état est présent dans la première bactérie et absent dans la deuxième.

(0,1) = l'état est absent dans la première bactérie et présent dans la deuxième.

Cet indice permet de calculer la matrice de similitude. Une fois calculée, cette matrice servira pour le calcul de la matrice des distances selon l'équation :

$$d = 1 - I_S$$

Tableau12 : Matrice de distances des souches à Gram positif

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
[1] <i>B. cereus1</i>																									
[2] <i>E. faecium</i>	82.80																								
[3] <i>M. lylae</i>	62.50	66.67																							
[4] <i>L. murrayi</i>	53.60	76.93	61.54																						
[5] <i>L. lactis cremoris</i>	50.00	31.82	58.34	61.54																					
[6] <i>B. capsule</i>	65.60	56.00	54.55	81.48	68.00																				
[7] <i>Listeria spp</i>	62.07	74.10	57.69	45.84	72.00	60.00																			
[8] <i>Brevi. Brevis</i>	47.40	44.50	56.00	50.00	51.90	64.00	77.78																		
[9] <i>L. fermenticus</i>	72.50	53.57	54.55	40.00	65.52	63.64	70.84	77.80																	
[10] <i>S. capitis</i>	47.83	58.62	72.42	57.69	50.00	70.37	60.87	76.47	78.95																
[11] <i>L. mesenteroides</i>	56.00	67.86	69.23	74.08	75.00	66.67	52.38	77.78	77.78	61.29															
[12] <i>L. lactis lactis</i>	64.00	50.00	69.60	60.87	26.09	69.57	54.55	85.72	78.95	67.74	52.00														
[13] <i>B. circulans</i>	57.20	58.62	69.00	62.50	55.60	52.38	58.34	64.29	86.37	60.00	61.55	58.62													
[14] <i>S. epidermis</i>	58.62	52.00	52.00	75.00	33.40	63.64	47.37	66.67	66.67	42.31	54.55	70.00	68.18												
[15] <i>Cory. Jeikeium</i>	48.15	52.40	61.54	59.30	51.86	59.09	71.50	71.50	68.75	64.52	62.97	64.00	69.57	56.00											
[16] <i>S. aureus</i>	67.86	60.80	62.50	56.00	67.86	62.50	87.00	86.40	16.67	42.86	64.00	73.08	60.87	54.55	65.39										
[17] <i>B. pasteurii</i>	62.50	52.00	48.00	67.86	60.00	72.50	74.40	77.27	69.00	70.00	60.87	62.50	71.43	66.67	50.00	51.61									
[18] <i>A. viridians</i>	74.20	45.84	23.81	62.50	61.54	66.67	80.95	81.82	64.80	55.60	62.50	70.84	65.00	66.67	57.15	65.72	56.67								
[19] <i>S. adjacent</i>	59.26	42.86	68.00	59.26	47.83	71.43	83.34	84.21	63.64	84.62	60.87	69.23	80.00	72.00	76.47	68.75	67.74	58.34							
[20] <i>B. megatherium</i>	51.86	65.52	68.97	57.69	61.54	70.37	81.82	82.61	44.83	85.19	62.50	68.00	81.25	68.97	77.78	56.25	40.74	64.52	75.00						
[21] <i>L. rhamnosus</i>	61.54	59.26	65.39	68.00	57.90	80.77	80.95	81.82	68.75	74.00	38.10	61.90	68.97	45.46	67.75	51.62	63.64	74.20	70.00	66.67					
[22] <i>B. cereus2</i>	36.00	75.00	62.50	68.97	65.40	56.00	76.47	77.78	48.39	57.70	63.64	82.76	47.37	60.87	60.87	64.52	57.15	66.67	76.00	76.19	68.18				
[23] <i>Cory. bovis</i>	68.20	65.52	68.20	65.39	45.46	65.39	81.82	82.61	50.00	57.69	59.09	59.09	60.00	62.50	47.37	48.39	63.40	72.30	80.77	71.43	58.83	66.67			
[24] <i>B. sphaericus</i>	67.90	60.00	67.90	68.00	69.23	65.22	78.95	80.00	53.57	56.00	76.47	61.91	43.50	66.67	67.90	53.34	80.77	72.00	76.19	80.96	68.42	75.00	72.23		
[25] <i>B. brevis</i>	61.54	71.50	71.43	52.18	63.64	71.43	84.21	84.21	51.62	72.00	77.78	75.00	54.17	68.00	53.80	80.00	81.50	65.22	76.00	65.00	63.64	47.06	63.16	66.67	

35

Tableau13 : Matrice de distances des souches à Gram négatif.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
[1] <i>P. mirabilis</i>																	
[2] <i>N. meningitidis</i>	66.70																
[3] <i>P. aeruginosa</i>	67.90	58.40															
[4] <i>C. fetus</i>	35.00	60.00	56.70														
[5] <i>S. marcescens</i>	61.80	54.90	52.70	53.00													
[6] <i>K. oxytoca</i>	61.30	84.00	53.90	59.40	51.60												
[7] <i>S. ser parathyphi</i>	48.30	63.00	69.30	51.70	73.10	69.60											
[8] <i>E. coli2</i>	77.00	57.60	57.20	30.40	56.70	60.80	45.50										
[9] <i>S. liquefaciens</i>	71.50	51.80	53.20	63.40	46.20	57.70	70.40	61.60									
[10] <i>E. tarda</i>	57.90	48.30	65.70	53.00	46.90	54.90	59.40	62.50	66.70								
[11] <i>A. hydrophila G2</i>	60.80	41.20	60.00	57.60	60.80	64.00	38.50	52.20	64.80	50.00							
[12] <i>S. biogroupe1</i>	71.90	70.00	25.90	40.00	45.20	59.40	40.70	66.70	60.80	68.00	48.50						
[13] <i>S. polymuthica</i>	72.50	54.60	65.60	56.70	45.50	53.20	62.10	68.20	54.20	64.60	46.50	57.20					
[14] <i>E. intermedius</i>	69.00	39.30	50.00	19.40	57.70	33.40	54.30	77.50	53.60	60.80	39.20	60.90	62.50				
[15] <i>C. violaceum</i>	50.00	56.00	59.40	51.80	64.00	62.50	42.20	70.40	71.90	54.60	59.40	64.60	53.60	70.60			
[16] <i>C. freundi</i>	73.10	66.70	41.20	55.60	60.00	46.20	41.40	67.70	58.40	72.50	59.30	65.00	65.30	63.00	50.00		
[17] <i>S. ser pullorum</i>	69.00	65.30	51.80	59.30	53.40	50.00	38.50	70.90	57.20	54.60	65.40	61.60	72.80	54.60	60.90	61.60	

1.4.2 Reconstruction des arbres phylogénétiques: les deux matrices de distances (Gram positif et Gram négatif) ont été traitées par le logiciel de construction des arbres phylogéniques MEGA 4.0. Les méthodes UPGMA et NJ utilisées ont donné les arbres suivants :

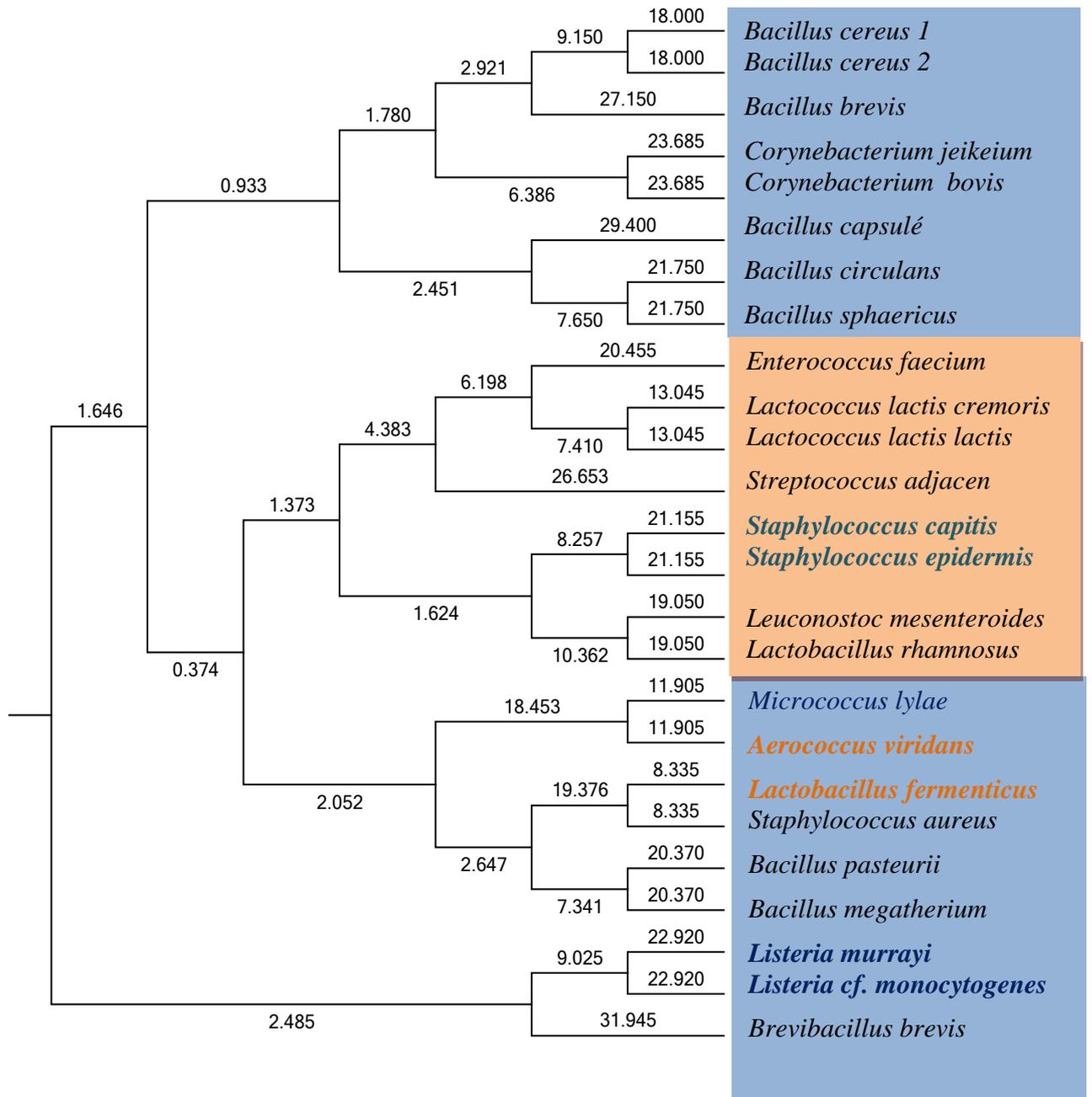


Figure 9: Arbre UPGMA des souches à Gram positif

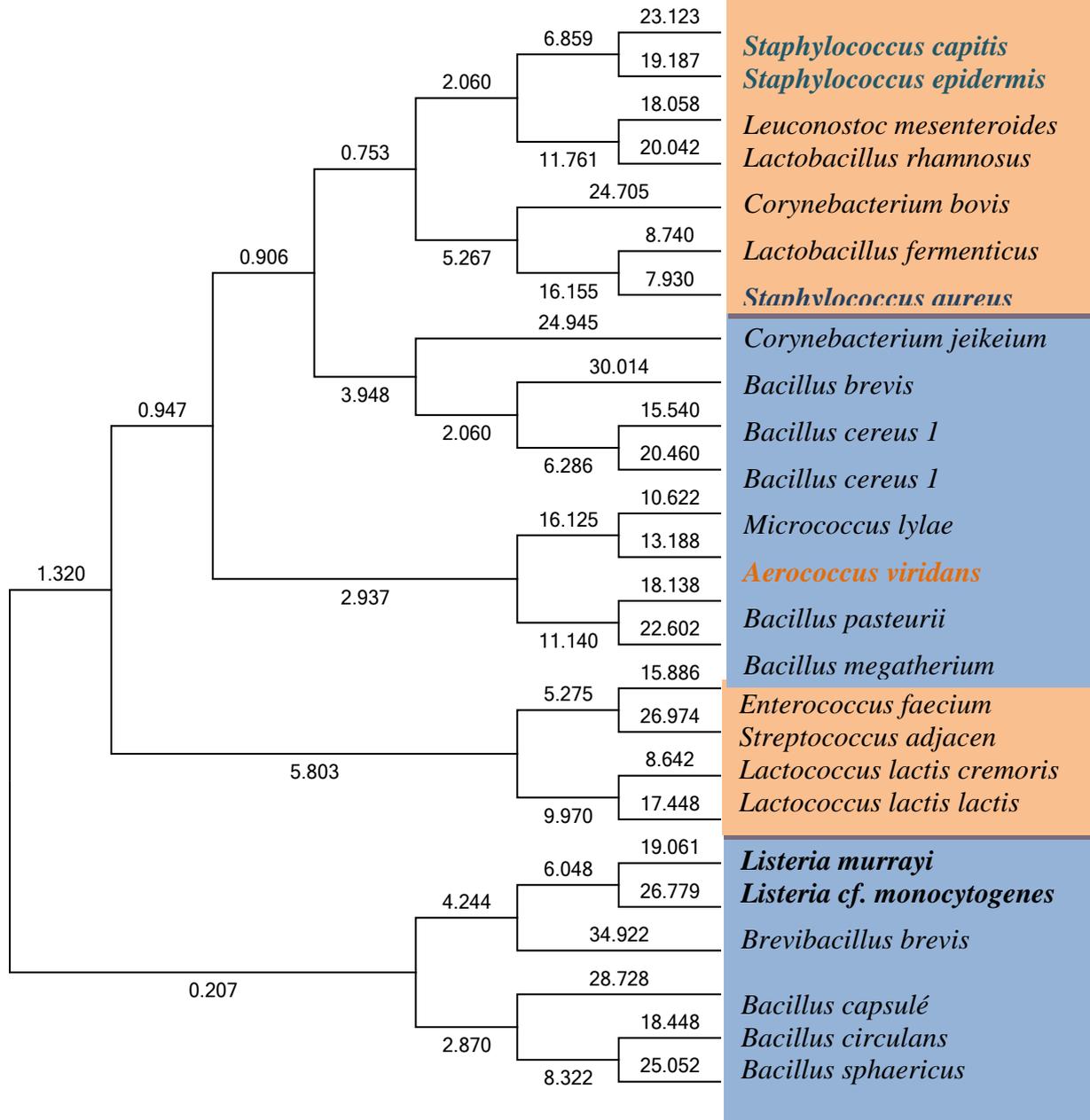


Figure 10: Arbre NJ des souches à Gram positif

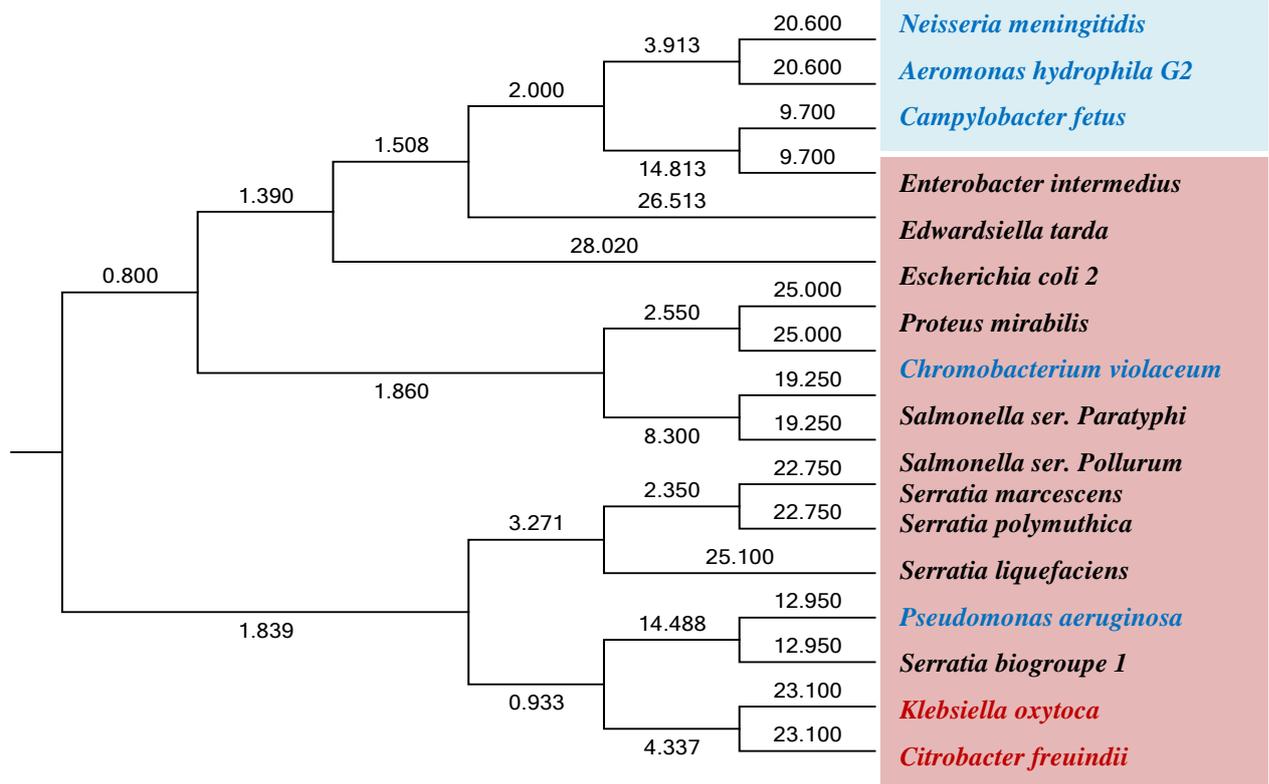


Figure 11 : Arbre UPGMA des souches à Gram négatif

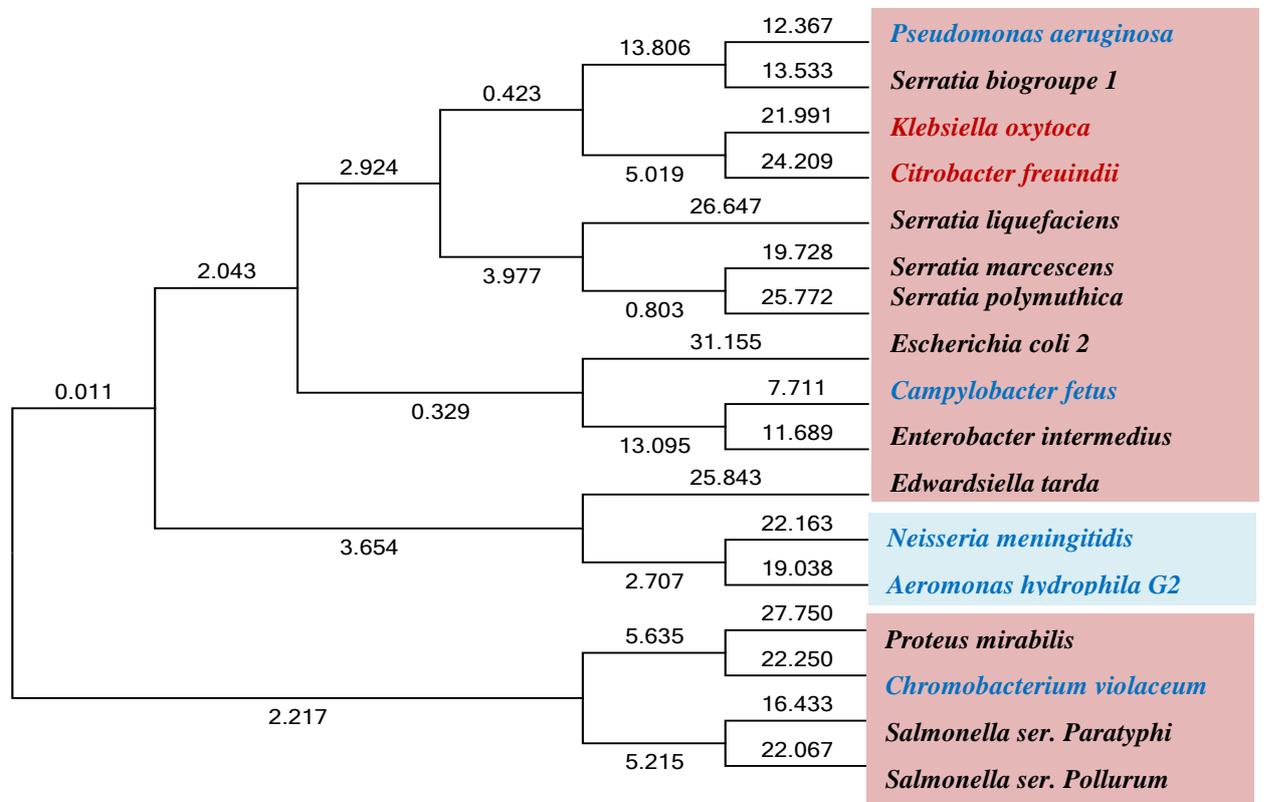


Figure 12 : Arbre NJ des souches à Gram négatif

1.4.4 Reconstruction par la Phylogénie Moléculaire

Les séquences de l'ARNr 16S des genres identifiés suites à une étude phénétique ont été récupérées à partir d'une banque de donnée moléculaire : GenBank. Les séquences partielles de l'ARNr 16S des genres ont été portées sur le tableau (Annexe).

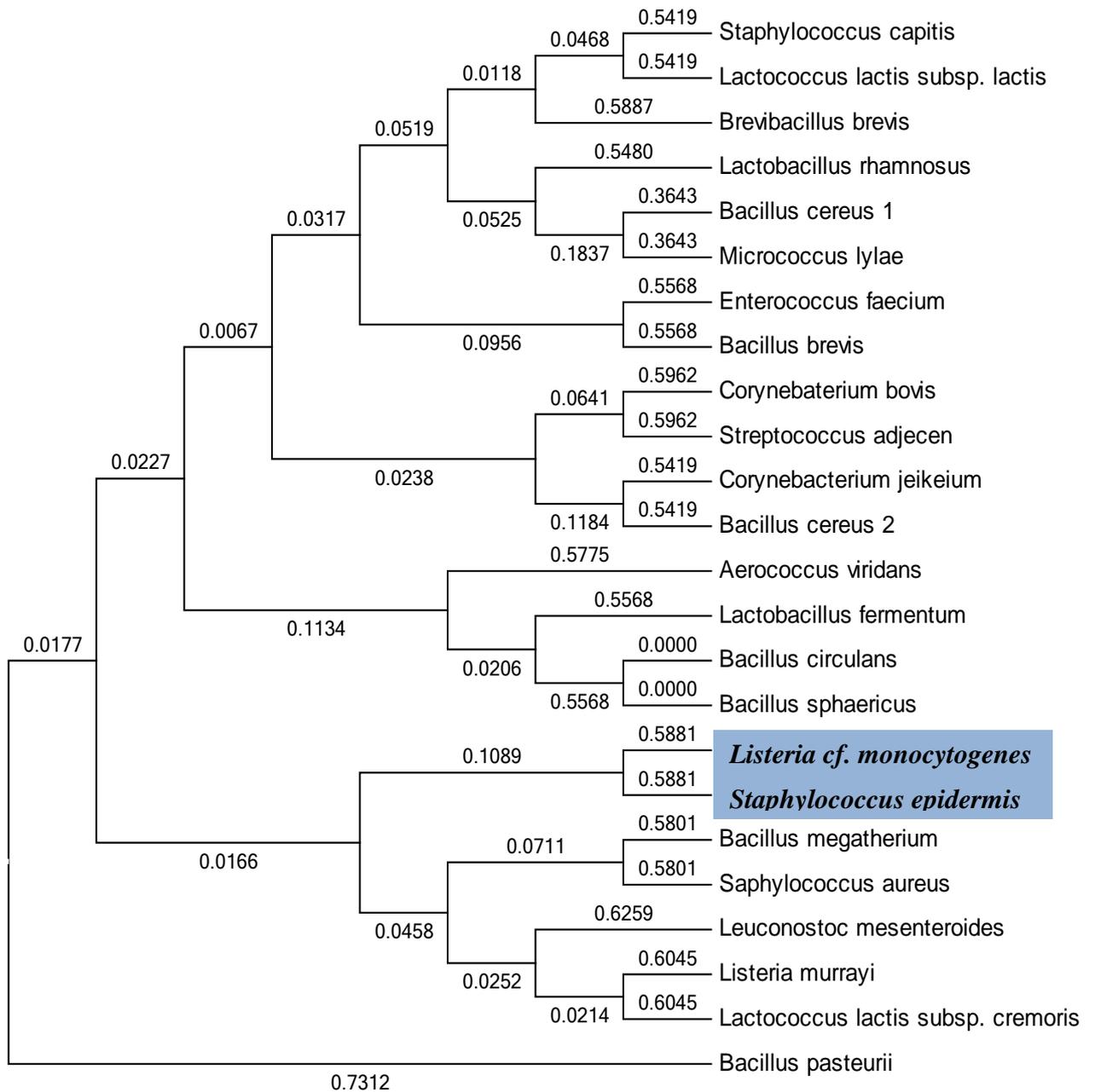


Figure13: Arbre UPGMA construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram positif

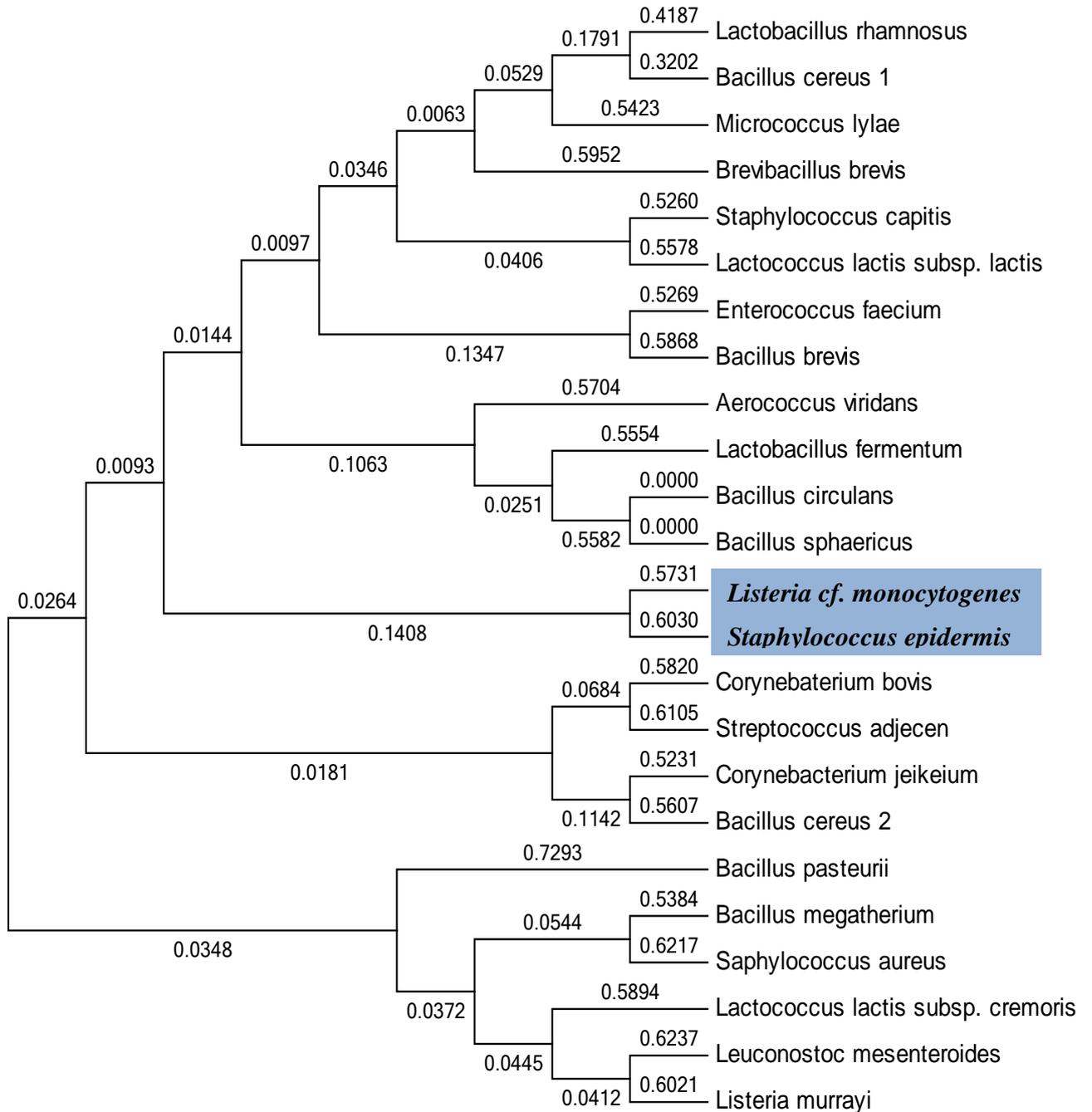


Figure 14: Arbre NJ construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram positif

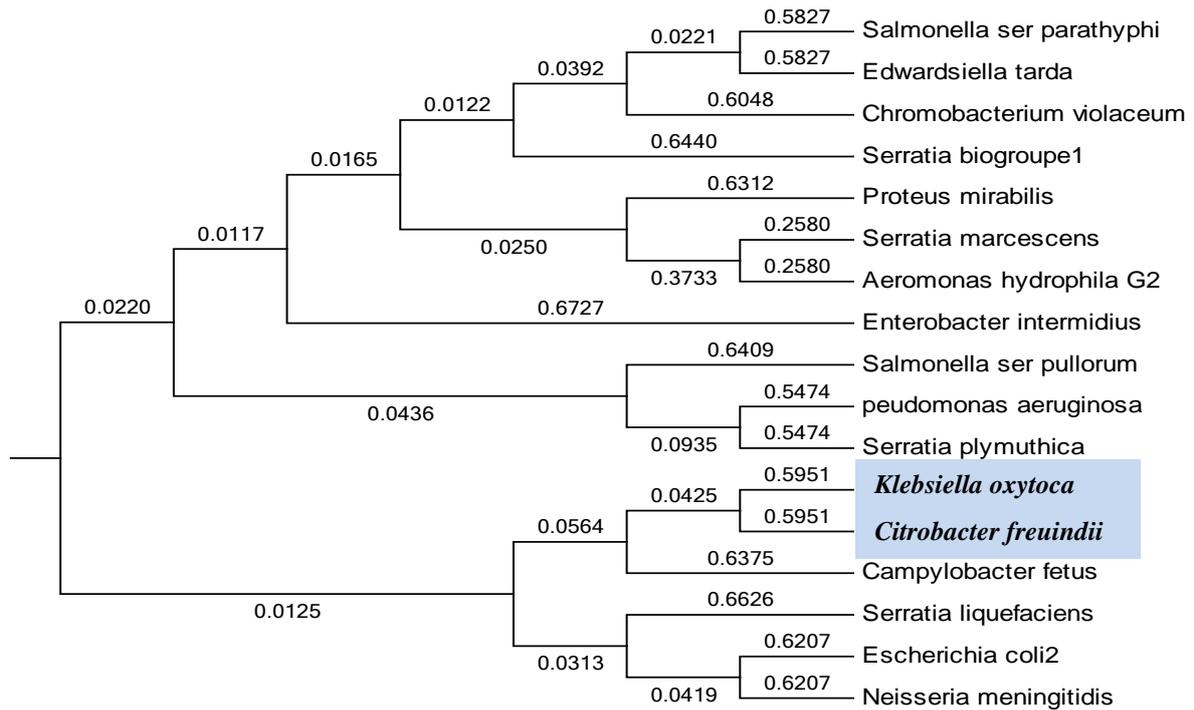


Figure 15: Arbre UPGMA construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram-

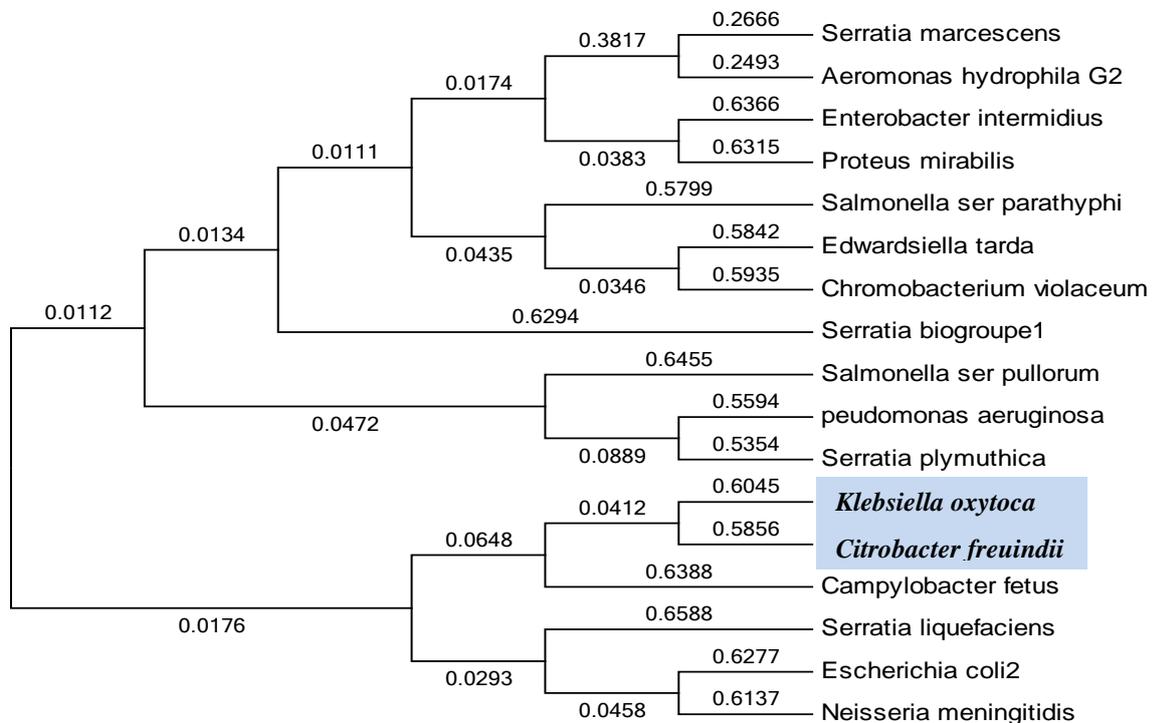


Figure 16: Arbre NJ construit à partir des séquences d'ARNr 16S des souches à Gram -

2. DISCUSSION

Les 42 souches isolées à partir des 50 échantillons de laits crus récoltés à partir des deux wilayas (Tébessa et Skikda) ont été identifiées sur la base de leurs caractères morpho-physio-biochimiques.

La présence de *Listeria cf. monocytogenes* a été réalisée selon trois procédés :

- Sur gélose PALCAM,
- Sur Gélose au sang,
- Sur gélose TSA-YE.

Enfin, une phylogénie numérique des isolats obtenus a été construite selon les deux algorithmes NJ et UPGMA.

2.1 Concernant les Résultats de Dénombrement

La FTAM nous renseigne sur la qualité hygiénique du lait cru. C'est la flore la plus recherchée dans les analyses microbiologiques.

L'ensemble des résultats obtenus rapportés dans les tableaux 7 et 8 montrent la présence de variations notables entre les différents échantillons de laits crus analysés.

Notons que les échantillons de la région de Tébessa se caractérisent par une FTAM plus réduite comparativement à Skikda (Tébessa = $3,3 \times 10^4$ UFC/mL et Skikda = $8,3 \times 10^4$ UFC/mL).

Les résultats de cette étude montrent la variabilité significative de la qualité du lait cru entre les deux régions. Cette différence de charge microbienne serait due :

1° à l'impact de l'effet climatique (situation géographique) ; dont le degré d'humidité favorise la prolifération et la multiplication bactérienne à Skikda qui est une région humide à l'opposé de Tébessa (figures 17 et 18) qui est une région semi aride, comme signalé par *Welshimer* (1960).

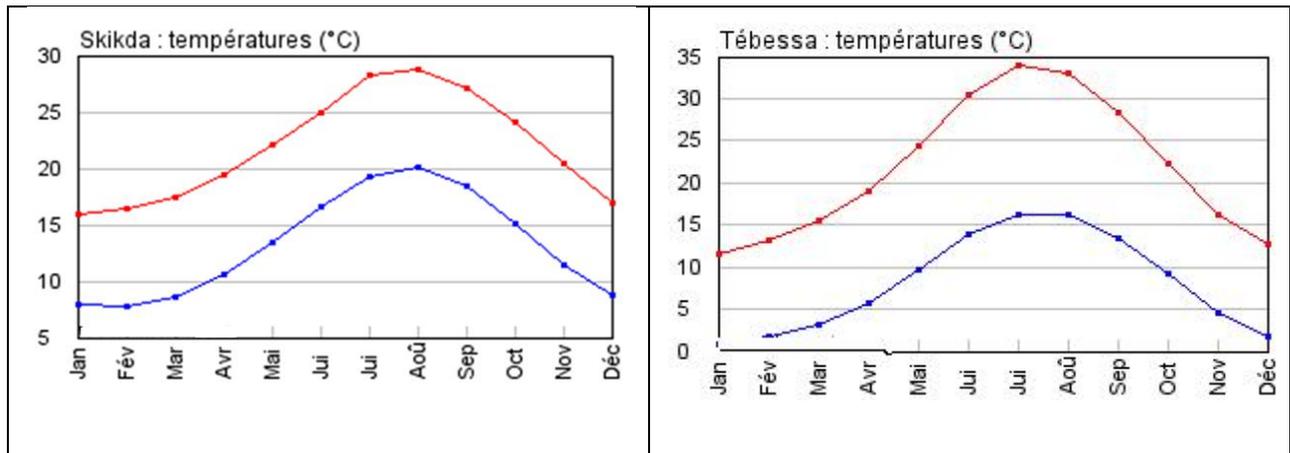


Figure 17: Moyenne mensuelle des températures minimales et maximales quotidiennes relevées sur Skikda et sur Tébessa.

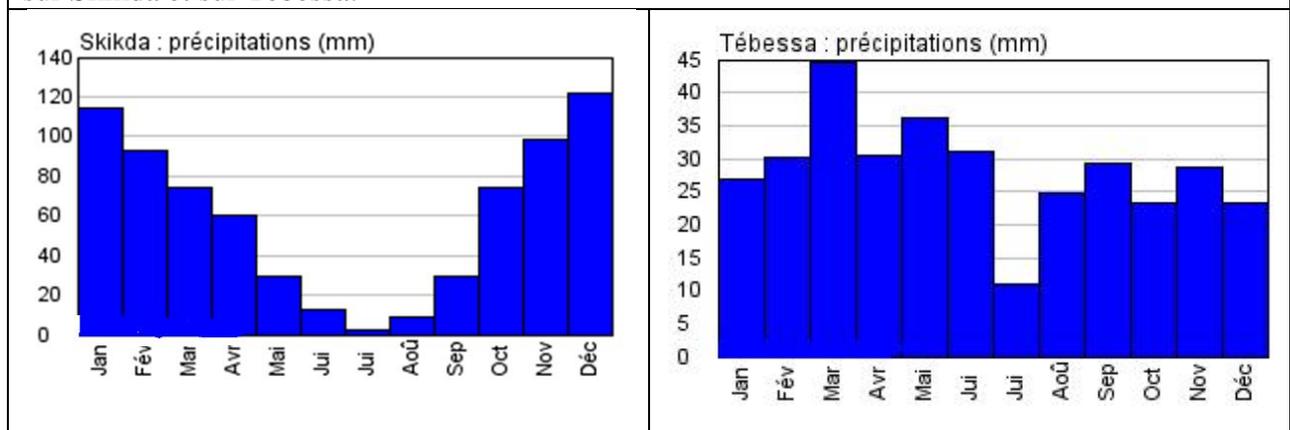


Figure 18 : Valeurs moyennes des précipitations (mm) relevées sur la wilaya de Skikda et la wilaya de Tébessa

2° à la pratique d'hygiène adoptée pour chaque région : Tébessa est moins chargée que Skikda. Ceci serait dû au respect des conditions hygiéniques pendant la traite et les bonnes conditions de transport. En effet, la ferme de Tébessa suit une méthode de traite mécanique et le lait obtenu est immédiatement réfrigéré après la traite dans une glacière isotherme munie d'un accumulateur de froid (chaîne de froid respectée).

3° à la variabilité de type d'alimentation de vaches laitières entre les deux régions : la qualité de l'ensilage qui joue un rôle primordial dans l'apparition de bactéries chez les animaux.

Les charges maximales tolérées par les deux réglementations (Normes Françaises ou Américaines d'évaluation de la qualité du lait cru) sont respectivement $5 \cdot 10^5$ UFC/ml et $5 \cdot 10^4$ UFC/ml (Alais, 1985), Les Normes Algériennes tolèrent jusqu'à 10^5 UFC/ml (JORADP n° 35/98)

Donc, par rapport à nos résultats, nous pouvons déduire que le lait prélevé a une bonne qualité hygiénique selon les Normes mentionnées ci-dessus. Cependant, *Richeter et al.*, (1992), notent que le lait cru récolté d'une vache saine doit contenir une charge microbienne inférieure à 1000 UFC /mL.

2.2 Concernant les tests d'identifications

L'identification présomptive des souches a été effectuée après avoir comparé les caractères étudiés de nos souches avec ceux des espèces de référence relevés sur le Bergey's (1986) et Joffin J. N. *et al.* (2001).

- Les 42 souches isolées et identifiées ont été classées en 11 groupes bactériens selon Madigan M. (2007). (Tableau 11). Une distribution hétérogène et une grande variabilité phénotypique ont été observées,
- La présence de *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Neisseria* et *Chromobacterium* est corroborée par les études de Little et de Louvois (1999).
- Le taux élevé des *Bactéries lactiques* et des *Bacillus* s'expliquerait par la relation qui existe entre ces bactéries et la composition du lait cru. (Sawaya *et al.*, 1984) car, la période de chaleur rend les conditions propices pour une augmentation d'acidité favorisant ainsi la prolifération des germes suscités, une hygiène insuffisante de l'opération de traite (mamelle non lavée) et les premiers jets non éliminés.

2.3 Concernant *Listeria*

Listeria spp. est présente dans trois échantillons sur 50 laits analysés ; soit un taux de 6% (Tableau 14). L'identification microbiologique a révélé la présence de *Listeria murrayi* avec des taux de 3,5% à Skikda et 4,5% à Tébessa.

Tableau 14 : Incidence de *Listeria spp.* dans le lait cru de fermes dans l'Est algérien (Tébessa et Skikda).

Wilaya	Nombre d'échantillons	Fréquence de <i>L. murrayi</i> (%)	Fréquence de <i>L. cf. monocytogenes</i> (%)	% et Incidence de <i>Listeria spp.</i>
TEBESSA	22	1/22 (4,5%)	1/22 (4,5%)	9% (2/22)
SKIKDA	28	1/28 (3,6%)	0/28 (0%)	3,6 % (1/28)
TEBESSA et SKIKDA	50	2/50 (4%)	1/50 (2%)	6% (3/50)

Le pourcentage de contamination de lait cru par *Listeria spp.* (6%) sur les deux wilayas est en accord avec les résultats publiés d'*Abou-Eleinin et al., 2000 ; Harvey et Gilmour, 1992 ; Jayaro et Henning, 2001* ; dont le pourcentage varie entre 0% et 22% selon leurs situations géographiques. Cependant, il reste relativement proche de celui noté par *Kozak et al., (1996)* (3 à 4%) ; mais éloigné des résultats de *Vitas et al., (2004)* (1%) (Espagne) ; de *FSAI, (2004)* (0,2%) (Irlande) ; de *Gilmour et Kells (2004)* (44,4%).

Ces différences seraient dues :

- aux variations des méthodes d'analyses,
- aux différences des milieux d'échantillonnages (géographie),
- le nombre d'échantillons (représentativité statistique),
- et aux méthodes d'identification génotypique (PCR et PFGE) employée par les auteurs suscités plus approfondies par rapport à l'identification classique utilisée durant ce travail (basée sur les seuls caractères morpho-physio-biochimiques).

L. monocytogenes, en Algérie, ressort dans les travaux de :

- Bellouni (1990) : 3,2 %,
- de Lebres (2000) : 1,9 %
- et de Mossadek *et al.* (2007) : 2,61 %.

Leurs résultats sont en accord avec les nôtres (2%).

L'identification biochimique adoptée durant notre travail au laboratoire a montré ses limites pour une confirmation définitive de la souche hémolytique obtenue de *Listeria spp.* suite à l'impossibilité de réaliser le test du caractère "DIM" (fondé sur l'hydrolyse d'un substrat naphthymide par une arylamidase) qui différencie l'espèce *monocytogenes* (enzyme absente) de l'*innocua*.

La rareté de la présence de *Listeria monocytogenes* dans nos échantillons (avec un pourcentage de 2% : une souche à TEBESSA et aucune à SKIKDA) peut être justifié par les conditions défavorables pour sa multiplication :

- Un ensilage acide bien conservé (*Bemrah et al., 1998*).
- Fluctuations saisonnières (*Fenlon et al., 1995*).
- Conditions climatiques (*Desmasures et al., 1997*).
- La composition et la concentration de la microflore autochtone présente dans le lait en grande teneur empêchent la prolifération de *Listeria spp.* par l'effet de compétition (*Jay, 1999 ; Carr et al., 2002 ; Augusto et al., 2009*)
- Conditions hygiéniques respectés pour certains prélèvements. (*Oteng-Cyang, 1984*).

Bien que la listériose soit rare en Algérie, non diagnostiquée et peu investiguée, les résultats obtenus montrent la présence de ce germe ubiquitaire, et confirment aussi sa rareté et le danger imposé pour la santé humaine et animale à la fois, surtout dans les circuits de vente de laits crus non contrôlés qui imposent un véritable risque sur la santé du consommateur et pour les immunodéprimés et les femmes enceintes.

En Algérie, les données épidémiologiques sur le profil de l'incidence de *Listeria spp.* sont rares (*Taha Mossadek, 2004*). Lors d'une investigation réalisée par nos soins à l'hôpital de Tébessa et à l'hôpital de Skikda, aucun cas de listériose n'a été détecté (LCR et pus) aux laboratoires de microbiologie. Ceci serait dû aux conditions particulières de croissance de *Listeria* et au manque des milieux sélectifs pour *Listeria* qui ne sont pas disponibles.

En fin, l'incidence de *Listeria spp.* isolée de laits crus est rare dans notre pays mais les conditions non respectées de :

- La durée de conservation des aliments (laits, viandes.....).
- L'intégrité de la chaîne de froid.
- L'hygiène et les méthodes de traites.
- Le transport jusqu'aux consommateurs.

augmentent le risque d'une épidémie même si elle reste rarement investiguée.

2.4 Concernant la Phylogénie

L'interaction phylogénétique de *listeria spp.* avec le reste de la fore bactérienne s'est basée sur :

- Les tests biochimiques dont la fermentation des différents sucres.
- Les caractères morphologiques.
- Les caractères physiologiques.

Le calcul du coefficient de Jaccard est basé sur 44 caractères utilisés dans cette étude qui restent insuffisants pour pouvoir aboutir à une identification précise de l'espèce, car le principe de base de la taxonomie numérique oblige la comparaison sur un plus grand nombre de caractères.

Concernant les bactéries à Gram positif (25 souches), la méthode UPGMA donne deux groupes distincts séparés par une distance de $2,485 + 1,646 = 4,131$. La liaison de *Brevibacterium brevis* avec les *Listeria* est acceptable du fait qu'ils appartiennent au même ordre des *Bacillales*.

- Groupe 1 = (*Brevibacillus brevis*, (*Listeria cf. monocytogenes*, *Listeria murrayi*))
- Groupe 2 = Reste des clades

Au sein du groupe 2, seuls *Lactobacillus fermenticus* et *Aerococcus viridans*, (Orde : Lactobacillales) sont mal placés ; ils font partie du même clade que *Micrococcus lylae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus megatherium* (Orde : Bacillales).

La construction phylogénétique par l'algorithme NJ a révélé deux principaux groupes à une distance de $0,207 + 1,320 = 1,527$:

- Groupe 1 = (((*Listeria murrayi*, *Listeria cf. monocytogenes*), *Brevibacillus brevis*), *Bacillus capsule*, (*Bacillus circulans*, *Bacillus sphaericus*)).
- Groupe 2 = Reste des clades

Notons que le groupe (*Bacillus capsule*, (*Bacillus circulans*, *Bacillus sphaericus*)) a conservé sa structure cladistique dans les deux arbres.

Les différences non significatives pourraient s'expliquer par le fait qu'à la base, la théorie de calcul des arbres est totalement différente pour les deux méthodes. En effet, UPGMA démarre du principe de regrouper dès le départ les deux premiers individus (bactéries) dont la distance est la plus petite, cependant la méthode NJ regroupe les deux individus ayant la plus faible divergence par rapport au total des individus.

Les 42 séquences de l'ADNr 16S, relevées sur GenBank qui représentent les mêmes espèces isolées ont permis de dresser des arbres phylogénétiques, pour une étude comparative.

Les arbres UPGMA et NJ regroupent *Staphylococcus* avec *Listeria cf. monocytogenes*. (Figure 13 et 14). Cependant, *Listeria* reste proche de *Brevibacterium* dans le cas d'UPGMA mais sont éloignés dans l'arbre NJ.

Il ressort que les interactions des *Listeria spp.* avec le reste de la flore bactérienne de lait cru est difficilement mesurable à cause du nombre de caractères (n=42) qui reste à notre avis inférieur voire insuffisant pour prononcer des conclusions relatives au comportement "social" des *Listeria spp.* par rapport au reste de la flore. Cependant, *Listeria spp.* sont restées apparentées à des Bacillales dans le cas des deux arbres et éloignées des Lactobacillales ; ce qui donne une certaine crédibilité systématique aux deux arbres.

De manière globale, les arbres construits à partir des bactéries à Gram négatif conservent la même topologie. En effet, les regroupements des bactéries *Neisseria meningitidis*, *Aeromonas hydrophila* G2, *Campylobacter fetus*, *Chromobacterium violaceum* et *Pseudomonas aeruginosa* sont restés conservés.

Pour le cas des entérobactéries, les regroupements ont également été conservés. Par exemple le clade formé par la paire *Klebsiella oxytoca* et *Citrobacter freundii* est resté lié dans les deux structures (UPGMA et NJ).

En fin, l'analyse phylogénétique représentée par les différents phénogrammes présente une diversité microbiologique et une interrelation entre *Listeria* et la flore bactérienne isolée de la même niche écologique et démontre, la grande complexité à trancher pour une phylogénie définitive.

La systématique diffère selon les variations des comportements des souches pour des raisons d'adaptation avec les contraintes de l'environnement et les conditions de vie qui fait maître à chaque fois des interrelations phylogénétiques différentes.

2.5 Concernant la qualité hygiénique du lait récolté

La plupart des germes identifiés durant ce travail sont saprophytes et/ou commensaux, en général ubiquistes et pathogènes occasionnels. Ils sont opportunistes dans des conditions bien particulières (Larpent, 2004).

La présence de *Listeria*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Neisseria meningitidis*, et *Bacillus cereus* dans les échantillons des laits crus est un risque majeur pour le producteur et le consommateur et oblige un plan d'épidémiosurveillance et un "éveil microbiologique" pour protéger ces individus (Reyser, 1998).

Les *Pseudomonas* sont des microorganismes écologiquement importants. Mais l'espèce isolée à partir de nos échantillons (*Pseudomonas aeruginosa*) reste associée à des infections graves chez l'homme et cause à elle aussi un risque microbiologique suite à la consommation du lait cru. (Brock, 2000 ; Cousin, 1982).

Dans tous les laits récoltés, l'incidence des contaminants fécaux (*Streptococcus adjacens* (SKIKDA) et *Enterococcus faecium* (TEBESSA)) est faible (2/50 échantillons soit 0,04%)

Nous notons également la présence d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella oxytoca* qui sont citées dans les affections mammaires (Ounine, 2001). De plus, leur présence avec *Enterobacter intermidus* et *Citrobacter freundii* révèle une présence en coliformes fécaux dans les échantillons analysés. *E. coli* en particulier peut se fixer sur le matériel et s'y développer, créant ainsi une source constante de pollution si on ne procède pas à une stérilisation efficace entre les opérations de traite.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

La présence de *Listeria cf. monocytogenes* dans les laits crus a confirmé le caractère ubiquiste de cette espèce. Néanmoins des mesures d'hygiène à tous les niveaux de la filière agroalimentaire et des recommandations alimentaires auprès des consommateurs, en particulier auprès des populations à risque, contribuent à réduire l'incidence des listérioses humaine et animale.

Au terme de ce travail, il ressort que :

- La qualité bactériologique des laits crus analysés (FTAM) est acceptable.
- Les trois méthodes d'isolement des *Listeria spp.* ont aboutit.
- Les topologies des arbres (NJ + UPGMA) ont fait ressortir à chaque fois des regroupements monophylétiques et polyphylétiques significatifs d'interactions dépendantes de l'environnement bactérien immédiat.

L'identification microbiologique a permis de mettre en évidence les germes suivants : *Proteus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromobacterium violaceum*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis*, *Micrococcus lylae*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megatherium*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium bovis*, *Brevibacterium brevis*, ***Listeria cf. monocytogenes*** et ***L. murrayi***.

Cependant, il reste que l'appréciation des caractères morpho-physio-biochimiques pour l'identification bactérienne montre ses limites, en particulier dans le cas des micro-organismes exigeants.

En fin, les résultats de nos travaux devront apporter une contribution pour un "éveil microbiologique" au sein des producteurs et des consommateurs d'aliments non traités et permettent d'entrevoir de nouvelles perspectives :

- i. L'intégration des outils moléculaire et bioinformatique pour une phylogénie plus précise et plus fiable dans la version à suivre de ce travail,
- ii. l'intégration de nouveaux paramètres d'épidémiosurveillance dans les investigations à venir,
- iii. un travail sur des échantillons plus importants que les nôtres et sur des régions plus diversifiées pour mieux mesurer l'impact de *Listeria spp.*

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou-Elainin A.A., Ryser E.T., Donnelly C.W. (2000). Incidence and seasonal variation of *Listeria* species in bulk tank goat's milk. *J. Food Protec.* **63** : 1208-1213.
- Afif A., Faid M. et Najimi M. (2008). Qualité microbiologique du lait cru dans la région de Tadha au Maroc. *Rev. Biol. Biotech.***7**: 2-7.
- Arque's J.L., Rodri'guez E., GayaP., Medina M. and Nun'ez N. (2005). Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Int. Dairy J.* **15**: 893-900.
- Augustin J.C. and Carlier V. (1999). Mathematical modeling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Inter. J. Food Microbiol.* **56**: 29-51.
- Aurora R., Parakash A. and Parakash S. (2009). Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from milk and ready-to-eat indigenous milk products. *Food Control.* **20**: 835-839.
- Avril J.L. (2000). Bactériologie Clinique. 3^{ème} édition. Ellipse. pp. 140-150.
- Aygun O. and Pehlivanlar S. (2006). *Listeria spp.* in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. *Food Control.* **17**: 676-679.
- Bellouni R. (1990). *Listeria monocytogenes*: bactériologie et épidémiologie. Thèse doctorat en sciences médicales. INESM. Université Houari Boumediene d'Alger. 165 p.
- Bermudez-Aguire D., Corradini M.G., Mawson R. and Barbosa-Canovas G. (2009). Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **10**: 172-178.
- Best M., Kennedy M.E. and Coates F. (1990). Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 377-380.
- Beuchat L.R., Berrang M.E. and Brackett R.E. (1990). Presence and public health implications of *Listeria monocytogenes* on vegetables. In: Miller A.L., Smith J.L., Somkuti G. A. (Eds.), Food borne Listeriosis. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division). pp. 175-181.
- Bibb W.F., Gellin B.G., Weaver R., Schwartz B., Plikaytis B.D., Reeves M.W., Pimer R.W., Broome C.V. (1990). Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56 (7)**: 2133-2141.

- Blaszyk M. et Holley R.A. (1998). Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *Inter. J. Food Microbiol.* **39** : 175-183.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. (1996). Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome: 1. Lavoisier. France. 672 p.
- Bréand S., Fardel G., Flandrois J.P., Rosso L. and Tomassone R. (1998). Model of the influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. *Inter. J. Food Microbiol.* **40**: 185-195.
- Breidt F. et Fleming H.P. (1998). Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3159-3165.
- Camilli A., Portnoy A., Youngman P. (1993). Insertional mutagenesis of *Listeria monocytogenes* with a novel tn 917 derivative that allows direct cloning of DNA flanking transposon insertions. *J. Bacteriol.* **172**: 3738-3744.
- Chaume R.R. (1975). Les méthodes de taxonomie numérique. *Boissiera.* **24** : 369-381.
- Cheftel J.C et Culioli J. (1997). Review: effects of high pressure on meat. *Meat Sci.* **3**: 211-236.
- Chen H., Neetoo H., Ye Mu and Joerger R.D. (2009). Differences in pressure tolerance of *Listeria monocytogenes* strains are not correlated with other stress tolerances and are not based on differences in Cts R. *Food Microbiol.* **26**: 404-408.
- Cheroutre-Vialette M., Lebert I., Hebraud M., Labadie J.C. and Lebert, A. (1998). Effects of pH and aw stress on growth of *L. monocytogenes*. *Inter. J. Food Microbiol.* **42**: 71-77.
- Churchill R. L.T., Lee H. and Hall C.J. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *J. Microbiol. Meth.* **64**: 141-170.
- Cossart P., Vicente M.F., Mengaud J., Baquero F., Perez Diaz J.C., Berche P. (1989). Listeriolysin O is essential for virulence *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* **57**: 3629-3636.
- Czuprynski C.J. and Balish E. (1984). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* for gnotobiotic rats. *Infect. Immun.* **32**: 323.

- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition: Tec et Doc. Paris.476 p.
- Dragomirescu L., Serban M. et Banarescu P. (1984). Quelques problèmes concernant l'application de la taxonomie numérique en zoologie systématique. Extrait de « *travaux du Muséum d'Histoire naturelle Grigore Antipa* ». **XXV**: Bucharest.
- Dramsı S. et Cossart P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires the expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* **16**: 251.
- Donker-voet J. (1972). *Listeria monocytogenes*: some biochemical and serological aspects. *Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **19**: 287-291.
- El-baradei G., Delacroix-Buchet A. and Ogier J.C. (2008). Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* **121**: 295-301.
- El-Gazzar F.E. and Marth E.H. (1991). *Listeria monocytogenes* and listeriosis related to milk, milk products and dairy ingredients: A review II: *Listeria monocytogenes* and dairy technology. *Milchwissens chaft.* **46**: 82-86.
- Escriu R. and Mor-Mur M. (2009). Role of quantity and quality of fat in meat models inoculated with *Listeria innocua* or *Salmonella typhimurium* treated by high pressure and refrigerated stored. *Food Microbio.* **XXX**: 1-7.
- Euzéby J.P. (2000). List of bacterial names with standing in nomenclature genus *Listeria*. **[En ligne]**. Créé le 25 octobre 2002. Dernière mise à jour le 05 juillet 2008. <http://www.bacterio.cict.fr//Listeria.html>. (Consulté le 31/10/2010).
- Farber J.M. and Peterkin P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbial Rev.* **55**: 476-511.
- Farber J.M. (1992). Prevention and control of foodborne listeriosis. *Dairy Food Environ. Sanit.* **12** : 334-340.
- Federighi M. (2005). Bactériologie alimentaire. Compendium d'hygiène des aliments. 2^{ème} édition. Economico. 250 p.
- Gaillard J.L., Berche P., Frehel C., Grouin F., Cossart P. (1991). Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram positive cocci. *Cell.* **65**: 1127-1141.

- Garcia J.A., Dominguez L., Briones V., Blanco M., Fernandez-Garayzabal J.F, Suarez G. (1990). Revision of the antigenic structure of genus *Listeria*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**:113-120
- Germini A., Masola A., Carnevali P. and Marchelli R. (2009). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food control.* **20**: 733-738.
- Gianfranceschi M.V, D'ottavio M.C, Gattuso A, Bella A and Aureli P. (2009). Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002 -2005). *Food Microbiol.* **26**: 520- 526.
- Gilmour A. and Kells J. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *Int. J. Food Microbiol.* **91**: 167-174.
- Grimont F. and Grimont P.A.D. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **137** B: 165-175.
- Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. 652p.
- Guiraud J.P. et Rosec J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. Paris. 300p.
- Hamdi T.M., Naim M., Martin P. and Jacquet C. (2007). Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). *Int. J. Food Microbiol.* **116**: 190-193.
- Hao Y.Y., Brackett R.E. and Doyle M.P. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated couled beef. *J. General. Microbiol.* **134**: 2917-2924.
- Harakeh S., Saleh I., Zouhairi O., Baydoun E., Barbour E. and Alwan N.(2009). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Sci. Total Environ.* **407**: 4022-4027.
- Harvell E.A. (1986). *Listeria monocytogenes*-induced interferon-gamma primes the host for production of tumor necrosis factor and interferon-alpha/beta. *J. Infect. Dis.* **167**: 1364.
- Harvey J., Gilmour A. (1992). Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. *J. App. Bacteriol.* **72**: 119-125.

- Herrero M., Mayo B., Gonzalez B and Suarez J. E. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 565-570.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. *et al.* (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Williams and Wilkins. USA. 787 p.
- Huang Y., Luo Y., Zhai Z., Zhang H., Yang C. and Tiam H. (2009). Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentasaceus* 05-10 isolated from Sichuan pickle, a traditionally fermented vegetable produced from China. *Food control.* **20**:1030-1035.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1996). *Campylobacter* In "Microorganisms in Food 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens. Blackie Academic and Professional, London. pp. 45-65.
- Isabella M.M.S., Almeida R.C.C., Alves M.A.O and Almeida P.F. (2003). Occurrence of *Listeria spp.* in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *Int. J. Food Microbiol.* **81**: 241– 248.
- Jalali M. and Abedi D. (2008). Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. *Int. J. Food Microbiol.* **122**: 336-340.
- Jawetz, Metnick and Adelberg's. (1995). *Medical Microbiology*. 20th Edition. Appleton. USA. 656 p.
- Jayaro B.M. and Henning D.R. (2005). Prevalence of food-borne pathogens in bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* **84**: 2157-2162.
- Joffin J. N. et Leyral G. (1998). *Microbiologie Technique: Documentation Technique*. Tome: 2. 2^{ème} édition. Paris. 299 p.
- Journal Officiel de la République Algérienne N° 35. 01 Safar 1419, 27 mai 1998. Critères microbiologiques des laits et des produits laitiers. [En ligne]. [www. joradp.dz](http://www.joradp.dz). (Consulté le 20/10/2010).
- Journal Officiel de la République Algérienne N° 70. 24 Ramadhan 1425, 7 novembre 2004. Méthode de contrôle microbiologique pour le lait pasteurisé. [En ligne]. [www. joradp.dz](http://www.joradp.dz). (Consulté le 13/09/2010).

- Jouve J. L. et Lahellec C. (1991). Incidence des *Listeria* dans les denrées alimentaires. In « compte-rendus de la conférence internationale. *Listeria* et sécurité alimentaire ». 13-14 Juin 1991. Laval. France. ASEPT. pp. 89-104.
- Junttila J.R., Niemela S.I. and Him J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 321-327.
- Kalmokoff M. L. et al. (2001). Identification of a new plasmid-encoded *sec*-dependent bacteriocin produced by *Listeria innocua* 743. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4041.
- Karakolev R. (2009). Incidence of *Listeria monocytogenes* in beef, porc, raw-dried and raw-smoked sausages in Bulgaria. *Food Control.* **20**: 953–955.
- Kim L.E., Choi N.H., Bajpai V.K. and Kang S.C. (2008). Synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Chem.* **110**: 375-382.
- Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H. and Cossart P. (1992). *Listeria monocytogenes* induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell.* **68**: 521– 531.
- Kozak J., Balmer T., Byrne R. and Fisher K. (2009). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: incidence in dairy products. *Food Control.* **7**: 215-221.
- Kukharkova L.L, Boyarshinov P.K., Adutskevich V.A. and Perova P.B. (1960). Data on the hygienic judgement of meat in case of listeriosis. *Veterinariya.* **37**: 74-79.
- Lammerding, A.M. and Doyle, M.P. (1989). Evaluation of enrichment procedures for recovering *Listeria monocytogenes* from dairy products. *Inter. J. Food Microbiol.* **9**: 249–268.
- Larpent J.P. (1997). Microbiologie alimentaire : Techniques de Laboratoire. Tech et Doc. Lavoisier. Paris. 1037 p.
- Larpent J.P. (2004). *Listeria*. 3^{ème} édition. Tech et Doc. Paris. 165p.
- Lebres E. (2002). Manuel des travaux pratiques : Microbiologie des laits et des produits laitiers. Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments. Institut Pasteur d'Algérie. 19 p.
- Lebres E. (2005). Manuel des travaux pratiques analyses des aliments. Séminaire de recyclage: laboratoires d'hygiène des wilayas de l'EST. Institut Pasteur d'Algérie. 5 p.

- Lecointre G. et Le Guyader H. (2006). Classification phylogénétique du vivant. 3^{ème} Edition Belin. France. 559 p.
- Le minor L. et Véron M. (1990). Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Flammarion. Paris. 1107 p.
- Leriche V., Chassaing D. and Carpentier B. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *Inter. J. Food Microbiol.* **51**: 169-182.
- Linton M., Mackle A.B., Upadhyay V.K., Kelly A.L. and Patterson M.F. (2008). The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: A comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **9**: 423-428.
- Little C.L and De Louvois J. (1999). Health risks associated with unpasteurized goat's and ewes' milk on retail sale in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* **122**: 403-408.
- Little C.L., Rhoades J.R., Sagoo S.K., Harris J., Greenwood M., Mithani V., Grant K. and McLauchin J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiol.* **25**: 304-312.
- Lou Y. and Yousef A.E. (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *App. Environ. Microbiol.* **63**: 1252-1255.
- Lourenco A., Neves E. and Bristo L. (2009). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers. *Food control.* **20**: 585-589.
- Luchetta P, Maurel Mc, Higuete D. *et al.* (2005). Evolution moléculaire. Dunod. Paris. 334p.
- Madigan M., et Martinko J. (2007). Brock : Biologie des microorganismes. 11^{ème} édition. Pearson Education. 1047 p.
- Marth E.H. (1986). *Listeria* in dairy foods. *Cheese Rep.* **111**: 1.
- Mengaud J. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell.* **84**: 923.
- Meyer-Broseta S., Diot A., Bastian S., Riviere J. and Cerf O. (2003). Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* **80**: 1-15.
- Millet L., Saubusse M., Didiene R., Tessier L. and Montel M.C. (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **108**: 105-114.

- Mossel D.A. and Van Netten A.P. (2009). Harmful effects of selective media on stressed micro-organisms: nature and remedies *In* Escriu R., Mor-Mur M. Role of quantity and quality of fat in meat models inoculated with *Listeria innocua* or *Salmonella typhimurium* treated by high pressure and refrigerated stored. *Food Microbiol.* **XXX**: 1-7.
- Murchie L.W, Cruz-Romeo M., Ferry J.K., Linton M., Patterson M.F., Smiddy M., Kelly A.L. (2005). High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **6**: 257-270.
- Murray E. D. G., Webb R. A. and Swann M. B. R. (1926). A Disease of Rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Path. Bacteriol.* **28**. p.407.
- Nero A.L., DE Mattos M.R., Barros M.A.F., Beloti V. and Melo Franco B.D.G. (2009). Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* Detection. *Microbiol Res.* **164**: 529-535.
- Neves E., Laurenco A., Carla Silva A., Coutinho R. and Brito L. (2008). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. *Syst. App. Microbiol.* **31**: 387-392.
- Noe´mia Gameiro , Suzana Ferreira-Dias , Mass Ferreira and Luisa Brito. (2007). Evolution of *Listeria monocytogenes* populations during the ripening of naturally contaminated raw ewe’s milk cheese. *Food Control.* **18**: 1258–1262.
- Nolan D.A., Chamblin D.C. and Troller J.A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Inter. J. Food Microbiol.* **16**: 323-335.
- Nufer U., Stephan R. and Tasara T. (2007). Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7°C. *Food Microbiol.* **24**: 444-451.
- Orth R. and Mrozek H. (1989). Is the control of *Listeria Campylobacter*, and *Yersinia* a disinfection problem ? *Fleischwirtschaft.* **69**: 1575-1576.
- Osterholm M.T. and Potter M.E. (1997). Irradiation pasteurization of solid foods: taking food safety to the next level. *Emerg. Inf. Dis.* **3**: 575-577.

- Paillard D., Dubois V., Duran R., Nathier F., Guittet C., Caumette P., et al. (2003). Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23 rRNA gene fragment. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6386-6392.
- Parks L.C. (1997). Hand Book of Microbiological Media. 2nd Edition. ATLAS. Londre. 1706 p.
- Pearson L.J. and Marth E.H. (1990). *Listeria monocytogenes*: Threat to a safe food supply: a review. *J. Dairy Sci.* **73**: 912-928.
- Pedro L., Rui R., MASS F., Grac R., Christine J., Paul M. and Luisa B. (2006). Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 111 – 121.
- Piffaretti J.C., Kressebuch H., Aeschbacher M., Bille J., Bannerman E., Musser J.M., et al. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **86**: 3818-3822.
- Pirie J. H. H. (1927). A New Disease of veld rodents, "Tiger River Disease". *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.* **3**. p.163.
- Pirie J. H. H. (1940). *Listeria*. Change of name for a genus of bacteria. *Nature.* **145**. p.264.
- Poyart-Salmeron C., Carlier C., Trieu-Cuot P., Courtieu A.L., Courvalin P. (1993). Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet.* **335**: 1422-1428.
- Premaratne R.J., Lin W.J. and Johnson E.A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3046-3048.
- Richeter R.L., Ledford R.A., Murphy S.C. (1992). Milk and milk products In: Vanderzant C., Splittstoesser D.F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd Edition. *American Public Health Association.* USA. p. 837-838.
- Rocourt J., Audurier A., Courtieu A.L., Durst J., Ortel S., Schrettenbrunner A. and al. (1985). A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg.* **259**: 489-497
- Rodrigues J.L., Gaya, P., Medina, M., and Nunñez, M. (1994). Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp* in ewes' raw milk. *J. Food Prot.* **57**: 571-575.

- Ross T., Rasmussen S., Fazil A., Paoli G. and Sumner J. (2009). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia. *Int. J. Food Microbiol.* **131**: 128-137.
- Ryser E.T. (1998). Public health concerns *In Appl. Dairy Microbiol.* Marcel Dekker, Inc, USA. p. 263-403.
- Sawaya, W.N., Safi, W.J. and Shalhat A.F. (1984). Chemical composition and nutritive value of goats milk. *J. Dairy. Sci.* **67**: 1655-1659.
- Scifo G.O., Randazzo C.L., Restuccia C., Fava G. and Caggia C. (2009). *Listeria innocua* growth in fresh cut mixed leafy salads packaged in modified atmosphere. *Food Control.* **20**: 611-617.
- Schaak M.M. and Marth E.H. (1988). Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk and yogurt mix during fermentation by thermophilic lactic acid bacteria. *J. Food Pr.* **51**: 607-614.
- Sword C.P. (1966). Mechanisms of pathogenesis in *Listeria monocytogenes*. Influence of iron. *J. Bacteriol.* **92**: 536-542.
- Thevenot D., Delignette-Muller M.L., Christieans S., Leroy S., Kodjo A. et Vernozy-Rozand C. (2006). Caractérisation sérologique et moléculaire d'isolats de *Listeria monocytogenes* collectés dans 13 charcuteries salaisons et leurs produits. *Science et Technique. Viandes Prod. Carnés.* **26** : 27-31.
- Thomas S.B and Griffiths J.M. (1960). Psychrophilic bacteria in pasteurised milk. *Dairy Eng.* **77** (12): 438-444.
- Tilney L.G., Portnoy D.A. (1990). Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* **109**: 1597-1608.
- Vanegas M.C, Vasquez E, Martinez A.J and Rueda A.M. (2009). Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. *Food Control.* **20** : 430-432.
- Vasseur, C. (2001). Combined effects of NaCl, NaOH, and biocides (monolaurin or lauric acid) on inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas spp.* *J. Food Prot.* **64**: 1442.
- Wagner M. and McLaughlin J. (2008). Handbook of *Listeria monocytogenes* : Biology. CRC Press. Boca Raton. Floride. USA. ISBN :13-978-1-4200-5140-7. p.3-25.

- Welshimer H.J. (1968). Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. *J. of Microbiol.* **95**:300-301.
- Yee Chye F., Abdullah A. and Mohd Khan A. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology.* **21**: 535-541.
- Ynte P.V., Luc M.H., Atmadja R.D. (2005). Deletion of sig B in *Bacillus cereus* affects spore properties. *FEMS Microbiol. Letters.* **252** : 169-173.

ANNEXES

Annexe 1

Lecture et interprétation des caractères portés sur la galerie biochimique.

Tests	Composants actifs	Réactions/enzymes	Résultats	
			Négatif (0)	Positif (1)
Catalase	Peroxyde d'hydrogène =H ₂ O ₂	Dis mutation	Absence de bulle d'air	Présence de bulle d'air
Oxydase	N-N diméthyl para-phénylène diamine	Cytochrome-oxydase	Incolore	Violet
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine di hydrolase	Jaune	Violet /rouge-orangé
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Violet /rouge-orangé
ODC	L-ornithine	ornithine décarboxylase	Jaune	Violet /rouge-orangé
CIT	Tri sodium citrate	Utilisation de citrate	Vert pale	Bleu-vert/bleu
H ₂ S	Sodium thiosulfate	Production d'H ₂ S	Incolore	Dépôt noir
URE	Urée	Urease	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose/rouge
VP	Sodium pyruvate	Production d'acetoine	Incolore	Rose/rouge
NR	Nitrate réductase	Réduction des nitrates	Incolore	Rose/rouge
RM	Rouge de méthyle	Ré alcalinisation	Jaune	rouge
ESC	Esculine	Esculinase	incolore	Noirâtre
GEL	Gélatine	Gelatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
Mannitol	D-mannitol	Fermentation /oxydation	Rouge	jaune
GLU	D-glucose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
RIB	Ribose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
XYL	D-xylose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
LAC	Lactose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune

Annexe 2

Code des caractères pour les Matrices Binaires.

caractère	1	0
Forme	Bacille	Coque
Gram	+	-
Surface	Lisse	Rugueux
Contour	Régulier	Dentelé
Élévation	Bombée	Plate
Consistance	Crémeuse	Sèche
Opacité	Opaque	Transparente
Taille	Petite (< 2mm)	Grosse (>2mm)
Pigmentation	+	-
Catalase	+	-
Oxydase	+	-
ONPG	+	-
Urease	+	-
Indole	+	-
Mannitol	+	-
Mobilité	+	-
ADH	+	-
LDC	+	-
ODC	+	-
Citrate de simmens	+	-
H₂S	+	-
TDA	+	-
VP	+	-
RM	+	-
NAR	+	-
Esculinase	+	-
Gelatinase	+	-
Sucres	+	-
Tests physiques	pousse	Pas de pousse
Spores	Présence	absence
CO₂	+	-

Annexe 3**Formule des milieux de culture**

- **Gélose PALCAM -Composition pour 1 litre- :**

Peptone	23,0 g
LiCl	15,0 g
Agar-agar	20,0 g
Mannitol	10,0 g
NaCl	5,0 g
Extraits de levure	3,0 g
Amidon	1,0 g
Esculine	0,8 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Glucose	0,5 g
Rouge de phénol	0,08 g
Supplément PALCAM	10,0 mL

pH : 7,2 ± 0,2 à 25 °C

Supplément PALCAM :

Cefotaxime	20,0 mg
Chibroxine	5000 ui/l
Colistine	20,0 mg
Eau distillée	10,0 ml

- **Gélose TSAYE (modifié)**

Bouillon tryptone soja	30g
Extrait de levure	6.0g
Agar-agar	9à 18 g
Eau	1000ml
Digestat enzymatique de caseine	17g
Chlorure de sodium	5.0g
Hydrogénophosphate dipotassique	2.5g

Glucose 2.5g

PH=7.3

- **Gélose au Sang de Cheval**

Extrait de levure 5.0g

Agar-agar 9à 18 g

Eau 1000ml

Digestat enzymatique de tissus animaux 15g

Digestat enzymatique de foie 2.5g

Chlorure de sodium 5.0g

PH=7.3

Annexe 4**Les séquences partielles de l'ARNr 16S des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif relevées sur Genbank**

TAXON	ID /pb	SEQUENCE
<i>Listeria monocytogenes</i>	AJ5 357 01	<p>gaacgaacggaggaagagcttgctcttccaaagttagtggcggacgggtgagtaaacacgtgggcaa cctgcctgtaagttggggataaactccgggaaaccggggctaataaccgaatgataaagtgtggcgca tgccacgcttttgaaagatggtttcggctatcgcttacagatgggcccgcggtgcattagctagtt ggtagggtaatggcctaccaaggcaacgatgcatagccgacctgagagggatgacggccacactgg gactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccgcaatggacgaaagt ctgacggagcaacgcgcgctgtatgaagaaggtttccggatcgtaaagtaactgttgttagagaaga acaaggataagagtaactgcttgctcccttgacggtatctaaccagaaagccacggctaactacgtg ccagcagccgcggaataacgtaggtggcaagcgttgtccgatttatgggctaaagcgcgcgca ggcggctcttttaagtctgatgtgaaagccccggcttaaccggggagggatcattgaaactggaag actggagtgcagaagaggagagtggaattccacgtgtagcggtaaatgcgtagatatgtggagga acaccagtggcgaaggcgactcctcggctgttaactgacgctgaggcgcgaaagcgtggggagcaa acaggattagataccctggtagtccacgcctgaaacgatgagtgctaagtgttaggggggttccgc cccttagtgctgcagctaacgcattaagcactccgcctggggagtagcaccgcaagggtgaaactc aaaggaattgacgggggcccgcacaagcgggtggagcatgtggttaattcgaagcaacgcgaagaa ccttaccaggtcttgacatcctttgaccactctggagacagagcttccctcggggacaaagtga caggtggtgcatggttgcgctcagctcgtgctgtagatgttgggttaagtcccgaacgagcgca accctgatttttagttgccagcatttagttgggactcctaaagtgactgccggtgcaagccggagg aaggtggggatgacgtcaaatcatcatgcccttatgacctgggctacacacgtgctacaatggat agtacaaagggctcgcgaagccgcgaggtggagctaataccataaaaactattctcagttcggattgt aggctgcaactgcctacatgaagccggaatcgtagtaatcgtggatcagcatgccacggatgaat acgttcccggccttgtaacacacgcgccctcacaccacgagagtttgaacaccggaagtcggtag ggtaacctttatggagcc</p>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	GQ 856 136. 1	<p>Caacgtgcttgccctttcagctgagtgccgaacgggtgagtaaacacgtggacaacctgc ctcaaggctgggataaacatttggaaacagatgctaataaccgaataaaaacttagtgctc catgacacaaaagttaaaggcgcctcggcgtcacctagagatggatccgcggtgcat gttagttggtgggtaaaaggcctaccaagacaatgatgcatagccgagttgagagactg atcggccacattgggactgagacacggcccaaactcctacgggaggctgcagtagggaa tcttccacaatgggcgaaagcctgatggagcaacgcgcgctgtgtgatgaaggctttcg ggctgtaaaagcactgttgtatgggaagaacagctagaataggaaatgattttagtttga cggtaaccataaccagaaaggacggcctaataacgtgccagcagccgcggttaatacgtatg tcccgagcgttatccgatttatgggctaaagcagcgcagactgtttattaagtct gatgtgaaagcccgagctcaactccagaatggcattggaaactgggttaacttgagt caggagaggtaaagtggaaactcccagtgtagcgggtggaatgcgtagatgtattaagaac accagtgccgaaagcgggcttactggactgcaactgacgttgaggctcgaaggtggtggg tagcggacatgattagataccctggtagtgacacgtagacgatgatcactaagtgcta ggagcttcgactctagtgcggaggcgtacgcataatgctcgtctgggagtagctacga catgattgcaagctgcataagggac</p>
<i>Aerococcus viridans</i>	DQ3 7123 9.1	<p>ctggcggctgcctaataactcgcagtcacgcgaacagatgaagtgcttccacttctgacg ttagcggcgaacgggtgagtaaacacgtaaggaatctacttttccgcgggggaaagaaa acagaaacgggtgctaataaccgcataatacttcttccgcagtggaagaagattgaaaga cggctctgctgtcacttatagatgaccttgcgggtgcattagttagttgggtgggtaacg gcctaccaagacgatgatgcatagccgacctgagagggatgacggccacattgtgactg agacacggcccaaactcctacgggaggcagcagtagggaatcttctttaaaggcgaa</p>

		<p>agcctgacggagcaatgccgcgtgagtgagaaggccttcgggctcgtaaaactctgttg ttagagaagaacaaattgtagagtaactgctacagctcttgaccgatcttatcagaaag ccacggctaactacgtgccagcagccgcgggtaatacgtaggtgggagccctggccgg attdantgggaggtaaaaggagcccaagtggcttcttaagmctgatgmnгааgccc cacggcctnnaccntgggagggccattggaaactggcnaaacntgantnncngaacana aatgnggnanntggaancgngggantgctnncntctcncnaagaacaccagctngna aggctaataccggmctgctccaacaggattagataccctggtagtccacccccgtaaaag atgagtgctaggtgtgggggttttccgccattcngggcgggcagttangcnttaaaac actccgcctgggggtacgcccccaaggtgaaattcaaaggaattgtcggggcccgc caacgggtgggagcatgtgttttaattgaagcaacgcgaagaaccttcccaagtcttg acatcctttgaccaccctagagatagggctttcccttcggggacaaagtgcaggggtg gcatgggtgtgtcacctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcncaacagcagcgn cccctattattagttgccagctcagttgggcactcctaatgagactgccggtgacaaa ccggaggaagggtgggatgacgtcaaatacncatgcccttatgacttgggctacacac ctgggtacaatggatgggtacaacgagtgcaaacccnccgaggggnagcaaatctnttaa accnttntcagttcggantgcaggtgcaactnncctgcangaanccggaatcgctagt aatcgtggatcagcatgccccggggaatacgttcccgggtctgtacacacccccgctc acaccagagagtttgaacaccccgaagtgggtgaggtaacctttatggagccagccgc cgaaggtggacagagatggggag</p>
<p><i>Brevibacillus brevis</i></p>	<p>GQ 3757 94.1</p>	<p>taatacatgcaagtcgagcaggggtcttcggaccgctagcggcgagcgggtgagtaaca cgtaggcaacctgcctctcagaccgggataacatagggaaacttatgctaataccggat agggtttttggatcgatgatccgaaaagaaagatggcttcggctatcactgggagatg ggcctgcggcgcattagctagttgggtgggtaacggcctaccaaggcgacgatgcgtag ccgacctgagaggggtgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacggg aggcagcagtagggaattttccacaatggacgaaagtctgatggagcaacgccgcgtga acgatgaaggtcttcggattgtaaagttctgtttagggagcaataagtagcgttcga atagggcggtagcttgacggtagctgacgagaaagccacggctaactacgtgccagcag ccgcggtaatacgtaggtggcaagcgttgcgggatttattgggctaaagcgcgcgca ggcggctatgtaagtcgtgtgttaaagccgggggtcacccccgggttcgcatcggaaac tgtgtagcttgatgycagaagaggaaagcggatttccacgtgtagcggtaaatgcgta gagatgtggaggaacaccagtgggcgaaggcggcttctgggtctgtaactgacgtgagg cgcgaaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgat gagtgctaggtgttgggggtttcaataccctcagtgccgcagctaacgcaataagcact ccgcctggggagtagcctcgcaagagtgaactcaaaggaattgacggggggcccgcaca agcgggtggagcatgtggttttaattcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggtcttgaca tcccgtgaccgctctggagacagagcttcccttcggggcagcgggtgacaggtggtgca tggtgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcggcaacgagcgaaccc ttatcttagttgccagcattcagttgggcactctagagagactgccgtcgacaagacg gaggaaggcgggatgacgtcaaatacctatgcccttatgacctgggctacacacgtg ctacaatggttgggtacaacgggatgctacctcgcgagaggagccaatctcttaaaacc aatctcagttcggattgtaggctgcaactcgctacatgaagtgggaatcgctagtaat cgcggatcagcatgccgcgggtgaatacgttcccgggcttgtacacaccgcccgtcaca ccacgggagtttgaacaccccgaagtgggtgaggtaacgcgaaggagccagccgcccga agg</p>
<p><i>Staphylococcus capitis</i></p>	<p>HM 4395 09.1</p>	<p>Taatacatgccagtcgagcgaacagacgaggagcttgctcctctgacgttagcggcgga cgggtgagtaaacacgtggataaacctacctaagactgggataaacttcgggaaaccgga gctaataaccgataaacatgtgaaccgcaggttcaacagtgaaagacgggtcttgctgt cacttatagatggatccgcgcgattagctagttggtaaggtaacggcttaccaggc aacgacgcgtagccgacctgagaggggtgatcggccacactggaactgagacacgggtcca gactcctacgggagggcagcagtagggaatcttcgcaatgggcgaaagcctgacggagc aacgccgcgtgagtaaaagaggtcttcggatcgtaaaactctgttattaggggaagaaca aatgtgtaagtaactatgcacgtcttgatggtagcctaatacagaagccacgggtaacta cgt</p>
<p><i>Staphylococcus epidermis</i></p>	<p>DQ8 7074 0.1</p>	<p>cgaggagcttggctcctctggcgtgagcgggggacgggtgagtaaacacgtggataaccta cctatgngagggggatnacctcgggaaaccggagctaaaaccgataacaagttgaagc agaggggtgcggctctgaaagacctccttgntgtcacttatagatggatccgctccgtag tgggtggttggtaaggtaacggcttaccnnggcaatgatgcgtatccgacctgaaaggg tgatcggccgaccgggaaactgagacacagtcagactcctacgggagggcagcaataggg aatcttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagtgagaaggtctt cggatcgtaaaactctgttattaggggaagaacaaatgtgtaagtaactatgcgcgtctt gacggtagcctaatacacaagccacgggtaactacctgccagcagccgcggttaatacgt</p>

		<p>gggtggcaagcggttatccggatTTATtgggcgtaaagcgcgcgtaggcggTTTTTTtaagt ctgatgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggtcattggaaactggaaaacttgagt gcagaagaggaaaagtggaattccatgtgtagcggtgaaatgCGcagagatatggaggaa caccagtggcgaaggcgacttctggctgtgtaactgacgctgatgtgCGaaagcgtggg gatcaaacangattatataccctggtagtccacgCGtaaacgatgagtgctaagtgtt agggggTTTTccgccccttagtgaggcagctaacgcattaagcactccgCctggggagta cgaccgcaaggTtgaaactcaaaggaattgacggggggcccgcaacaagcggTggagcatg TggtTTaattcgaagcaacgCGaagaaccttcccaaatcttgacatcctctgaaccctc tagagatagagTTTTcccttCGggggacagagtgacaggtggTgcatggTgtcgtca gctcgtgtcgtgagatgtTgggttaagTcccgcaccgagcCGcaacccttaagcttagtt gcatcattaagtTgggcaactctaaggtgactTccggTgacaacCGgaggaaggTggg gatgacgtcaagtcatcatgccccttatggTttggctacacacgTgctacaatggTca atacaaaaggtagcCaaccgCGaggtcaagcaaatccataaagTgttctcagTtCG gattgtagTctgcaactcgactacatgaagctggaatCGctagtaatCG</p>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	HM 5853 68.1	<p>agagTttgatcatggctcaggatgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtCGaa cgagTtctgattattgaaaggTgctTgcatcttgatttaattTgaaCGagTggcggac gggtgagTaaacagTgggtaacctgcccTtaagTgggggataacattTgaaacagatg ctaataccgCataaaTccaagaaccgcatggTtctTggctgaaagatggcGtaagctat cgTTTTggatggaccCGcggcgtattagctagTggTgaggtaacggctcaccaggc aatgatacgtagccgaactgagaggtTgatCGccacatTgggactgagacacggccca aactcctacgggaggcagcagtagggaatctTccacaatggacGcaagTctgatggagc aacgCCgctgagTgaagaaggcttCGgTcgtaaaactcgtTgtTggagaagaatg gtCGgcagagTaaactgtTgtCGcgtgacggTatccaaccagaaagccacggctaacta cgtGCCagcagccCGgtaatacgtaggTggcaagcgttatccggatTTATtgggcgta actCGcagcgcaggggTTTTtaagTctgatgtgaaagccctCGgcttaaccgaggaa gtgcatcagaaactgggaaactTgagTgcagaagaggacagTggaactccatgaggtag CGgtgaaatCGtagatataTggaagaacaccagTggcgaaggCGgctgtcTggtctgt aactgacgctgaggctCGaaagcatgggtagCGaacaggtatagataccctggtagTcc atgCCgtaaacgatgaatgctaggcgtTggaggTtCCgcccctcagTgCCgcaacta acgcatTaaagcattCCgctgggagTacgaccGcaaggtTgaaactcaaaggaattga cgggggCCCGcacaagcggTggagcatgtggtTtaattCGaagcaacCGaagaacctt accaggTcttgacatctTTgatcacctgagagatcaggTtcccttCGggagcaaaa tgacaggtggTgcatggTgtcgtcagctcgtcgtgagatgtTgggttaagTcccgc aacgagcGcaacccttatgactagTtgccagcatttagTgggcaactctagtaagactg ccggtgacaaaccggaggaaggTggggatgacgtcaaatcatcatgccccttatgacct gggctacacagTgctacaatggatggTacaacgagTtgcgagaccCGaggtcaagct aatctctTaaagcattctcagTtCGgactgtaggctGcaactCGcctacCGcaagTcg gaatCGctagTaatCGcggatcagcagcCGcggTgaatacgtTcccgggCctTgtaca caccgCCgTcacacatgagagTtTgtaaacCCgaaGCCggtggcGtaaccctTTta gggagcGagccgtctaaggtgggacaaatgattagggTgaagTcGtaacaaggtagccg ta</p>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	HM 4624 28.1	<p>CtataatgcagTcgaacCGctTggcccaattgattgatggTgctTgcacctgattgatt TggTcgccaacgagTggcggacgggtgagTaaacagTtaggTaaactGCCagaagcgg gggacaacattTgaaacagatgctaataccgCataaacaagTgtTcgcatagaacaac gctTaaaagatggcttctcgtatcacttctggatggacctCGgTgcattagctTgtt ggTgggTaaCGcctaccaaggcagTgatgcatagccgagTtgagagactgatCGcc acaatgggactgagacacgGCCatactcctacgggagGcagcagTagggaatctTcca caatgggCGcaagcctgatggagcaaacaccCGcgtgagTgaagaaggTtccgctcgt aagctcgtTgtTaaagaagaacagTatgagagTaaactgtTcatacgtTgacggTatt taaccagaaagTcacggctaactacTgCCagcagccCGgTaaactgtaggtggcaag cgttatccggatTTATtgggcgtaaagagagTgcaggCGgTTTTcTaaagTctgatTga aagccttCGgctTaaCCggagaagTgcatCGgaaactggataactTgagTgcagaagag ggtagTggaactccatgtgtagcggTggaatgCGtagatataTggaagaacaccagTgg cgaaggCGgctacctggTctgcaactgacgctgagactCGaaagcatgggtagCGaaca ggattagataccctggtagTccatGCCgTaaacgatgagTgctaggtgtTggagggtTt ccgcccTcagTgCCgagTaaCGcattaagcactCCgctgggagTacgaccGcaa ggTgaaactcaaaggaatTgacgggggCCCGcacaagcggTggagcatgtggtTtaat tCGaagctacCGaagaacctTaccaggTctTga</p>
		<p>gacgaacgctggcggcgtgctTaaacatgcaagTcgaacggaaaggccccagctTgct ggggTactCGagTggCGaacgggtgagTaaacagTgggtgatctGCCctgactcTggg ataagcctgggaaactgggtctaataccggataggaccgTgctTtagTgtgTcggTgg</p>

<p><i>Corynebacterium bovis</i></p>	<p>AF5 3759 0.1</p>	<p>aaagtttttcggtgcaggatgagcccggcctatcagcttgttgggtggggaatggcc taccaaggcggcgacgggtagccggcctgagaggggtgtacggccacattgggactgaga cacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgcaagcc tgatgcagcgacgcccgtgggggatgacggccttcgggttgtaaacccctttcggcag ggacgaagcttttgtgacggtacctgcataagaagcaccggctaactacgtgccagcag ccgcggtaatcgtaggggtgcgagcgttgtccggaattactgggcgtaagagctcgta gggtggtttgtcgcgctcgtctgtgaaatcccggggcttaactccgggctgcagggcgata cgggcataaacttgagtgctgtaggggagactggaattcctgggtgtagcgggtgaaatgcg cagatatcaggaggaacaccgatggcgaaggcaggtctctgggcagtaactgacgctga ggagcgaaagcatgggtagcgaacaggatagataccctggtagtccatgccgtaaacg gtgggctaggtgtggggatcttccacgatttccgctgcccgtagctaacgcatgaagcg ccccgctggggagtacggccgcaaggctaaaactcaaaggaattgacggggcccgcga caagcggcggagcatgtggttaattcgtatgcaacgcgaagaaccttacctgggcttga catgggcaggaccggcgtggagacacgtcttcccttttgggcttgttcacaggtggtgc atggttgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgaacc cttgtcttgtgttggcagcacgtaatgggtggggactcgcgagagactgccggggttaac tcggaggaaggtggggatgacgtcaaatcatcatgccccttatgtccagggcttcacac atgctacaatggtcggtagcagtggttgcgatgcccgagggctcagctaatcccttaaa gccggtctcagttcggattggagctgcaactcgcactccatgaagtcggagtcgctagt aatcgcagatcagcaacgctgcccgtgaatacgttcccgggcttgtacacaccgcccgt cacgtcatgaaagtggtaaacaccgcaagccgggtggccaaactcgttagggagccgtc gaaggtgggatcggcgattgggacgaagtcgtaacaaggtagccgtaccggaagg</p>
<p><i>Corynebacterium jeikeium</i></p>	<p>AB4 7061 5.1</p>	<p>Tgcgagcgttgtccggaattactgggctgtaagagctcgtaggtgggttgtcgcgctcgt ctgtgaaatcccggggcttaacttcgggctgcagggcgatacgggcataactagagtgc tgtaggggagactggaattcctgggtgtagcgggtgaaatgcccagatatcaggaggaaca ccgatggcgaaggcaggtctctgggcagttactgacgctgaggagcgaagcatgggta gcgaacaggattagataccctggtagtccatgccgtaaacgggtgggctaggtgtggg ggttttattacgattcccgtgcccgtagctaacgcattaaagcccccgctggggagta cggccgcaaggctaaaactcaaaggaattgacggggggcccgcacacagcggcgagcatg tggattaattcgtatgcaacgcgaagaaccttacctgggcttgacataccggatcgtc gcagagatgtagtttcccttgtggctggtgtacaggtggtgcatggttgtcgtcagctc gtgtcgtgagatgt</p>
<p><i>Bacillus cereus 1</i></p>	<p>HM 5692 25.1</p>	<p>agagtttgatcatggctcaggatgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgag cgaatggattgagagcttgcctcaagaagttagcggcggacgggtgagtaaacacgcgg gtaacctgcccataagactgggataaactccgggaaaccggggctaaaccggataacat tttgaaccgcatggttcgaaattgaaaggcggcttcggctgtcacttatggatggacc gcgtcgcattagctagttggtgaggtaacggctcaccaaggcaacgatgcgtagccgac ctgagaggggtgatcggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggca gcagtagggaaatcttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgcgtgagtgat gaaggcttccgggtcgtaaaactcgttgttagggagaacaagtgctagttgaataag ctggcaccttgacggtaactaacagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcg gtaatacgtaggtggcaagcgttatccggaattattgggctgaaagcgcgcgaggtgg tttcttaagtctgatgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggtcattggaaactggg agacttgagtcgagaagaggaaagtggaaattccatgtgtagcgggtgaaatgctgtagaga tatggaggaacaccagtgccgaaggcgacttctgggtctgtaactgacactgaggcgcg aaagcgtggggagcaaacaggatagataccctggtagtccacgcgtaaacgatgagt gctaagtgtagaggggttccgccttttagtgctgaagttaacgcattaagcactccgc ctggggagtacggccgcaaggctgaaactcaaaggaattgacggggcccgcacaaagc gtggagcatgtggtttaaattcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggtcttgacatcct ctgaaaaccctagagatagggcttctcctcgggagcagagtgacaggtggtgcatggt tgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgaacccttga tcttagttgccatcattaagttgggcaacttaaggtgactgccgggtgacaaaccggagg aaggtggggatgacgtcaaatcatcatgcccctcatgacctgggctacacacgtgctac aatggacggtacaaagagctgcaagaccgcgaggtggagctaatctcataaaaccggttc tcagttcggattgtaggctgcaactcgcctacatgaagctggaatcgctagtaatcgcg gatcagcatgccgcggtgaatacgttcccgggcttgtacacaccgcccgtcacaccac gagagtttgaacaccgcaagtcgggtgggtaaccttttggagccagccgcctaaggt gggacagatgattggggtgaagtcgtaacaaggtgaacc</p>
<p><i>Bacillus cereus 2</i></p>	<p>HM 2298</p>	<p>Agtgctagttgaaataagctggcaccttgacggtacctaaccagaaagccacggctaact acgtgccagcagacgcggtaatacgtaggtggcaagcgttatccggaattattgggctg aaagcgcgcgcaggtggttcttaagctcgtatgtgaaagcccacggctcaaccgtggag</p>

	03.1	ggtcattggaaactgggagacttgagtgacagaagaggaaagtggaaattccatgtgtagc ggtgaaatgctagagatatggaggaacaccagtgcccaaagcgacttctggctctgtaa ctgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccac gccgtaaacgatgagtgctaagtgtaaaggggttccgcccttttagtgctgaagttaac gcattaagcactccgctggggagtagcggccgcaaggctgaaactcaaaggaattgacg ggggcccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaaattcgaagcaacgcgaagaaccttac caggtcttgacatcctctgacaaccctagagatagggcttctcctcggggagcagagtg acaggtgggtgcatggttgtcgtcagctcgtgctgagatggtgggttaagtcccgcaa cgagcgaacccttgatcttagttgccatcatttagttgggactctaaggtgactgcc ggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaaatacatcatgcccttatgacctgg gctacacacgtgctac
<i>Bacillus pasteurii</i>	X60 631. 1	gagagtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcga ncgancaaggaagaaactnntntctncnntgttagcggcggatgggtgagtaaacagc gggcaacctgccctgcagttggggataactcgggaaaccgggctaataaccgaataat cagttccttcgcatgaaggaactctgaaagacggctatgctgtnactgcaggatngcc cgcgccgcnttagctngttggtaggtaanggctnaccaggcgcagatgctgtagccga cctgagagggtnatcggccacactgggactgagacacggccnagactcctacgggaggc agcagtagggaatctccacaatggacgaaagtctgatggagcnacgccgcgtgagcga agaaggttttcggatcgtnaagctctgttgtgaggaagaacnagtacaggagtnactg cctntnccttgacggtacctcattagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcg gtaatacgtaggtggcaagcgttgcgcggaattatggggcgtnaagcgcgcgcnggcgg ccttttaagctnatgtgaaagcccacggctnaaccgtggaaggtcattggaaactgga aggcttgagtacagaagaggaaagcggaaattccacgtgtagcggtgaaatgctgtagaga tgtggaggaacaccagtgccgaaggcggcttctggctctgtaactgacgctgaggcgcg aaagcatggggagcaaacaggattagataccctggtagtccatgccgtaaacgatgagt gctaagtgttaggggggttccgcccttagtgctngagcaaacgcattaagcctccgc ctggggagtagcngccgcaaggctnaaactcaaaggaattgacggggaccgcacnagcgg tggagcngtngtttaattcgaantacgcgaagaacctaccaggtcttgacntcccgc tgaccggtatagagatataccttctcggggacagcgggtgacngggtgngncctggttg tcgtcagctcgtgctgtagatgtgggtnaagctccgtaacgcagcgcnaaccctgacc ttagttgccagcattcagttgggactctaaggtactgcccgtgacaaaccggaggaa ggggggatgacgtnaaatcatcatgcccttatgacctnggctacacacgtgctacaa tggacggtacngaggggttgccaaccgcgagggggagctaataccataaaaccgttccc agttcggattgcaggctgcaactgcctgcatgaagcnggaatcgctagtaatcgtgga tcagcatgccacggatgaatacgttcccgggtctgtacacaccgcccgtcacaccacga gagttgtaaacacc
<i>Micrococcus lylae</i>	FN8 1346 1.1	Tagagtttgatccatggctcaggatgaacgctggcggcgtgcttaacacatgcaagtcg aacgatgaagctccagcttgctggagtgaaatagtgggcaacgggtgagtaaacacgtga gtaacctacccttgactctgggataagccttggaacgaggtctaataccggataggag cactcatcgcatggtgggtgttggaaagaatttcggtcttgatggactcgcggcctat cagcttgttggtaggtaaatggctcaccaaggcgcagcagggtagccggcctgagaggg tgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtgggg aataatgcaaatgggcgcaagcctgatgcagcgcgcccgcgtgagggatgacggcctt cgggttgtaaacctctttagtagggaagaagcgaagtgacggta
<i>Enterococcus faecium</i>	HM 4462 62.1	Ttatgacctgggctacacacgtgctacaatgggaagtacaacgagttgcaagtcgcga ggctaagctaatactcttaaagcttctctcagttcggattgcaggctgcaactcgcctgc atgaagccggaatcgctagtaatcgcgatcagcagccgcgggtgaatacgttcccggg ccttgtaacacaccgcccgtcacacacgagagtttgtaaacaccgaaagtcgggtgaggtaa ccttttgagaccagccgctaaggtgggatagatgattgggggtgaagtcgtaacaaggt agccgtatcggaaggtgcgggtggatcacctccna
<i>Bacillus circulans</i>	FR6 7141 9.1	Atagtgtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcg agcgcgggaagcaggcagatccctcgggggtgaaacctgggaacgagcggcggacggg tgagtaaacagctgggcaacctgcctgaaagtcgggataaaccgggaaaccggagcta ataccggatgggcccactgcagccctggctcagatggggaaaagcggggatcttctcgcg ctttcagatgggcccgcgcgcttagctggttgggtgggtaagagcctaccaaggcaa cgatgcgtagccgacctgagaggggtgatcgccacactgggactgagacacggcccaga ctcctacgggaggcagcagtagggaatcatccgcaatgggcgaaagcctgacggtgcaa cgccgcgtgagtgaaagaaggttttcggatcgtaaaagctctgttatccgagaagaacaag gaccgggtcgaagaggccgggtccatgacggtagcagatcagaagacctagacttccat taaagagagtttgatcctggctcaggacgaacgcnngggcggcgtgcctaatacatgcaag tcgaacgaatgacctangagcttgctccttgggtcgttagtgccggacgggtgagtaa

<p><i>L.murrayi</i></p>	<p>X56 154. 1</p>	<p>cacgtgggcaacctnctgtaagattgggataactccgggaaaccggagctaataaccga ataataatcactccgcatggagcaggtttgaaaggcggcttcggctgtcacttacagat gggcccgcggtgcattagctagttggtgggtaaaaggcctaccaaggcagcagatgcata gccgacctgagagggtnatcggccacactgggactgagacacggcccaggctcctacgg gaggcagcagtagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgcggtg tgtgaagaagggttttcggatcgtaaagcactgttgttagagaagaacaaggataagagt aactgcttgtcccttgacgggtatctaaccagaaagccacgggtaactacgtgccagcag ccccggtaatacgttaggtggcnagcgttgcgggaattattgggctnaagcgcgcgca ggcggtttcttaagtctnatgtgaaagccccggctgaaccgggnngggtcattggaaa ctgggagacttagagtgcagaagaggagagtggaaatccatgtgtagcgggtgaaatgcy tagatataatggaggaacaccagtgccgaaggcactctctggtctgtaactgacgctga ggcgcgaaagcgtgggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgcgcgtaaacg atgagtgctnagtgtaggggtttccgccccttagtgctgcagctaacgcattaagca ctccgcctggggagtagcaccgcaagggtgaaactcaaaggaattgacggggccgcac aagcgggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggcttgac atcctttgaccactctggagacagagctttccttcggggacaaagtgcaggtggmna tggtgtcgtcagctagtgctgtgagatgtgggtnaagtcccgcaacgagcgaaccc ttgatcttagttgccagcatttagttgggactctnaagtactgcccgggtgcaagccgg aggaaggtgggatgacgtcaaatcatcatgccccttatgacctgggtacacacgtgc tacaatggatgatacaaagggctcgcgaagccgcgaggtgnagctaataccataaaatta ttctcagttcggattgtaggctgcaactcgcctacatgaagccggaatcgctngtaac gcggatcagcatgccgcggtgaatacgttcccgggctnngtacacaccgcncgtcacac cacgagagttngtaacaccggaagtccgtagggtaacctttatggagccagctgccgaa ggtgggacagatnatgggg</p>
<p><i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i></p>	<p>HM 5816 56.1</p>	<p>tggctccaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagttgagcgtgaaggtt ggtacttgtaccgactggatgagcagcgaacgggtgagtaacgcgtggggaatctgcct ttgagcgggggacaacatttgaaacgaatgctaataccgcataacaactttaaacaca agttttaagttgaaagatgcaattgcatcactcaaagatgatcccgcgttgattagc tagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcagatgatacatagccgacctgagaggggtgat cggccacatggacgagacacgcc</p>
<p><i>Lactococcus lactis subsp. Cremoris</i></p>	<p>HM 5986 85.1</p>	<p>agtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagttgagcg ctgaaggttgggtgcttgaccaatttgatgagcagcgaacgggtgagtaacgcgtgggg aatctgcctttgagcgggggacaacatttgaaacgaatgctaataccgcataataact ttaaacataagttttaagtttgaaagatgcaattgcatcactcaaagatgatcccgcgt tgtattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcagatgatacatagccgacctga gaggggtgatcggccacattgggactgagacacggccaaactcctacgggaggcagcag tagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgaccgagcaacgccgcgtgagtgaagaag gttttcggatcgtaaaaactctgttggtagagaagaacgttggtagagtggaagctca tcaagtgcaggttaactaccagaaagggacgggtaactacgtgccagcaagccgcggta atacgtaggtcccagcgttgcggatttatgggctgaaagcagcgcaggtgggtt attaagtctggtgtaaaaggcagtggtcaaccattgtatgcattggaaactggtagac ttgagtgaggagaggagagtggaaatccatgtgtagcgggtgaaatgcgtagatataatg gaggaacaccgggtggcgaagcggctctctggcctgtaactgacactgaggctcgaag cgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgcgcgtaaacgatgagtgcta gatgtagggaaactataagttctctgtatcgcagctaacgcaataagcactccgcctggg gagtacgaccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacggggggccgcacaagcgggtgga gcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggctttgacataactcgtgc tattcctagagataggaagttccttcgggacacgggatacaggtggtgcatggttgcg tcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcacgagcgaacccctattgtta gttgccatcattaagttgggactctaacgagactgccggtgataaacggaggaaggt</p>

		<p>ggggatgacgtcaaatcatcatgccccttatgacctgggctacacacgtgctacaatgg atgggtacaacgagtcgcgagacagtgatggttagctaatactcttaaaaccattctcagt tcggattgtaggctgcaactcgcctacatgaagtcggaatcgctagtaatcgcggatca gcacgccgcggtgaatacgttcccggccttgtaacacccgcccgtcacaccacgggag ttgggagtagccgaagtaggtgcctaaccgcaaggagggcgcttccctaaggtaagacc gatgactggggtgaagtcgtaacaagtagccgtatcggaaggtgcccgtggatcacct cctt</p>
<i>Streptococcus adjacen</i>	HM 7760 56.1	<p>ggcggcgtgcctaataacatgcaagtagaacgctgaaggaagtgcttgcacttctggacg agttgcgaacgggtgagtaacgcgtaggtaacctgcctggtagcgggggataactattg gaaacgatagctaataaccgcataacaatggatattgcatgatatctattgaaagatgc aactgcatcactaccagatggacctgcgttgtattagctagtaggtgaggtaaaggctc acctaggcgacgatacatagccgacctgagaggggtaacggccacactgggactgagac acggcccagactcctacgggaggcagcagtagggaatcttcggcaatgggggcaaccct gaccgagcaacgccgctgagtgaaagaaggttttcggatcgtaaagctctgttgaaga gaagaacgggtatgagagtggaagttcactactgtgacggatcttaccagaaagggac ggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtaggtcccagcgttatccggattta ttgggcgtaaaagcagcgcagggcgttagataagtctgaagttaaaggctgtggcttaa ccatagtatgctttgaaaactgtttgacttgagtacagaaggggagagtggaattccat gtgtagcggtggaatgcgtagatataatggaggaacaccgggtggcgaagcggctctctg gtctgtaactgacgctgaggctcgaagcgtgggtagcgaacaggattagataaccctgg tagttcacgccgtaaacgatgagtgctaggtgtaggcccctatccggggcttagtgccg cagctaacgcattaaagcactccgcctgggagtagcaccgcaaggtgaaactcaaagg aattgacgggggcccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaaattgaagcaacgcgaag aaccttaccaggtcttgacatcccagtgaccgtcctagagatagggttttccttcggaa cactggtagcaggtgggtgcatggttgttgcagctcgtgctgagatgttgggttaag tcccgcaacgagcgaacccttatgttagttgccatcattaagttgggactctagcg agactgccgtaataaaaccggaggaaggtggggaagacgtcaaatcatcatgcccctta tgacctgggctacacacgtgctacaatggctggtaaacgagcggcaagtccggtgacgg caagcaaatcttttaaaaccagctcagttcggattgtaggctgcaacttgcctacaag aagttggaatcgctagtaaatcgcgatcagcccgcgggtgaatacgttcccgggct tgtacacaccgcccgtcacaccacgagagtttgaacaccgcaagtcgggtgaggtacct tttaggagccagccgcctaag</p>
<i>Bacillus megatherium</i>	HM 7490 36.1	<p>actcctacgggaggcagcagtagggaatcttcgcaatggacgaaagtcgacggagca acgccgcgtgagtgatgaaggttttcggatcgtaaagctctgttgttagggaagaaca gtaccggtcgaacagggcggtagccttgacggtagcctaaccagaaagccacgggtaacta cgtgccagcagccgcggtaataca</p>
<i>Bacillus sphaericus</i>	FR6 7141 9.1	<p>atagtggttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaataacatgcaagtgcg agcgcgggaagcagcagatcccttcggggtgaaacctgtggaacgagcggcggacggg tgagtaaacacgtgggcaacctgcctgaaagtcgggataaacccgggaaaccggagcta ataccggatgggcccacgaccgcctggtaggggaaagcggggatcttcctcgcg ctttcagatgggcccgcggcgcattagctgggtgggtgggtaagagcctaccaaggcaa cgatgcgtagccgacctgagaggggtgatcggccacactgggactgagacacggcccaga ctcctacgggaggcagcagtagggaatcatccgcaatgggcgaaagcctgacggtgcaa cgccgcgtgagtgaaagaaggttttcggatcgtaaagctctgttatccgagaagaacaag gaccggtcgaagaggccggttccatgacggtagcagatcagaagacctagacttccat</p>
<i>Staphylococcus aureus</i>	GU3 0234 8.50 6	<p>Aggtgatcctggctcaggatgaacgctggcggcgtgcctaataacatgcaagtcgagcga acagacgaggagcttgctcctctgacgttagcggcggacgggtgagtaaacgctggata acctacctataagactgggataacttcgggaaaccggagctaataaccggataataat tgaaccgcgatggttcaatagtgaaagacgggttttgctgtcacttatagatggatccgc gccgattagctagttggtaaggtaacggcttaccaaggcaacgatgcgtagccgacct gagaggggtgatcggccacactggaactgagacacggctccagactcctacgggaggcagc agtagggaatcttcgcaatgggcgaaagcctgacggagcaacgccgcgtgagtgatga</p>

		aggtcttcggatcgtaaaactctgttatttagggaagaacaaatgtgtaagtaactatgc acgtcttgacggtacctaatacagaaagccacggc
<i>Bacillus brevis</i>	GU0 4887 6.1	tgggactgagacttggcccagactcctacgggaggcaccagtagggaatcttcgcgaat ggacgaaagtctgacgagcaaccccgcgtgagtgatgaagggttttcggatcgtataga tctgttgttagggaagaacaagtgccgttcaaataggggcggcaccttgacggtaccta ccagaaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtaggtggcaagcgt tgtccggaattattgggctgaaagggctcgcagggcgggtttcttaagtctgatgtgaaag ccccggctcaaccggggagggtcattggaaactggggaacttgagtgcagaagaggag agtggaattccacgtgtagcgggtgaaatgctgtagagatgtggaggaacaccagtgccga aggcgactctctggctgtaactgacgctgaggagcgaagcgtggggagcgaacagga ttagataccctggtagtcacgcctgaaacgatgagtgttaagtgttagggggtttccg ccccttagtgctgcagctaacgcattaaagcactccgcctggggagtagcggctcgaagac tgaaactcaaaggaattgacggggcccgcaaacgggtggagcatgtgggttaattcga aagcaacgcgagaaccttacc a
<i>Proteus mirabilis</i>	HM 5853 75.1	gagtttgatcatggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgagc ggtaacaggagaaagcttgctttcttgctgacgagcggcggacgggtgagtaatgtatg gggatctgcccgatagagggggataactactggaaacgggtggctaataccgcataatgt ctacggaccaaaagcaggggctcttcggaccttgcaactatcggatgaaccatagggat tagctagtaggtgggtaaaggctcacctaggcgacgatctctagctggctctgagagga tgatcagccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtgggg aatattgcacaatggcgcaagcctgatgcagccatgccgcgtgatgaagaaggcctt agggttgtaaagtactttcagcggggaggaagggtgataagggttaatacccttatcaatt gacgttaccgcagaagaagcaccggctaactccgtgccagcagccgcggtaatacggg gggtgcaagcgttaatacgggaattactgggcgtaaacgcacgcagggcggtaattaagt cagatgtgaaagccccgagcttaacttgggaattgcatctgaaactgggtggctagagt cttgtagaggggggtagaattccatgtgtagcgggtgaaatgctgtagagatgtggaggaa taccgggtggcgaaggcggccccctggacaaagactggcgtcaggtgcaagcgtggg gagcaaacaggattagataccctggtagtcacgcgtgtaaacgatgtcgatttagaggt tgtggtcttgaaccgtggcttctggagctaacgcgttaaacgcagccctggggagtag ggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacggggcccgcaaacgggtggagcatgt ggtttaattcgatgcaacgcgaagaacctaactactcttgacatccagcgaactcctt agagatagagagtgcttccgggaacgctgagacagggtgctgcatggctgtcgtcagct cgtgttgtaaatgttgggttaagtcccgcaacgagcgaacccttatcctttgttgcc agcacgtaattggtgggaactcaaaggagactgccgggtgataaacgggaggaagggtggg atgacgtcaagtcatcatggcccttacgagtagggctacacacgtgctacaatggcaga tacaagagaagcgacctcgcgagagcaagcggaaactcataaagtctgtcgtagtccgg attggagtctgcaactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgtagatcagaat gctacggtgaatacgttcccggccttgtaacacaccgcccgtcacaccatgggagtggg ttgcaaaagaagtaggtagcttaaccttcgggagggcgcttaccactttgtgattcatg actggggtgaaagtcgtaacaaggtagccgt
<i>Neisseria meningitidis</i>	GU5 6141 6.1	ttttaacatgcaagtcggacggcagcacagagaagcttgcttcttgggtggcagtgcc gaacgggtgagtaacataatcggaaactaccgagtagtgggggataactgatcgaagat tagctaataccgcatacgtcttgagagggaaagcaggggaccttcgggcttgcgctat tcgagcggccgatctgattagctagttgggtggggtaaaggcctaccaaggcagcagat cagtagcgggtctgagaggatgatccgccacactgggactgagacacggcccagactcc tacgggaggcagcagtggggaattttggacaatgggcgcaagcctgatccagccatgcc gcgtgtctgaagaaggccttcgggttgtaaggacttttgtcagggagaagaaaggctgt tgctaataatcagcggctgatgacggtacctgaagaataagcaccggctaactacgtgcc agcagccgcggtaatacgtagggtgcgagcgttaatacggaaattactgggctaaagcga gcgcagacgggttacttaagcaggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcgtt ctgaaactgggtgactagagtggtcagagggaggtagaattccacgtgtagcagtgaaa tgcgtagagatgtggaggaataccgatggcgaaggcagcctcctgggataaactgacg ttcatgctcgaagcgtgggtagcaaacaggattagataccctggtagtccacgcctta aacgatgtcaattagctgttgggcaacttgattgttcagtagcgtagctaacgcgtgaa attgaccgcctggggagtagcggctcgaagatataaactcaaaggaattgacggggacc gcacaagcgggtggatgatgtggattaatcagatgcaacgcgaagaaccttacctggctc tgacatgtacggaatcctccagagacggaggatgccttcgggaaccgtaaacacagggtg ctgcatggctgtcgtcagctcgtgctgtagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgc aaccttgtcattagttgccatcattcagttgggcactctaatagactgccggtgaca agccggaggaagggtgggatgacgtcaagtcctcatggcccttatgaccagggcttcac acgtcatacaaatggtcggtagcagagggtagccaagccgcgaggtggagccaatctcaca

		aaaccgatcgtagtcggattgcaactctgcaactcgagtgcatgaagtcggaatcgctagtaatcgcaggtcagcactgctgctggaatacgttcccgggtcttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtggggataaccagaagtaggtaggataaccgcaaggggtccgctaccacggtagctc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HM 7525 79.1	atgggaagagggcggccaagtctaacacattgcaagtcgagcggatgaagggagcttgctcctggattcagcggcggacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctggtagtgggggat aacgtccggaaacgggcgctaataaccgcatacgtcctgagggagaaagtgggggatcctcggacctcacgctatcagatgagcctaggtcggattagctagttggtaggggtaaaaggcc taccaaggcgacgatccgtaactggctgagaggatgatcagtcacactggaactgagacacgggtccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgaaagcc tgatccagccatgcccgtgtgtgaagaaggtcttcggattgtaaacgactttaagttggaggaagggcagtaagtaataccttgctgttttgacgttaccacagaataagcacc ggctaacttcgtgccagcagccggttaatacgaaggggtgcaagcgttaactcggaaatta ctgggcgtaaaagcgcgctaggtgggtcagcaagttggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcatccaaaactactgagctagagtacggtagaggggtggggaatttcctgtgtagcgggtgaaatgctgtagatataaggaaggaacaccagtgggcgaagggcgaccacct ggactgatactgacactgaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtcacgcccgtaaacgatgtcactagccgttgggatccttgagatcttagtgggcg cagctaacgagataagtcgaccgctggggagtagcggccgcaaggttaaaactcaaatg aattgacggggcccgcacaagcgggtggagcatgtgggttaattcgaagcaacgcgaag aaccttacctggccttgacatgctgagaactttccagagatggattgggtgccttcggga actcagacacaggtgcgcatggctgtcgtcagctcgtgctgagatgttgggttaagt cccgtaacgagcgaacccttgtccttagttaccagcactcgggtgggactcctaagg agactgccgggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcacatggccctta cggccagggctacacacgtgctacaatggcgggtacaaaggggttgccaagccgcgaggt ggagctaatcccataaaaccgatcgtagtcgggatcgcagctcgaactcgaactcgcgtg aagtcggaatcgctagtaatcgtgaatcagaatgtcacgggtgaatacgttcccgggctt gtagacacaccgcccgtcacaccatgggagtggggtgctccagaagtagctagctaac cgaagggggacggtaccacgaattattacca
<i>Serratia marcescens</i>	HM 5908 92.1	agagtttgatcatggctcagcttgaaacgctggcggcaggcttaacacatgcaagtcgag cggtagcacaggggagcttgctccctgggtgacgagcggcggacgggtgagtaatgtct gggaaactgctgatggagggggataactactggaaacggtagctaataaccgcataacg tcgcaagaccaaagagggggaccttcgggctccttgccatcagatgtgccagatggga ttagctagtaggtgggtaatggctcacctaggcgacgatccctagctggctcagaggg atgacagccacactggaactgagacacgggtccagactcctacgggaggcagcagtgggg aatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccatgccgctgtgtgaagaaggcctt cgggttgtaaaagcactttcagcagaggaggtaggtgggtgaacttaatacgttcatcaatt gacgttactcgcagaagaagcaccggctaactccgtgccagcagccgcggtaatacggga ggggtgcaagcgttaactcggaaatctgggctaaagcgcacgcagggcgggttggtaagt cagatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcatttgaaactggcaagctagagt ctcgtagagggggtagaattccaggtgtagcgggtgaaatgctgtagagatctggaggaa tacgggtggcgaagggcggccccctggacgaagactgacgctcaggtgcaaaagcgtggg gagcaaacaggattagataccctggtagtccacgctgtaaacgatgtcgatttggaggt tgtgcccttgaggcgtggcttccggagctaacgcgttaaatcgaccgctggggagtagc ggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacggggcccgcacaagcgggtggagcatgt ggttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctcttgacatccagagaactttcc agagatggattgggtgccttcgggaactctgagacaggtgctgcatggctgctcgtcagct cgtgtgtgaaatgttgggttaagtcccgcacgagcgaacccttatccttgggtgccc agcggttcggccgggaaactcaaaggagactgccagtgacaaactggaggaaggtgggga tgacgtcaagtcacatggcccttacgagtagggctacacacgtgctacaatggcatat acaaagagaagcgacctcggagagcaagcggacctcataaagtagtgcgtagtcgggat tggagctgcaactcgaactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgtagatcagaatgc tacgggtgaatacgttcccgggcttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtggggtt gcaaaagaagtaggtagcttaaccttcgggagggcgcttaccacttggtagttcatgac tggggtagaagtcgtaacaaggtaacctgtaggggaacctgcccgtggatcacctcctt
		ggtagtagcgggtgaaatgctgtagagatctggaggaaataccgggtggcgaagggcggccccct ggacgaagactgacgctcaggtgcaaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctg gtagtccacgctgtaaacgatgtcgatttggaggttgtgcccttgaggcgtggcttccg gagctaacgcgttaaatcgaccgctggggagtagcggccgcaaggttaaaactcaaatg aattgacggggcccgcacaagcgggtggagcatgtgggttaattcgatgcaacgcgaag aaccttacctactcttgacatccagagaactttccagagatggattgggtgccttcggga

<p><i>Serratia biogroupe 1</i></p>	<p>GU8 2611 8.1</p>	<p>actctgagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtggttgtaaagtgtgggttaag tcccgaacgagcgcaacccttatcctttgttgccagcgggttcggccgggaactcaaag gagactgccagtgataaactggaggaaggtggggatgacgtcaagtcacatggccctt acgagtgggtctacacacgtgctacaatggcgtatacaaagagaagcgacctcgcgaga gcaagcggacctcataaagtacgtcgtagtcggattggagctgcaactcgactccat gaagtcggaatcgctagtaatcgtagatcagaatgctacgggtgaatacgttcccggg ttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtggggttgcaaaagaagtaggtagcttaac cttcgggagggcgcttaccactttgtgattcatga</p>
<p><i>Serratia polymuthica</i></p>	<p>HM 5964 29.1</p>	<p>caggcctaacacatgcaagtcgagcggtagcacargagagcttgctctctgggtgacga gcggcggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctgatggagggggataactactgga aacggtagctaataccgcataacgtctacggaccaaaagtgggggaccttcgggcctcac gcatcagatgtgccagatgggattagctagtaggtggggtaatggctcacctaggcg acgatccctagctggtctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacgggtccag actcctacgggagcagcagtggggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagcc atgccgcgtgtgtgaagaaggccttaggggtgtaaaagcactttcagcgaggaggaaggg ttcagtgtaatagcactgtrcattgacgttactcgcagaagaagcaccgggtaactcc gtgccagcagccgcggttaatacggaggggtgcaagcgttaactcggaaactactgggctaa agcgcacgcaggcggtttgttaagttagatgtgaaatccccgcgcttaactgggaaact gcatttgaaactggcaagctagagctctgttagaggggggtagaattccagggtgtagcgg tgaaatgcgtagagatctggaggaataccgggtggcgaaggcggccccctggacaaagac tgacgctcaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacg ctgtaaacgatgtcgatttgagggttggtcccttgaggcgtggcttcgggagctaacgc gttaaactcgaccgctggggagtagcggccgcaagggttaaaactcaaatgaattgacggg ggccccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaaattcgatgcaacgcgaagaaccttacct actcttgacatccagagaactttccagagatggattgggtgcttcgggaaactctgagac aggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtggttgtaaagtgtgggttaagtcccgaacg agcgaacccttatcctttgttgccagcgattcgggtcgggaaactcaaaggagactgccg gtgataaacggaggaaggtggggatgacgtcaagtcacatggcccttacgagttaggg ctacacacgtgctacaatggcgtatacaaagagaagcgaactcgcgagagcaagcggac ctcataaagtacgtcgtagtcggattggagtcgactcgcactcgcactcctgaagtcggaa tcgctagtaatcgtagatcagaatgctacgggtgaatacgttcccgggcttgtagacac cgcccgtcacaccatgggagtggggttgcaaaagaagtaggtagcttaaccttcgggagg gcgcttaccactttgtgattcatgactgggggtgaagtcgtaaca</p>
<p><i>Serratia liquefaciens</i></p>	<p>HM 7564 89.1</p>	<p>tgggaaactgcctgatggagggggataactactggaaacggtagctaataaccgcataac tagatggctgctctacggaccaaaagtgggggaccttcgggcctcatgccatcagatgt gccagatgggattagctagtaggtggggtaatggctcacctaggcgacgatccctagc tggtctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacgggtccagactcctacggga ggcttagttggggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccatgccgcgtgtg tgaagaaggccttcgggttgtaaaagcactttcagcgaggaggaaggggttctgtgtaat agcactgtgcattgacgttactcgcagaagaagcaccgggtaactccgtgccagcagcc gcggtaatacggaggggtgcaagcgttaactcggaaactactgggctaaagcgcacgcagg cggtttgtaagttagatgtgaaatccccgcgcttaactgggaaactgcatttgaaact ggcaagctagagctctgtagaggggggtagaattccagggtgtagcgggtgaaatgcgtag ggatctggaggaataaccgggtggcgaaggcggccccctggacaaagactgacgctcaggt gcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccccgctgtaaacgatg tcgacttgagggttggtcccttgaggcgtggcttcgggagctaacgcgttaagtgcacc gcctggggagtagcggccgcaagggttaaaactcaaatgaattgacgggggccccgcacaag cgggtggagcatgtggtttaaattcgatgcaacgcgaagaaccagtagctactcctgacat ccagagaattcgctagagatagcttggtccttcgggaaactctgagacaggtgctgcatg gctgtcgtcagctcgtgttgtaaagtgtgggttaagtcccgaacgagcgaaccctt atcctttgttgccagcgcgtaatgggtgggaaactcaaaggagactgcccgggtgataaacg gaggaaggtggggatgacgtcttagtcacatggcccttacgagttagggctacacacgg ctacaatggcgtatacaaagagaagcgaactcgcgagagcaagcggacctcataaagta cgtcgtagtcggatcggagctgcaactcgcactccgtttagtcggaatcgctagtaat cgtagatcagaatgctacgggtgaatacgttcaatgccgggcttgtagacacaatg</p>
	<p>:</p>	<p>gagagcttgctcttttaataacttagtggcgcacgggtgagtaatgtatagttaatctgc cctacactggaggacaacagttagaaatgactgctaataactccatactccttcttaaca taagttaaagtcgggaaagttttcgggtgtaggatgagactatattgtatcagctagttg gtaaggtaatggccttaccaggccttgacgcataactggctgtagaggatgatcagtc cactggaaactgagacacgggtccagactcctacgggagggcagcagtagggaaatattgctc aatgggggaaaccctgaagcagcaacgcgcggtggaggatgacacttttcggagcgtaa</p>

<p><i>Campylobacter fetus</i></p>	<p>GQ 1676 74.1</p>	<p>actccttttgttagggaagaacatgacggtagcctaacgaataagcaccggctaactcc gtgccagcagccgcgtaatacggaggggtgcaagcgttactcggatcactgggcgtaa aggacgcgtaggcgattatcaagcttttgtgaaatctaacagcttaactgttaaact gcttgagaaactgataatctagagtgagggagaggcagatggaattgggtgggtgtagggg taaaatccgtagagatcaccaggaataccattgCGAAGGCGATCTGCTGGAACCAAC tgacgctaatacgctgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacg ccctaaacgatgtatactagtgtgtgctgtgctagtacggcagtaatgcacctaacgg attaagtataccgcctggggagtacggctcgcaagattaaaactcaaaggaatagacggg gacccgcacaagcggtaggagcatgtgggttaattcgaagatacgcgaagaaccttacct gggcttgataatccaactaatctcttagagataagagagtgctagcttgctagaaagttg agacaggtgctgcacggctgtcgtcagctcgtgctgagatggtgggttaagtcccgc aacgagcgcacaaccacgtatttagttgctaacagttcggctgagcactctaaatagact gccttcgcaaggagggaaggtgtggacgacgtcaagtcatcatggcccttatgccca gggacacacgctgctacaatggcatatacaatgagatgcaaatcgcgagatggagca aatctataaaaatgtcccagttcggattggagtctgcaactcgactccatgaagccgg aatcgctagtaatcgtagatcagccatgctacggtagaacgttcccgggtcttgact caccgcccgtcacaccatgggagttgatttcaactcgaagtcggaatgctaaactagcta ccgccacagtggaatcagcagctgggggtgaagtcgtaacaaggtaaccttaggagaac ctgcggttgatcacctcct</p>
<p><i>Klebsiella oxytoca</i></p>	<p>HM 7564 96.1</p>	<p>ctgatggagggggaattctaactactggaaacggtagctaataaccgcattgattcgtaa acgtcgcgaagaccaaagagggggaccttcgggcctcttgccatcagatgtgccagatg ggattagctagtaggtgggtaacggctcacctagattcggatccctagctggctgag aggatgaccagccacactggaactgagacacggctccagactcctacgggaggcagcagt ggggaggctagcacaatggcgcaagcctgatgcagccatgccgcgtgtatgaagaagg ccttcgggttgtaaaagtactttcagcggggaggaaggggataaggttaataacctgtc cattgacgttaccgcgagaagaagcaccggctaactccgtgccagcagccgcggtaata cggaggggtgcaagcgttaatcgaattactgggcgtaaaagcgcacgcagggcgtctgtc aagtcggatgtgaaatccccgggatcgcctgggaactgcattcgaaactggcaggctg gagctctgtagagggggtagaattccaggtgtagcggtagaatgcgtagagatctgga ggaataaccggtggcgaaggcggccccctggacaaagactgacgctcaggtgcaagcgc tggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgctgtaaacgatgtcgacttgg aggttgttccctgaggagtggcttccggagctaacgcgttaagtgcaccgcctgggga gtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacggatgctcgcacaagcgggtggagc atgtggttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatccagagaact tagcagagatgctttgggtgccttcgggaactctgagacagggtgctgcatggctgtcgtc agctcgtgttgtaaatgttgggttaagtcccgcacagcgcgaaccttatcctttgt tgccagcgattcggccgggaactcaaaggagactgcatgctgtaaaactggaggaaggtg gggatgacgtcaagtcatcatggcccttacgagtagggctacacacgtgctacaatggc atatacaaaagagaagcgacctcgcgagagctgaaagcggacctcataaagtatgtcgta gtatgctttggagtctgcaactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgtggat catgctggctgccacggt</p>
<p><i>Salmonella ser. Paratyphi</i></p>	<p>HM 6357 65.1</p>	<p>ggggataactactgaaacggtaggctaataaccgcataacgtcgcgaagaccaaaggggg gaccttcgggcctcttgccatcagatgtgccagatgggattagcttgggtgaggtta acggctcaccaaggcagcagatccctagctggctgagaggatgaccagccacactggaa ctgagacacggctccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcg caagcctgatgcagccatgccgcgtgt</p>
<p><i>Salmonella ser. Pollurum</i></p>	<p>AY3 7382 9.2</p>	<p>gggatctgcatgatggagggggataactactgaaacggtagcctaataaccgcataacg tcgcaagaccaaagagggggaccttcgggcctcttgccatcagatgaaccagatggga ttagctagtaggtgggtaacggctcacctaggcagcagatccctagctggctgagagg atgaccagccacactggaactgagacacggctccagactcctacgggaggcagcagtggg gaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccatgccgcgtgtatgaagaaggcct</p>

		<p>t c g g g t t g t a a g t a c t t t c a g c g g g g a g g a a g g g g a a g t g g t t a a t a a c c a c t t t c a t t g a c g t t a c c c g c a g a a g a g c a c c g g g t a a c t c c g t g c c a g c a g c c g c g g t a a t a c g g a g g g t g c a a g c g t t a a t c g g a a t t a c t g g g c g t a a a g c g c a c g c a g g c g g t c t g t c a a g t c g g a t g t g a a a t c c c c g g g c t c a a c c t g g g a a c t g c a t c c g a a a c t g g c a g g c t t g a g t c t t g t a g a g g g g g t a g a a t t c c a g g t g t a g c g g t g a a a t g c g t a g a g a t c t g g a g g a a t a c c g g t g g c g a a g g c g g c c c c t g g a c a a g a c t g a c g c t c a g g t g c g a a a g c g t g g g g a g c a a a c a g g a t t a g a t a c c c t g g t a g t c c a c g c c g t a a a c g a t g t c g a c t t g g a g g t t g t g c c c t t g a g g c g t g g c t t c c g g a g c t a a c g c g t t a a g t c g a c c g c c t g g g g a g t a c g g c c g c a a g g t t a a a a c t c a a a t g a a t t g a c g g g g g c c c g c a c a a g c g g t g g a g c a t g t g g t t a a t t c g a t g c a a c g c g a a g a a c c t t a c c t g g t c t t g a c a t c c a c a g a a t t t c g c a g a g a t g c g g a a g t g c c t t c g g g a a c t g t g a g a c a g g t g c a t g c a t g t g t c g t c a g c t c g t g t t g t g a a a t g t t g g t t a a g t c c c g c a a c g a c g g c a a c c c t t a t c c t t t g t t g c c a g c g g t t a g g c c g g a a c t c a a a g g a g a c t g c c a g t g a t a a a c t g g a g g a a g g t g g g g a t g a c g t c a a g t c a t c a t g g c c t t a c g a c c a g g g t a c a c a c g t g c t a c a a t g g c g c a t a c a a g a g a a g c g a c c t c g c g a g a g c a a g c g g a c c t c a t a a a g t g c g t c g t a g t c c g g a t t g g a g t c t g c a a c t c g a c t c c a t g a a g t c g g a a t c g t a g t a a t c g t g g a t c a g a a t g c c a c g g t g a a t a c g t t c c c g g g c c t t g t a c a c a c c g c c c g t c a c a c c a t g g g a g t g g g t t g c a a a g a a g t a g g t a g c t a a c c t t c g g g a g g g c g t t a c c a c t t t g t g a t t c a t g a c t g g g</p>
<p><i>Edwardsiella tarda</i></p>	<p>HM 2226 43.1</p>	<p>t g c a a g t c g a g c g g t a g c a g g g a g a a a g c t t g c t t t c t c c g c t g a c g a g c g g c g g a c g g g t g a g t a a t g t c t g g g g a t c t g c c t g a t g g a g g g g g a a a c t a c t g g a a a c g g t a g c t a a t a c c g c a t a a c g t c g c a a g a c c a a a g t g g g g g a c c t t c g g g c c t c a t g c c a t c a g a t g a a c c a g a t g g g a t t a g c t a g t a g g t g g g g t a a t g g c t c a c c t a g g c g a c a t c c c t a g c t g g t c t g a g a g g a t g a c c a g c c a c a c t g g a a c t g a g a c a c g g t c c a g a c t c c t a c g g g a g g c a g c a g t g g g g a a t a t t g c a c a a t g g g c g c a a g c c t g a t g c a g c c a t g c c g c g t g t a t g a a g a a g g c c t t c g g g t t g t a a a g t a c t t t c a g t a g g g a g g a a g g t g t g a a c g t t a a t a g c g t t c a c a a t g a c g t t a c c t a c a g a a g a g c a c c g g t a a c t c c g t g c c a g c a g c c g c g g t a a t a c g g a g g g t g c a a g c g t t a a t c g g a a t t a c t g g c g t a a a g c g c a c g c a g g c g g t t t g t t a a g t t g g a t g t g a a a t c c c c g g g c t t a a c c t g g g a a c t g c a t c c a a g a c t g g c a a g t a g a g t c t c g t a g a g g a g g t a g a a t t c c a g g t g t a g c g g t g a a a t g c g t a g a g a t c t g g a g g a a t a c c g g t g g c g a a g g c g g c c t c c t g g a c g a a g a c t g a c g t c a g g t g c g a a a g c g t g g g g a g c a a a c a g g a t t a g a t a c c c t g g t a g t c c a c g c t g t a a a c g a t g t c g a t t t g g a g g t g t g c c c t t g a g g c g t g g c t t c c g a a g c t a a c g c g t t a a a t c g a c c g c c t g g g g a g t a c g g c c g c a a g g t t a a a c t c a a a t g a a t t g a c g g g g g c c c g c a c a a g c g g t g g a g c a t g t g g t t t a a t t c g a t g c a a c g c g a a g a a c c t t a c c t a c t c t t g a c a t c c a g c g a a t c c t g t a g a g a t a c g g g a g t g c c t t c g g g a a c g c t g a g a c a g g t g c t g c a t g g c t g t c g t c a g c t c g t g t t g t g a a a t g t t g g g t t a a g t c c c g c a a c a g a g c g c a a c c c t t a t c c t t t g t t g c c a g c g g t t c g g c c g g g a a c t c a a a g g a g a c t c c a a g t a a a c t g g a g g a a g t g g g g a t g a c g t c a a g t c a t c a g c c t t a c g a t t a c g a g t a c a c a c g t a c a c a g t g c t a c a a t g g c g t a t a c a a g a g a a g c g a c c t c g c g a g a g c a a g c g g a c c t c a t a a a g t a c g t c g t a g t c c g g a t t g g a g t c t g c a a c t c g a c t c c a t g a a g t c g g a a t c g t a g t a a t c g t g g a t c a g a a t g c c a c g g t g a a t a c g t t c c c g g g c c t t g t a c a c a c c g c c c g t c a c a c c a t g g g a g t g g g t t g c a a a g a a g t a g g t a g c t t a a c c t t c g g g a g g g c g c t t a c c a c t t t g t g a t t c a t g a c t g g g g g a a g t c</p>
<p><i>Aeromonas hydrophila G2</i></p>	<p>GU2 0496 5.1</p>	<p>a g t t t g a t c c t g g c t c a g a t t g a a c g c t g g c g g c a g g c c t a a c a c a t g c a a g t c g a g c g g c a g c g g g a a a g t a g c t t g c t a c t t t t g c c g g c g a g c g g c g g a c g g g t g a g t a a t g c c t g g g a a a t t g c c c a g t c g a g g g g g a t a a c a g t t g g a a a c g a c t g c t a a t a c c g c a t a c g c c c t a c g g g g g a a a g c a g g g g a c c t t c g g g c c t t g c g c a t t g g a t t g c c a g g t g g g g a t t a g c t a g t t g g t a g g t a a t g g c t c a c c a a g g c a g a c a t c c c t a g c t g g t c g t g a g a g g a t g a t c a g c c a c a c y g a a c t g a g a c a c g g t c c a g a c t c c t a c g g g a g g c a g c a g t g g g g a a t a t t g c a c a a t g g g g g a a a c c c t g a t g c a g c c a t g c c g c g t g t g t g a a g a a g g c c t t c g g g t t g t a a a g c a c t t t c a g c g a g g a g g a a a g g t t g a t g c c t a a t a c g t a t c a a c t g t g a c g t t a c t c g c a g a a g a a g c a c c g g c t a a c t c c g t g c c a g c a g c c g c g g t a a t a c g g a g g g t g c a a g c g t t a a t c g g a a t t a c t g g g c g t a a a g c g c a c g c a g g c g g t t g g a t a a g t t a g a t g t g a a a g c c c g g g c t c a a c c t g g g a a t t g c a t t t a a a a c t g t c c a g c t a g a g t c t t g t a g a n g g g g g t a g a a t t c c a g g t g t a g c g g t g a a a t g c g t a g a g a t c t g g a g g a a t a c c g g t g g c g a a g g c g g c c c c t g g a c a a g a c t g a c g c t c a g g t g c g a a a g c g t g g g g a g c a a a c a g g a t t a g a t a c c c t g g t a g t c c a c g c c g t a a a c g a t g t c g a t t t g g a g g c t g t g t c c t t g a g a c g t g g c t t c c g g a g c t a a c g c g t t a a a t c g a c c n c c t g g g g a g t</p>
		<p>c g g c a g g c c t a a c a c a t g c a a g t c g a a c g g t a g c a c a g a g a g c t t g c t c t t g g g t g a c g a g t g g c g g a c g g g t g a g t a a t g t c t g g g a a a c t g c c c g a t g g a g g g g g a t a a c t a c t g g a a a c g g t a g c t a a t a c c g c a t a a c g t c g c a a g a c c a a a g t g g g g g a c c t t c g g g c c t c a c a c c a t c g g a t g t g c c c a g a t g g g a t t a g c t a g t a g g t g g g g t a a t g g c t c a c c t a g g c g a c g a t c c c t a g c t g g t c t g a g a g g a t g a c c a g c c a c a c t g g a a c t g a g a c a c g g t c c a g a c t c c t a c g g g a g g c a g c a g t g g g g a a t a t t g c a c a a t g g g c g c a a g c c t g a t g c a g c c a t g c c g c g t g a t g a a g a a g g c c t t c g g g t t g t a a a g t a c t t t c a g c g a g g a g g a a g g</p>

<p><i>Enterobacter intermedius</i></p>	<p>AF3 1021 7.1</p>	<p>cattgtggttaataaccgcagtgattgacgttactcgcagaagaagcaccggctaactc cgtgccagcagccgcgtaatacggaggggtgcaagcgttaatcgggaattactgggcgta aagcgcacgcagggcgtctgtcaagtcggatgtgaaatccccgggctcaacctgggaac tgcattcgaaactggcaggctagagtcctgttagagggggtagaattccaggtgtagcg gtgaaatgcgtagagatctggaggaataccggtggcgaaggcggccccctggacaaaga ctgacgctcaggtgcaaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccac gccgtaaacgatgtcgacttggaggttgtgcccttgaggcgtggcttccggagctaacg cgttaagtcgaccgcctggggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgg gggcccgcaaacggcgtggagcatgtggtttaaattcgatgcaacgcgaagaaccttacc tactcttgacatccagagaacttagcagagatgcttgggtgcctcgggaactctgaga caggtgctgcatggctgctcgtcagctcgtgtgtaaatgttgggttaagtcccgcgcaac gagcgcgaacccttatccttgggtgcccagcgggtcggccgggaactcaaaggagactgcc agtgataaatggaggaaggtggggatgacgtcaagtcacatggcccttacgagtaggg ctacacacgtgctacaatggcataatacaagagaagcgacctcgcgagagcaagcggac ctcataaagtatgtcgtagtcggatcggagctgcaactcgactccgtgaagtcggaa tcgctagtaatcgtagatcagaatgctacgggtgaatacgttccccgggcttgtacacac cgcccgtcacaccatgggagtggggtgcaaaagaagtaggtagcttaacctcggggagg gcgcttaccactttgaaattcatgactgtgaaatgt</p>
<p><i>Chromobacterium violaceum</i></p>	<p>GU3 0014 6.1</p>	<p>cgttatacagcagccgatgtctgatttagctagttgggtgaggtaaaagctcaccaaggc gacgatcagtcgggtctgagaggatgatccgccacactgggactgagacacggcccag actcctacgggaggcagcagtggggaattttgacaatgggggcaaccctgatccagcc atgcccgctgtctgaagaaggcctcgggttgtaaggacttttgtcngggagnaatac ccgctgggttaataaccnnggggatgacagtacnngaagaataagcaccggctaactac gtgccagcagccgcggttaatacgtagggtgcnagcgttaatcgggaattactgggcgtaa agcgtgcgcaaggcgggtgtgcaagtcctgatgtgaaagccccgggcttaacctggnaa tggagcatgtggtttaaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatccag agaacttagcagagatgcttgggtgcctcgggaactctgagacaggtgctgcatggct gtcgtcagctcgtgttgtaaaaatgttgggttaagtcccgcgaacgagcgaacccttat ccttgggtgcccagcaggttaggcccgggaactcaaaggagactgacagtgataaactgga ggaaggtggggatgacgtcaagtcacatgccccttacgagtagggctacacacgctgct acaatggcatatacaaaagagaagcgacctcgcgagagcaagcggacctcatacagtatg tcgtagctccggattggagtcgcaacctcgactccatgaagtcggaatccctcgtaat cgtggatcgaatgcaggtgaatacgttccccgggcttgtacacaaccgcccgttaa</p>
<p><i>Citrobacter freundii</i></p>	<p>HM 6400 09.1</p>	<p>tggagcatgtggtttaaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatccag agaacttagcagagatgcttgggtgcctcgggaactctgagacaggtgctgcatggct gtcgtcagctcgtgttgtaaaaatgttgggttaagtcccgcgaacgagcgaacccttat ccttgggtgcccagcaggttaggcccgggaactcaaaggagactgacagtgataaactgga ggaaggtggggatgacgtcaagtcacatgccccttacgagtagggctacacacgctgct acaatggcatatacaaaagagaagcgacctcgcgagagcaagcggacctcatacagtatg tcgtagctccggattggagtcgcaacctcgactccatgaagtcggaatccctcgtaat cgtggatcgaatgcaggtgaatacgttccccgggcttgtacacaaccgcccgttaa</p>
<p><i>Escherichia coli 02</i></p>	<p>GU9 4789 5/10 89</p>	<p>ttactactgggaatattgcacaatggggcgcaagcctgatgagccatgccgcgt gtatgaagaaggccttcgggttgtaaaagtactttcagcggggaggaagggagta aagttaataacctttgctcattgacgttaccgcgagaagaagcaccggctaactc cgtgccagcagccgcgtaatacggaggggtgcaagcgttaatcgggaattactgg gcgtaaaagcgcacgcagggcgttgggttaagtcagatgtgaaatccccgggctca acctgggaactgcatctgatactggcaagcttgagtcctcgtagaggggggtaga attccaggtgtagcgggtgaaatgcgtagagatctggaggaataccggtggcgaa ggcggccccctggacgaagactgacgctcaggtgcaaaagcgtggggagcaaac aggattagataccctggtagtccacgcctgaaacgatgtcgacttggaggttgt gcccttgaggcgtggcttccggagctaacgcgttaagtcgaccgcctggggagt acggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacggggcccgcaaacgaggtgg agcatgtggtttaaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctggctctgacatcc acggaagttttcagagatgagaatgtgccttccgggaaccgtgagacaggtgctg catggctgtcgtcagctcgtgttgtaaaatgttgggttaagtcccgcgaacgagc gcaacccttatccttgggtgcccagcgggtccggccgggaactcaaaggagactgc cagtgataaactggaggaaggtggggatgacgtcaagtcacatggcccttacg accagggctacacacgtgctacaatggcgcatacaaaagagaagcgacctcgcga gagcaagcggacctcataaagtgcgtcgtagtcggatggagctgcaactcg actccatgaagtcggaatcgtagtaatcgtggatcagaatgccacgggtgaata cgttccccgggcttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtggggtgcaaaa gaagtaggt</p>

RESUME

Durant cette étude, la présence de *Listeria spp.* a été investiguée dans **50** échantillons de laits crus de deux wilayas : SKIKDA et TEBESSA. *Listeria spp.* ont été isolées après un enrichissement à froid puis identifiées par des méthodes classiques basées sur les caractères morpho-physio-biochimiques. Les *Listeria spp.* ont été retrouvées dans **2 cas / 22** échantillons à TEBESSA et **1 cas / 28** échantillons à SKIKDA. Une étude d'interaction phylogénétique de **42** souches isolées a été réalisée sur le logiciel **MEGA4.0** par les deux méthodes UPGMA et NJ. Les résultats présentés dans cette étude montrent, le risque potentiel de consommation de lait cru non pasteurisé, et démontrent une interrelation entre *Listeria* et la flore bactérienne isolée de la même niche écologique et la grande complexité à trancher pour une phylogénie définitive.

Mots clés : Lait cru, *Listeria spp.*, Phylogénie.

ملخص

في هذه الدراسة تم تحليل 50 عينة من الحليب الطازج للكشف عن وجود لستيريا في ولاياتي : تبسة وسكيكدة. تم عزل لستيريا بعد تخصيب في البرودة والتي كشفت بالأساليب التقليدية القائمة على الخصائص المورفو- فيزيو- بيوكيميائية. تم العثور عليها في 2 / 22 من عينات ولاية تبسة و 1 / 28 من عينات ولاية سكيكدة. تم تنفيذ دراسة النشوء والتطور ل 42 سلالة بكتيرية معزولة في البرمجيات MEGA4.0 بالأساليب UPGMA و NJ.

النتائج الواردة في هذه الدراسة, تظهر خطر استهلاك الحليب الطازج الغير مبستر للمستهلك ، وإثبات علاقة متبادلة بين لستيريا و البكتيرية المعزولة من نفس المكان الإيكولوجي وصعوبة تحديد نسالة نهائية.

مفتاح الكلمات: الحليب الطازج, لستيريا, نسالة

ABSTRACT

In this study, *Listeria spp.* was investigated in **50** samples of raw milk collected in two wilayas: SKIKDA and TEBESSA. *Listeria spp.* was isolated after cold enrichment and identified by conventional methods based on morpho-physio-biochemical tests. *Listeria spp.* was found in **2 / 22** samples in TEBESSA and **1 / 28** samples in SKIKDA. A phylogenetic study of interaction of **42** isolates was performed on the software MEGA4.0 by both UPGMA and NJ methods. The results presented in this study indicate the potential risk for consumption of raw unpasteurized milk, and demonstrate an interrelationship between *Listeria* and the bacterial flora isolated from the same ecological niche and the big difficulty to determine a definitive phylogeny.

Key- words: raw milk, *Listeria spp.*, phylogeny.