

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

## THESE

Ecole doctorale Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Présentée et soutenue publiquement le

16 décembre 2005

par

**Laurent GUILLIER**

# **Variabilité des temps de latence cellulaires de *Listeria monocytogenes* en fonction des stress subis et des conditions de re-croissance**

## Jury

M. L. Rosso	Directeur du LERQAP - AFSSA Maisons-Alfort	Rapporteur
M. M. Zwietering	Professeur - Université de Wageningen (Pays-Bas)	Rapporteur
M. P. Pardon	Directeur de recherches - INRA	Directeur de thèse
M. J.-C. Augustin	Maître de conférences - ENVA	Co-directeur de thèse
M. F. Carlin	Directeur de recherches - INRA	Examinateur
M. J.-P. Guyonnet	Directeur adjoint - Arilait Recherches	Examinateur
M. J. Pourquié	Professeur - INA Paris Grignon	Examinateur



## Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier (le mot n'est pas assez fort) Jean-Christophe Augustin qui a initié et dirigé ces recherches. Il m'a permis de réaliser ce travail dans des conditions idéales. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour sa disponibilité, son soutien, sa rigueur scientifique et l'aide qu'il m'a apportée.

Je remercie Pierre Pardon qui a accepté d'être mon directeur de thèse. Je lui exprime ma plus grande reconnaissance pour m'avoir suivi et encouragé dans cette thèse.

Je remercie vivement Laurent Rosso et Marcel Zwietering qui ont accepté de rapporter ce travail, ainsi que Frédéric Carlin pour avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie Jean-Pierre Guyonnet, directeur adjoint d'Arilait Recherches, pour le suivi de ce travail et son soutien. Je tiens à remercier également André Ayerbe, directeur d'Arilait Recherches, pour m'avoir confié cette thèse industrielle et pour ses conseils sur mon avenir professionnel. Merci également à tous les membres du comité de pilotage Arilait Recherches pour leur participation active et l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je remercie également Jacques Pourquié d'avoir accepté d'être membre du jury, pour l'intérêt porté à ce projet et ses remarques toujours pertinentes lors des comités de pilotage.

Je tiens à remercier tout particulièrement Hélène Bergis, Marie Cornu-Simon et Nathalie Gnanou-Besse de l'AFSSA pour leur collaboration et leur contribution à ce travail de thèse.

Je remercie également l'association Animal Société Aliment qui m'a accueilli dans son laboratoire.

Merci à tous les doctorants ou jeunes docteurs que j'ai rencontrés au cours de cette thèse pour nos échanges et les encouragements qu'ils m'ont apportés. Merci notamment à Fanny Aziza, Carole Feurer et Véronique Zuliani.

Mes remerciements vont également à tous les enseignants de l'unité pédagogique d'HIDAOA qui m'ont offert un excellent accueil, ainsi qu'à tous les membres de l'unité Risques Alimentaires de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort.

Un grand merci également à l'ensemble du personnel de l'équipe microbiologie du Centre Technique de la Salaison de la Charcuterie et des Conserves de Viandes. Merci pour leur accueil et leur bonne humeur.

Merci à ma belle famille pour m'avoir encouragé au cours de ces trois dernières années.

Enfin, je dédie cette thèse à ma sœur, mes parents et Sophie qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans mes choix. Je leur témoigne ici toute mon affection.

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	5
<b>Chapitre i : <i>Listeria monocytogenes</i> : états physiologiques et écologie microbienne</b>	5
<b>I. L. monocytogenes et états physiologiques</b>	5
I.1. États physiologiques rencontrés chez <i>L. monocytogenes</i>	5
I.1.1. Les cellules en phase de latence	6
I.1.2. Les cellules en phase exponentielle de croissance	6
I.1.3. Les cellules stressées	6
I.1.4. Les cellules cultivables et non cultivables	6
I.1.5. L'état viable non cultivable	7
I.1.6. Les cellules mortes	7
I.2. Conséquences de l'état physiologique sur le comportement de <i>L. monocytogenes</i>	10
I.2.1. Conséquences de l'état physiologique dans un environnement non favorable à la croissance	10
I.2.2. Conséquences de l'état physiologique dans un environnement favorable à la croissance	10
I.2.3. Conséquences de l'état physiologique sur la détection dans les aliments	12
<b>II. Ecologie de <i>L. monocytogenes</i> dans les industries agro-alimentaires</b>	13
II.1. Les facteurs environnementaux rencontrés dans l'environnement d'une usine agro-alimentaire	13
II.1.1. La désinfection	13
II.1.2. L'absence de nutriment	14
II.2. Les facteurs environnementaux rencontrés dans les aliments	14
II.2.1. Les catégories de facteurs environnementaux	14
II.2.2. Modélisation de l'interface croissance – non croissance et du taux de croissance de <i>L. monocytogenes</i> dans les aliments	15
<b>Chapitre ii : Modélisation de la latence bactérienne</b>	40
<b>I. Définitions du temps de latence</b>	40
I.1. Durée de la phase de latence	40
I.2. Temps de latence populationnel	40
I.3. Temps de latence individuel et cycle cellulaire	41
<b>II. Modèles de croissance et latence bactérienne</b>	41
II.1. Les modèles primaires	41
II.1.1. Approches déterministes	42
II.1.2. Approches stochastiques	43
II.2. Liens entre le temps de latence stochastique et le temps de latence de l'approche déterministe	44
II.2.1. Lien entre le temps de latence déterministe et les temps de latences cellulaires	44
II.2.2. Lien entre le temps de latence stochastique et les temps de latence cellulaires	45
II.2.3. Lien entre le temps de latence stochastique et le temps de latence déterministe	45
II.3. Facteurs influençant la durée de la phase de latence	46
II.3.1. Les conditions de croissance	46
II.3.2. Les conditions de pré-incubation	47
<b>Chapitre iii : Acquisition de données pour la mesure du temps de latence</b>	49
<b>I. Dénombrements des unités formant colonie</b>	49
I.1. Principe	49
I.2. Méthodes de détermination des temps de latence	49
<b>II. Mesure de l'absorbance d'une culture bactérienne</b>	50
II.1. Principe	50
II.2. Méthodes pour la détermination des temps de latence	50
<b>III. Observation des cellules par microscope</b>	52
III.1. Principe	52
III.2. Méthodes pour la détermination des temps de latence	53
<b>IV. Mesure de la surface ou du volume de colonies bactériennes</b>	53
IV.1. Principe	53
IV.2. Méthodes pour la détermination des temps de latence	54

<b>RESULTATS &amp; DISCUSSIONS</b>	55
<b>Chapitre A : Souche utilisée et protocoles des stress simples ou combinés appliqués</b>	56
I. Souche utilisée et conditions de conservation	56
II. Préparations des cultures avant le stress	56
III. Détermination de la perte de cultivabilité	56
IV. Stress appliqués	57
IV.1 Stress standardisés sur la base d'une perte de cultivabilité	57
IV.1.1 Critères de choix de ces stress	57
IV.1.2 Protocoles des stress standardisés	57
IV.1.3 Pertes de cultivabilité observées pour ces stress	58
IV.2 Modifications de stress standardisés	60
IV.2.1 Critères de choix de ces stress	60
IV.2.2 Protocoles de stress	61
IV.3 Successions de stress standardisés	61
IV.4 Combinaisons de stress industrielles	62
IV.4.1 Combinaisons de stress représentatives de la contamination par <i>L. monocytogenes</i> d'un fromage à pâte molle et croûte lavée	62
IV.4.2 Combinaisons de stress représentatives de la contamination par <i>L. monocytogenes</i> du saumon fumé	66
V. Conditions d'accueil testées pour la détermination des temps de latence cellulaires	67
<b>Chapitre B : Mise au point d'une méthode du suivi de la croissance en milieu solide et détermination des temps de latence cellulaires</b>	69
I. Contexte et objectifs	69
II. Dispositif et logiciel d'acquisition d'images	70
III. Méthode de détermination des temps de latence en milieu solide par analyse d'images	72
IV. Principe d'acquisition des temps de latence cellulaires à partir des temps de détection : applications en milieux solides et liquides	84
<b>Chapitre C : Influence du stress sur les distributions des temps de latence cellulaires</b>	86
I. Stress standardisés	86
I.1 Article 3	86
I.2 Données complémentaires à l'article 3	96
II. Distributions des temps de latences cellulaires pour les autres stress	97
<b>Chapitre D : Influence des conditions de re-croissance sur les distributions des temps de latence cellulaires et sur la proportion de cellules cultivables</b>	100
I. Études en milieu liquide	100
I.1 Article 4	100
I.2 Données complémentaires à l'article 4	122
II. Études en milieu solide	127
<b>Chapitre E : Etude de l'effet souche sur les distributions des temps de latence cellulaires de <i>L. monocytogenes</i></b>	130
I. Souches utilisées et conditions de conservation	130
II. Stress appliqué et perte de cultivabilité	131
III. Distributions des temps de latence cellulaires	131
<b>Chapitre F : Modélisation des temps de latence cellulaires en fonction de l'état physiologique et des conditions de re-croissance</b>	134
I. Introduction	134
II. Données utilisées	135
III. Modélisation des temps de latence cellulaires et du temps de latence populationnel	136
III.1 Quelle distribution théorique pour les temps de latence cellulaires ?	136

III.2.	Relation entre moyenne et écart type des distributions des temps de latence cellulaires	141
III.3.	Relation entre moyenne des temps de latence cellulaires et temps de latence populationnel	141
<b>IV. Article 5</b>		142
<b>V. Application de la démarche de modélisation des temps de latence cellulaires. Prévision des distributions de latence cellulaires dans plusieurs conditions à partir d'un ou plusieurs temps de latence populationnels</b>		180

## CONCLUSION & PERSPECTIVES

<b>I. Conclusion</b>		209
I.1.	Originalité et apports de nos résultats à la connaissance des temps de latence cellulaires de <i>L. monocytogenes</i>	209
I.2.	Rappels des objectifs et des résultats atteints	209
<b>II. Fin du programme</b>		211
II.1	Validation sur aliments	211
II.2	Intégration des résultats dans la base de données Sym'Previus	214
<b>III. Perspectives</b>		214
II.1	Perspective 1 : Étude du comportement des cellules de <i>L. monocytogenes</i> vers les limites de croissance	214
II.2.	Perspective 2 : Quantification de l'influence du stress sur le recouvrement de <i>L. monocytogenes</i> dans les milieux d'enrichissement et de revivification	215
II.3.	Perspective 3 : Utilisation de l'analyse d'image pour l'étude de la population maximale atteinte par <i>L. monocytogenes</i> dans les aliments et de l'influence de la flore annexe sur sa croissance	216
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		217



## Liste des figures :

Figure 1. Cinétique de croissance bactérienne et paramètres caractérisant ses trois phases, avec $\mu_{\max}$ , le taux de croissance maximum, <i>lag</i> , le temps de latence et $x_0$ et $x_{\max}$ les concentrations cellulaires initiales et maximales.	8
Figure 2 : Représentation du cycle cellulaire bactérien (d'après Dens et al., 2005).	8
Figure 3. Relation entre le nombre initial de cellules ( $x_0$ ) et le temps de latence stochastique ( $lag(x_0)$ ). Les barres verticales représentent +/- un écart type. (D'après Kutilik et al., 2005a).	46
Figure 4. Dispositif d'acquisition d'images de la croissance de colonies en surface de quatre géloses dans une enceinte régulée en température et en hygrométrie .	70
Figure 5. Logiciel de pilotage de la caméra CCD pour l'acquisition automatisée d'images.	71
Figure 6. Principe de détermination des temps de latence cellulaires de cellules stressées en milieux solide et liquide à partir des temps de détection.	84
Figure 7. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires observés de <i>L. monocytogenes</i> dans du TSBye à 30°C pour des cellules ayant subi le stress (a) HCl, (b) froid, (c) acide lactique, (d) NaOH, (e) hypochlorite, (f) nutritionnel, (g) NaCl, (h) BAC, (i) chaud.	96
Figure 8. Distributions cumulatives des temps de latence cellulaires observés de <i>L. monocytogenes</i> dans du TSBye à 30°C pour les états physiologiques #9 à #22 (confère Tableau 10).	97
Figure 9. Moyenne des temps de latence cellulaires de cellules stressées en TSBye à 30°C en fonction des pertes de cultivabilité associées aux 22 stress (se reporter au Tableau 10 pour la correspondance entre les numéro et les états physiologiques).	99

Figure 10. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence en TSBye de cellules *L. monocytogenes* 14 dans l'état physiologique S1. 123

Figure 11. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence en TSBye de cellules *L. monocytogenes* 14 dans l'état physiologique S4. 124

Figure 12. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence en TSBye de cellules *L. monocytogenes* 14 dans l'état physiologique S5. 125

Figure 13. Relation entre les écarts types et les moyennes des distributions de latence cellulaires pour *L. monocytogenes* dans les états physiologiques S1 (●), S4 (■) et S5 (◀) dans différentes conditions d'accueil. 126

Figure 14. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires ( $\tau$ ) en TSAye de cellules *L. monocytogenes* 14 stressées par la combinaison S4. (a) 20°C  $a_w$  0.997 pH 7.1, (b) 15°C  $a_w$  0.997 pH 7.1, (c) 20°C  $a_w$  0.97 pH 7.1 (d) 20°C  $a_w$  0.97 pH 5.5. 127

Figure 15. Comparaison des moyennes et des écarts types des distributions des temps de latence cellulaires pour les cellules stressées de *L. monocytogenes* 14 par la combinaison S4. Conditions environnementales : (a) 20°C  $a_w$  0.997 pH 7.1, (b) 15°C  $a_w$  0.997 pH 7.1, (c) 20°C  $a_w$  0.97 pH 7.1, (d) 20°C  $a_w$  0.97 pH 5.5. En pointillés : bissectrice entre les deux axes. 128

Figure 16. Principe de détermination des temps de latence cellulaires à partir des temps de détection en fonction de la nature du milieu et des conditions environnementales. 129

Figure 17. Distributions cumulatives des temps de latence cellulaires en milieu TSBye à 30°C, pH 7.1 et  $a_w$  0.997 après le stress NaCl des cellules de *L. monocytogenes* des 11 souches. 132

Figure 18. Moyenne des temps de latence cellulaires en milieu TSBye à 30°C, pH 7.1 et  $a_w$  0.997 après le stress NaCl en fonction de la perte de cultivabilité des onze souches de *L. monocytogenes*. 133

Figure 19-(1 à 4). Distributions observées (●) des temps de latence en TSBye de cellules de *L. monocytogenes* 14 pour divers états physiologiques et distributions des valeurs extrêmes (avec le paramètre de forme fixé à 5) ajustées aux observations (—). 137

Figure 20-(1 à 10). Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel. 183

Figure 21-(1 à 3). Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1 (#18) à partir des temps de latence populationnels dans d'autres conditions environnementales. 193

Figure 22-(1 à 3). Observations (●) et prévisions (--) des distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S4 (#21) à partir des temps de latence populationnels dans d'autres conditions environnementales. 196

Figure 23-(1 à 10). Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir des temps de latence populationnels. 199

Figure 24. Simulation de croissance de cellules stressées de *L. monocytogenes* dans du saumon fumé à 8°C pour des inoculum de (a) 90, (b) 6 et (c) 3 cellules. 213

Figure 25. Mise en évidence de la variabilité des temps de latence à partir des distributions des niveaux de contamination de plusieurs unités ensemencées avec  $N_0$  cellules. 213

Figure 26. (a) 100 simulations de la croissance d'une cellule de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1 dans 250 ml de bouillon Fraser 1/2 pendant 24 h à 30°C. (b) Distribution des niveaux de population atteints au terme de ces 24 heures. 216

## Liste des tableaux :

Tableau 1. Synthèse des publications portant sur l'impact de conditions de pré-incubation sur la résistance ou la sensibilisation à des conditions létales pour <i>L. monocytogenes</i> .	9
Tableau 2. Conditions de stress et modèles des cinétiques de perte de viabilité de <i>L. monocytogenes</i> 14 pour les neuf stress standardisés sur une même perte de $1.5 \log_{10}$ ufc ml <sup>-1</sup> sur milieu non-sélectif TSAYe.	59
Tableau 3. Valeurs observées des pertes de cultivabilité de <i>L. monocytogenes</i> 14 pour treize stress en fonction de la nature solide, liquide ou sélective du milieu utilisé pour le dénombrement des cellules.	60
Tableau 4. Pertes de cultivabilité de <i>L. monocytogenes</i> 14 pour des successions de deux stress.	61
Tableau 5. Conditions physico-chimiques et perte de cultivabilité observée pour le scénario de contamination de la surface du caillé (stress S1) par <i>L. monocytogenes</i> .	64
Tableau 6. Conditions physico-chimiques et pertes de cultivabilité observées pour le scénario de contamination de la surface du caillé par des cellules de <i>L. monocytogenes</i> présentes dans la saumure ( stress S2).	64
Tableau 7. Conditions physico-chimiques et perte de cultivabilité observée pour le scénario de contamination du caillé en formation (stress S3) par des cellules de <i>L. monocytogenes</i> .	65
Tableau 8. Conditions physico-chimiques et pertes de cultivabilité observées pour le scénario de contamination du caillé par des cellules de <i>L. monocytogenes</i> provenant de l'environnement de l'atelier (stress S4).	66
Tableau 9. Conditions physico-chimiques et perte de cultivabilité observée pour le scénario de contamination du saumon fumé (stress S5) par <i>L. monocytogenes</i> à l'étape de salage.	67

Tableau 10. Température, pH et activité de l'eau des conditions d'accueil utilisées pour la détermination des distributions des temps de latence cellulaires pour les 22 états physiologiques différents de *L. monocytogenes* 14. (X) TSBYe, (⊗) TSBYe et TSAye. 68

Tableau 11. Moyenne des temps des latence cellulaires pour des cellules issues d'une culture en phase exponentielle dans différentes conditions d'accueil. 85

Tableau 12. Effet de l'état physiologique et des conditions de re-croissance sur la proportion de cellules cultivables de cellules de *L. monocytogenes* 14. 126

Tableau 13. Pertes de cultivabilité observées en  $\log_{10}$  ufc ml<sup>-1</sup> pour les onze souches de *L. monocytogenes* pour le protocole de stress NaCl (Chapitre A). 131



# INTRODUCTION



*Listeria monocytogenes* est une espèce bactérienne à Gram positif, largement répandue dans la nature. Cette bactérie est responsable d'infections sévères chez l'homme et les animaux qui se manifestent par des méningo-encéphalites, des avortements ou des septicémies. L'incidence de la listériose humaine en France est faible avec environ quatre cas par million d'habitants (Anonyme, 2004a), mais elle est caractérisée par une létalité importante, comprise entre 20 et 30% et par des séquelles neurologiques chez environ 40% des malades. La listériose est donc un problème majeur de santé publique. La transmission du pathogène à l'homme est dans la majeure partie des cas réalisée par l'intermédiaire des aliments (McLauchlin et al., 2004). Les aliments le plus souvent mis en cause par les enquêtes épidémiologiques sont ceux « prêts à consommer ».

Depuis 1994 et l'accord SPS signé par les pays membres de l'Organisation Mondiale du Commerce sur les mesures sanitaires, les États ont la possibilité de prendre des mesures sanitaires pour protéger les consommateurs vis-à-vis des pathogènes transmis par les aliments. Ces mesures doivent être basées sur une évaluation scientifique des risques. Les différentes étapes de cette évaluation sont l'identification du danger, sa caractérisation, l'appréciation de l'exposition et l'estimation des risques. L'appréciation de l'exposition est une étape clef de l'analyse des risques. Cette étape utilise les données sur la consommation d'un aliment, sur l'incidence et sur la croissance du pathogène dans l'aliment avant sa consommation pour estimer la dose ingérée au moment de la consommation.

Récemment, dans le projet de règlement sur les critères microbiologiques (Anonyme, 2005), la Commission Européenne a fixé pour *L. monocytogenes* le niveau maximum de 100 ufc g<sup>-1</sup> à la fin de la durée de vie des produits « prêts à consommer ». Dans l'article 3 de ce document, il est précisé que la responsabilité de montrer que le niveau de contamination ne dépassera pas la valeur de ce critère incombe aux opérateurs des entreprises alimentaires. Dans l'annexe 2 à ce règlement, sont présentés les outils à utiliser pour l'étude du comportement de *L. monocytogenes* dans un aliment. Il est fait référence à la connaissance des caractéristiques physico-chimiques du produit et aux publications scientifiques. En plus de ces deux aspects, il est recommandé aux industriels agro-alimentaires de réaliser des tests de vieillissement, des tests d'épreuve et l'utilisation des modèles de microbiologie prévisionnelle.

Dans les cas de l'appréciation de l'exposition comme dans le cas du respect des critères microbiologiques, il existe aujourd'hui un nombre important de données et de modèles permettant la prévision du taux de croissance de *L. monocytogenes*. Ross et Dalgaard (2004) ont fait une revue exhaustive des modèles secondaires décrivant l'influence des paramètres environnementaux des aliments sur ce taux de croissance. On observe généralement une bonne adéquation entre les taux de croissance observés au cours des tests d'épreuves (ou challenge test) et leur prévision par les modèles secondaires (Augustin, 1999).

Des modèles secondaires sont également disponibles pour le temps de latence (Ross et Dalgaard, 2004). Mais plusieurs études ont souligné la difficulté de prédire correctement le temps de latence (Gay et al., 1996 ; Delignette-Muller et al., 1998 ; Robinson et al., 1998 ; Augustin et al., 2000b). Deux aspects peuvent expliquer cette difficulté :

- Habituellement le temps de latence de *L. monocytogenes* est étudié au niveau populationnel c'est-à-dire avec des inoculum forts ( $10^3$  cellules). Or le niveau de contamination des aliments par *L. monocytogenes* est habituellement très faible, de l'ordre de quelques unités par gramme (Kozak et al., 1996 ; Uyttendaele et al., 1999 ; Rorvik, 2000 ; Gnanou-Besse, 2004). Quelques études ont montré une variabilité plus grande du temps de latence quand la taille de l'inoculum diminuait (Augustin et al., 2000a ; Robinson et al., 2001) puis de nombreuses études ont confirmé l'existence d'une distribution des temps de latence au sein des populations de *L. monocytogenes* (Wu et al., 2000 ; Francois et al., 2002 ; Métris et al., 2002 et 2003).

- Le temps de latence, contrairement au taux de croissance, est dépendant de l'histoire des cellules (Swinnen et al., 2004). Il semble donc particulièrement important de connaître l'état physiologique au moment de la contamination des produits. Dans l'environnement des industries agro-alimentaires, les cellules de *L. monocytogenes* sont exposées aux traitements assainissants des surfaces et à l'absence de nutriments. De plus les procédés de fabrication et la nature des ingrédients jouent un rôle sur l'état physiologique de *L. monocytogenes*. Les cellules se trouvent alors dans un état physiologique ne permettant pas la croissance immédiate dans les aliments. Pour *L. monocytogenes*, seuls les travaux de modélisation de Bréand (1998) sur l'impact des traitements thermiques et d'Augustin (1999) sur l'effet de l'histoire thermique permettent de quantifier l'influence de l'état physiologique sur le temps de latence avant la croissance.

Augustin (1999) a proposé en perspectives de son travail de thèse d'étudier les distributions des temps de latence cellulaires pour différents états physiologiques représentant des situations rencontrées par les cellules dans l'environnement des industries agro-alimentaires. Ceci devant permettre d'évaluer les conséquences d'une contamination des aliments par quelques cellules de *L. monocytogenes*, dans des états physiologiques réalistes en termes de situations de contamination.

Un autre point d'amélioration de la connaissance du comportement du temps de latence de *L. monocytogenes* dans les aliments passe par l'étude des latences en milieu solide. En effet, alors que quelques études semblent montrer qu'il existe une différence entre la croissance en milieu liquide et en milieu gélosé (Brocklehurst et al., 1997 ; Meldrum et al., 2003 ; Koutsoumanis et al., 2004), la plupart des travaux sur le comportement de *L. monocytogenes* ne prennent pas en compte le caractère immobilisé des cellules dans les aliments (Dens et Van Impe, 2001). Cependant la mise au point d'une méthode d'étude des temps de latence cellulaires en milieu solide reste à accomplir.

Les différents objectifs de ce travail sont :

- de caractériser la variabilité des temps de latence de cellules de *L. monocytogenes* en fonction du stress subi et des conditions environnementales,
- de mettre au point une méthode de détermination des temps de latence cellulaires en milieu solide,
- d'étudier l'importance de la variabilité entre souche sur les distributions des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes*,
- d'étudier le lien entre le temps de latence populationnel et les temps de latence cellulaires, et de proposer un modèle permettant de déterminer les temps de latence cellulaires en fonction de l'état physiologique et des conditions environnementales.

Ce document comprend :

- une étude bibliographique qui a pour objectif :
  - de définir les différents états physiologiques et l'écologie microbienne de *L. monocytogenes* dans les aliments ;
  - de présenter les différentes approches existantes de modélisation de la phase de latence ;
  - de présenter les méthodes existantes d'acquisition de données pour la détermination du temps de latence ;
- une partie résultats et discussion où nous présentons :
  - les protocoles de stress appliqués à *L. monocytogenes* afin de reproduire des états physiologiques proches des cellules contaminant les produits ainsi qu'une nouvelle méthode de détermination des temps de latence en milieu solide ;
  - les résultats des distributions des temps de latence des cellules en fonction des états physiologiques des conditions d'accueil et des souches utilisées ;
  - la modélisation des distributions de temps de latence cellulaires en fonction de l'état physiologique et des conditions de croissance ;
- une dernière partie où nous présentons les conclusions et les perspectives de nos travaux.

Cette thèse a été financée par :

- Arilait Recherches
- l'Association Nationale de la Recherche Technique dans le cadre d'une convention CIFRE entre Arilait Recherches et l'Unité Risque alimentaire de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- la Direction Générale de l'Alimentation (programme Aliment Qualité Sécurité 2002/S16).

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**



# **Chapitre i : *Listeria monocytogenes* : états physiologiques et écologie microbienne**

L'amélioration des connaissances actuelles du comportement de *L. monocytogenes* au cours de la fabrication et de la conservation des aliments est un point important pour l'analyse quantitative des risques liés à cette bactérie. Cette amélioration passe par une meilleure connaissance de l'état physiologique des cellules en réponse à leur environnement. Dans cette partie, nous décrirons les différents états physiologiques de *L. monocytogenes* et les conséquences de ces états sur la croissance, l'inactivation et la détection. Ensuite nous présenterons les facteurs écologiques influençant le comportement de *L. monocytogenes* dans l'environnement de fabrication et à l'intérieur des aliments.

## **I. *L. monocytogenes* et états physiologiques**

### **I.1. États physiologiques rencontrés chez *L. monocytogenes***

#### **I.1.1. Les cellules en phase de latence**

La phase de latence correspond à une phase d'adaptation des cellules à un nouvel environnement permettant la croissance. Cette phase de latence est une phase d'ajustement pendant laquelle les bactéries procèdent à des modifications dans le but de pouvoir initier la phase de croissance exponentielle (Buchanan et Klawitter, 1991). Sur la Figure 1 est représentée la phase de latence pour une population de cellules inoculées dans un nouvel environnement. Au niveau des cellules individuelles la latence est associée à l'elongation des cellules au cours du cycle cellulaire (Kutalik et al., 2005b). Le cycle cellulaire bactérien est divisé en trois phases distinctes (Figure 2), les périodes B, C et D (Botello et Nordström 1998). Au cours de la période B, la cellule accroît sa masse jusqu'à ce qu'elle atteigne un niveau lui permettant l'initiation de la synthèse d'ADN. La période de réPLICATION totale de l'ADN bactérien depuis l'origine de réPLICATION est appelée période C. La troisième et dernière phase du cycle bactérien, ou période D, représente le temps nécessaire à la division de la cellule en deux cellules distinctes. Cette période regroupe la séparation des deux chromosomes, la synthèse des protéines de complétion, la formation d'un septum et la séparation des deux cellules. La croissance de la masse cellulaire est exponentielle tout au long du cycle (Donachie, 1968). Cependant le démarrage de la croissance exponentielle de la masse dès le début de la période B est fonction de l'histoire des cellules. En effet, une cellule bactérienne peut présenter une latence avant la croissance exponentielle de sa masse (Kutalik et al., 2005b). La

période B joue donc un rôle primordial sur la durée de la période du cycle cellulaire complet (Koppes et al., 1980 ; Katalik et al., 2005b) et ainsi sur la latence individuelle.

### I.1.2. Les cellules en phase exponentielle de croissance

Les cellules en phase de croissance exponentielle constituent un autre état physiologique particulier des cellules bactériennes. Au niveau d'une population de cellules, la croissance se traduit par une augmentation exponentielle du nombre de cellule au cours du temps. Une mesure de la vitesse de croissance est le taux de croissance spécifique,  $\mu_{\text{max}}$  (Figure 1). Au niveau d'une cellule bactérienne, la phase exponentielle de croissance se traduit par une croissance continue en longueur et en masse de la bactérie (Dens et al., 2005).

### I.1.3. Les cellules stressées

Le terme de «stress» pour *L. monocytogenes* recouvre plusieurs significations selon les auteurs. Certains auteurs (François et al., 2005a) emploient ce terme pour des cellules placées dans des conditions favorables à la croissance mais qui s'éloignent des conditions optimales de croissance. D'autres auteurs (Meyer et Donnelly, 1992 ; Bremer et al., 1998 ; Gnanou-Besse et al., 2000) définissent les cellules stressées comme des cellules incapables de multiplier sur milieu sélectif.

Dans notre étude, les termes de « stress » et « stressantes » sont employés pour des conditions environnementales (température, pH, activité de l'eau, absence de nutriments, présence d'inhibiteur) ne permettant pas la croissance de *L. monocytogenes*, et le terme de « cellule stressée » pour une cellule placée dans des conditions environnementales stressantes.

L'exposition des cellules de *L. monocytogenes* à des conditions stressantes peut engendrer des dommages non létaux sur les cellules bactériennes. Les dommages touchent différents compartiments cellulaires en fonction de la nature et de l'intensité du stress (Bozoglu et al., 2004). Pour les bactéries placées dans des conditions favorables à la croissance, ces dommages sont réversibles.

### I.1.4. Les cellules cultivables et non cultivables

Les cellules cultivables sont des cellules capables de division ; c'est-à-dire capables de former des colonies sur milieu solide ou de se multiplier en milieu liquide. Les cellules cultivables peuvent enclencher une division (progression dans le cycle cellulaire). Le moyen de vérifier si une cellule est cultivable dans un environnement donné repose sur le suivi au cours du temps du niveau de population. Le caractère cultivable se définit par rapport aux conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les cellules.

Les cellules non cultivables sont incapables de division dans les conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent.

### I.1.5. L'état viable non cultivable

Lorsque les cellules bactériennes sont soumises à une déplétion de nutriments pendant une longue période, la proportion de cellules cultivables sur milieu de culture décroît alors que le nombre de cellules observables reste constant (Bogosian et Bourneuf, 2001). Une explication simple serait que ces cellules non cultivables soient mortes. Une autre explication a été proposée : ces cellules seraient dans un état « viable non cultivable » (Xu et al., 1982 ; Barer et al., 1993). L'existence de cet « état » chez *L. monocytogenes* a été rapportée par Colburn et al. (1992) et par Besnard et al. (2000, 2002). La caractérisation de cet état repose sur la mise en évidence de leur activité métabolique par radio-marquage d'un substrat et l'utilisation de molécules fluorescentes (Besnard et al., 2000). Cet état physiologique chez *L. monocytogenes* pose un problème de santé publique (Ravel et al., 1995) car les cellules viables non cultivables ne sont pas détectées par les méthodes classiques de recherche alors qu'elles ont potentiellement gardé leur pouvoir pathogène.

### I.1.6. Les cellules mortes

Ce sont des cellules incapables de se diviser (non-cultivables) quelles que soient les conditions environnementales.

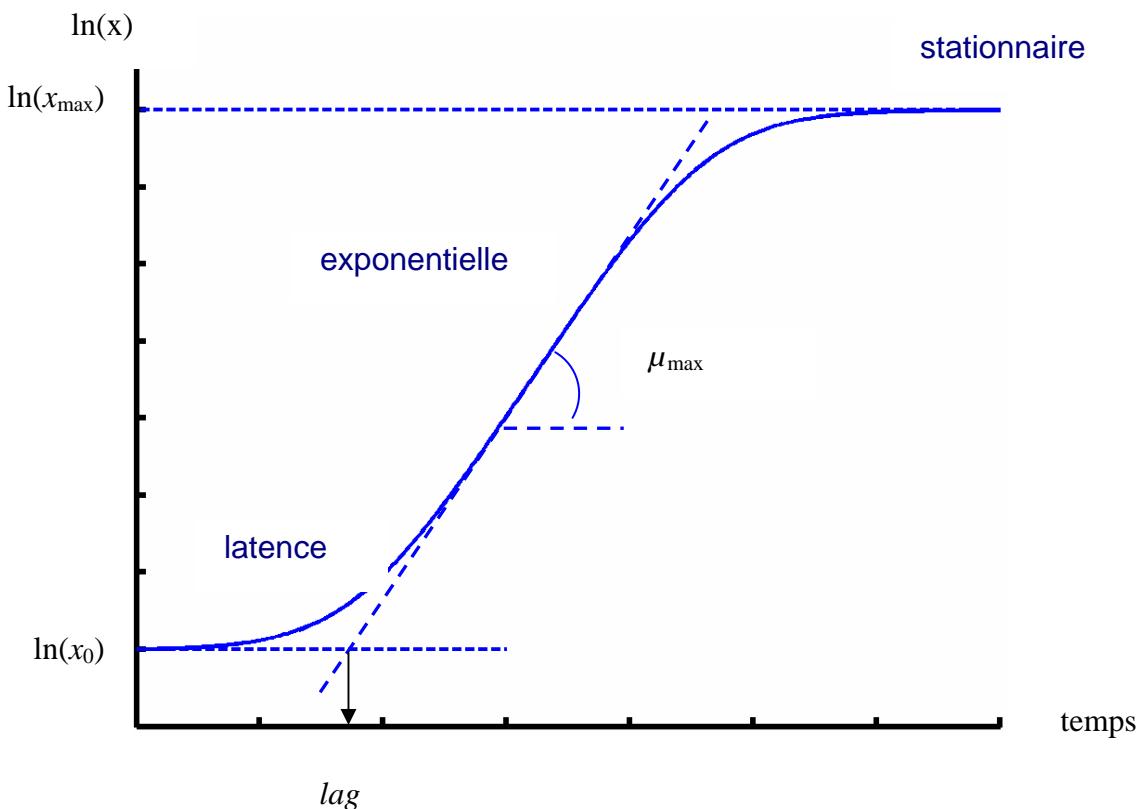


Figure 1. Cinétique de croissance bactérienne et paramètres caractérisant ses trois phases, avec  $\mu_{\max}$ , le taux de croissance maximum, *lag*, le temps de latence et  $x_0$  et  $x_{\max}$  les concentrations cellulaires initiales et maximales.

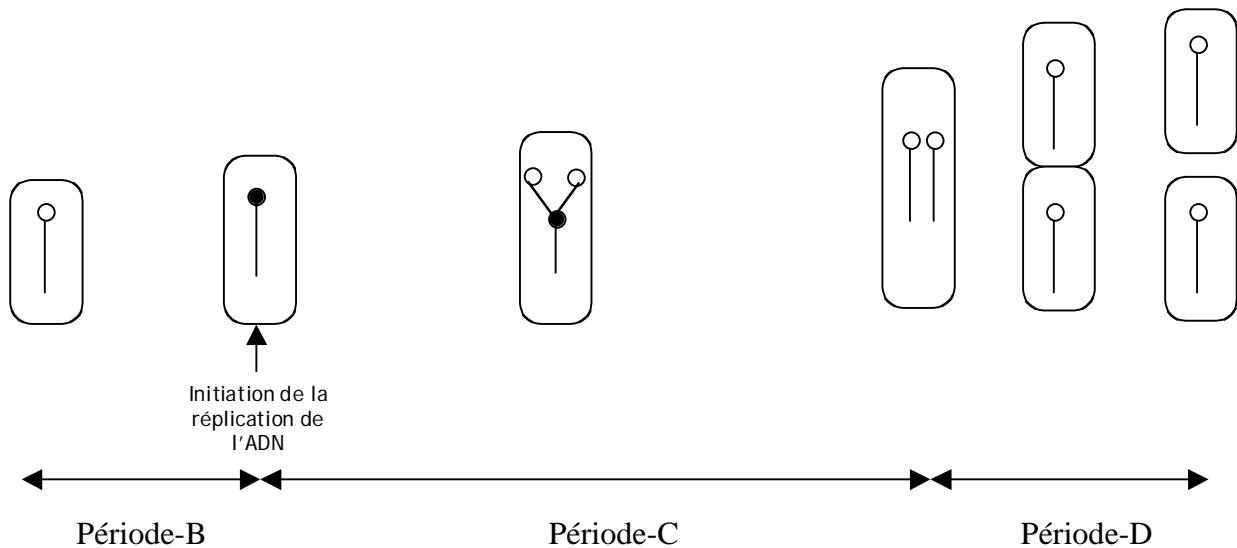


Figure 2 : Représentation du cycle cellulaire bactérien (d'après Dens et al., 2005).

Tableau 1. Synthèse des publications portant sur l'impact de conditions de pré-incubation sur la résistance ou la sensibilisation à des conditions létales pour *L. monocytogenes*.

Conditions pré-incubatoires	Traitements subis	Impact des conditions pré-incubatoires	Auteurs (année)
Hypochlorite	Chaleur	Sensibilisation	Taormina and Beuchat (2001)
Ethanol	NaCl ,pH acide, éthanol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Augmentation de la résistance	Lou et Yousef (1997)
	Stress nutritionnel	sans effet	Lou et Yousef (1997)
Froid	Chaleur	Sensibilisation	Miller et al. (2000)
	Haute pression	Augmentation de la résistance	Wemekamp-Kamphuis (2002)
	pH acide	sans effet	Koutsoumanis et al. (2003)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Augmentation de la résistance	Lou et Yousef (1997)
	Stress nutritionnel	sans effet	Lou et Yousef (1997)
Température sub-optimale	pH acide	Sensibilisation	Koutsoumanis et al. (2003)
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Augmentation de la résistance	Lou et Yousef (1997)
	Stress nutritionnel	sans effet	Lou et Yousef (1997)
	Ethanol, NaCl	Augmentation de la résistance	Lou et Yousef (1997)
	Chaleur	Augmentation de la résistance	Knabel et al. (1990) Linton et al. (1992) Jorgensen et al. (1996) Pagan et al. (1997) Novak et Juneja (2003)
NaCl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Augmentation de la résistance	Lou et Yousef (1997)
	Stress nutritionnel	sans effet	Lou et Yousef (1997)
	NaCl	Augmentation de la résistance	Faleiro et al. (2003)
	pH acide	Augmentation de la résistance	Faleiro et al. (2003)
	Chaleur	Augmentation de la résistance	Jorgensen et al. (1995) Bremer et al. (1998)
NaCl (concentration basse)	pH acide	sans effet	Koutsoumanis et al. (2003)
NaCl (concentration haute)	pH acide	Sensibilisation	Koutsoumanis et al. (2003)
pH acide	Chaleur	Augmentation de la résistance	Phan-Thanh et al (2000)
	Stress nutritionnel	sans effet	Lou et Youssef (1997)
	NaCl	Augmentation de la résistance	Faleiro et al. (2003) Phan-Thanh et al (2000) O'Driscoll et al. (1996)
	pH acide, éthanol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Augmentation de la résistance	Lou et Yousef (1997) Phan-Thanh et al (2000)
pH acide (température basse)	pH acide	sans effet	Koutsoumanis et al. (2003)
pH acide (température élevée)	pH acide	Augmentation de la résistance	Koutsoumanis et al. (2003) Hill et al. (2002) Koutsoumanis et Sofos (2004b)
pH alcalin	Chaleur	Augmentation de la résistance	Taormina and Beuchat (2001)
	Chlorure de Benzalkonium	Sensibilisation	Taormina and Beuchat (2002)
Stress nutritionnel	pH acide	Augmentation de la résistance	Herbert et Foster (2001)
	Chaleur	Augmentation de la résistance	Lou et Youssef (1996) Casadei et al. (1998) Herbert et Foster (2001)

## I.2. Conséquences de l'état physiologique sur le comportement de *L. monocytogenes*

### I.2.1. Conséquences de l'état physiologique sur le comportement de *L. monocytogenes* dans un environnement non favorable à la croissance

Le passage de cellules de *L. monocytogenes* dans un environnement stressant peut se traduire par des dommages sur les cellules. Les conditions environnementales et la durée d'exposition des cellules influent sur le maintien ou la destruction de tout ou partie de la population. Il existe une distribution des temps de mort pour une population de cellules (McKellar et Lu, 2004). La distribution de ces temps se traduit par différentes cinétiques de destruction des populations microbiennes.

L'état physiologique des cellules de *L. monocytogenes* induit par leur histoire, joue un rôle dans le maintien ou la survie des cellules dans un environnement stressant. L'influence de différentes conditions de pré-incubation sur la survie dans un environnement stressant a largement été étudiée (Knabel et al., 1990 ; Linton et al., 1992 ; Jorgensen et al., 1995 et 1996; O'Driscoll et al., 1996 ; Lou et Youssef, 1997 ; Pagan et al., 1997 ; Bremer et al., 1998 ; Miller et al., 2000 ; Phan-Thanh et al., 2000 ; Casadei et al., 1998 ; Brocklehurst, 2004). Les auteurs cherchent dans ce cas à observer l'existence d'une résistance ou d'une sensibilisation à un stress létal de cellules préalablement exposées à des conditions sub-létales (Tableau 1). L'adaptation au stress repose sur le principe qu'une cellule préalablement exposée à une situation stressante ou cultivée dans des conditions sub-optimales devient plus résistante dans l'environnement stressant qu'une cellule non stressée. Ces conditions entraînent l'induction de gènes favorisant l'adaptation à différentes conditions stressantes. Deux facteurs de transcription ont été identifiés dans la coordination de cette adaptation : les facteurs sigma B ( $\sigma^B$ ) et LisRK. Ces facteurs sont codés par les gènes *sigB* et *lisRK*.  $\sigma^B$  est considéré comme le pendant chez les bactéries à Gram positif du facteur de transcription RpoS (codé par le gène *rpoS*) des bactéries à Gram négatif (Hill et al., 2002). Chez *Listeria* l'osmotolérance (Becker et al, 1998) et la résistance à des conditions acides (Hill et al., 2002) sont liées à la présence et l'induction du gène *sigB*. Le facteur LisRK permet la transcription de nombreux gènes de réponse au stress acide mais aussi de résistance à l'éthanol et aux bactériocines (Cotter et al., 1999, 2001).

### I.2.2. Conséquences de l'état physiologique sur le comportement de *L. monocytogenes* dans un environnement favorable à la croissance

L'adaptation à un nouvel environnement des cellules se traduit par une phase de latence. La durée de cette phase dépend de l'état physiologique des cellules. C'est-à-dire que la phase de latence dans une condition donnée va dépendre de l'origine de l'inoculum. Par contre l'état physiologique chez *Listeria* et les bactéries en général n'affecte pas le taux de croissance de la phase exponentielle (Robinson et al., 2001). Katalik et al. (2005b) ont également montré par microscopie que seul le premier temps de génération d'une cellule dans un nouvel environnement est fonction de son état physiologique.

De nombreux auteurs ont montré l'influence de la température de pré-incubation sur la durée de la phase de latence (par exemple : Gay et al., 1996 ; Dufrenne et al., 1997 ; Whiting et Bagi, 2002). Whiting et Bagi (2002) ont comparé l'influence de la température de pré-incubation pour différents états physiologiques correspondant à des cellules en phase exponentielle de croissance, des cellules en phase stationnaire et des cellules stressées (dessiccation et congélation). L'état physiologique donnant les latences les plus courtes correspondait aux cellules en phase de croissance exponentielle. Ce résultat confirme les observations d'Augustin et al. (2000b). En effet dans cette étude, ces auteurs ont montré que pour *L. monocytogenes* en phase exponentielle, le transfert dans un environnement favorable à la croissance n'entraînait pas de latence.

Les temps de latence les plus longs observés par Whiting et Bagi (2002) correspondaient aux états physiologiques des cellules stressées. Les travaux de Bréand et al. (1997 et 1999), de McKellar et al. (1997) et de Pascual et al. (2001) ont également montré l'importance du stress thermique sur la latence de *L. monocytogenes*. Cette augmentation de la latence pour les cellules stressées s'explique par le « travail » (Robinson et al., 1998) à accomplir par les cellules pour réparer les dommages (Bozoglu et al., 2004) et restaurer les propriétés métaboliques pour entrer en phase exponentielle.

Les cellules issues d'une culture stationnaire peuvent également être considérées comme des cellules stressées (Herbert et Foster, 2001). En effet les cellules n'ont plus de nutriments à leur disposition ce qui entraîne une diminution de leur biomasse (Hills et Wright, 1994 ; Koch, 1995). Une exposition prolongée à ces conditions entraîne une augmentation du travail (donc de la latence) si les cellules sont replacées dans des conditions favorables. Cependant la terminologie « culture en phase stationnaire », regroupe elle-même des états physiologiques hétérogènes (Augustin, 1999).

Augustin et al. (2000b) ont montré que si l'on place dans un nouvel environnement favorable à la croissance un inoculum issu d'une culture en phase de latence, celui-ci terminait cette phase à une vitesse adaptée à son nouvel environnement. C'est une des seules études portant sur la latence d'un inoculum issu d'une phase de latence.

L'impact de l'état physiologique sur la durée de la phase de latence est d'autant plus important que la taille de l'inoculum est faible. Cet effet de la taille de l'inoculum sur le temps de

latence a été montré d'un point de vue théorique par Baranyi (1998, 2002), Baranyi et Pin (1999) et Kutalik et al. (2005a). Le détail de ces relations est présenté dans le chapitre *ii*. Mais l'effet de la taille de l'inoculum a également été mis en évidence expérimentalement. Par exemple l'effet de la taille de l'inoculum sur la durée de la phase de latence a été étudié par Augustin et al. (2000a). Les auteurs ont montré que pour *L. monocytogenes* préalablement placée en situation de déplétion nutritionnelle, le temps de latence était d'autant plus long quand la taille de l'inoculum était faible. Cet effet de la taille de l'inoculum sur la durée de la latence s'explique par la variabilité des temps de latence cellulaires. Pascual et al. (2001) et Robinson et al. (2001) ont observé le même phénomène de dépendance entre la taille de l'inoculum et la variabilité de la latence. Métris et al. (2002, 2003), Smelt et al. (2002) et François et al. (2005a,b) ont montré que cette variabilité était d'autant plus importante que les conditions environnementales se rapprochaient des limites de croissance.

### I.2.3. Conséquences de l'état physiologique sur la détection de *L. monocytogenes* dans les aliments

L'état physiologique des cellules joue un rôle important dans la détection ou le dénombrement de *L. monocytogenes* dans les aliments (Gnanou-Besse, 2004). Cette détection repose sur une ou plusieurs phases d'enrichissement puis sur l'isolement sur milieux sélectifs. La détection est particulièrement difficile pour les cellules stressées. Cette difficulté repose sur l'incapacité des cellules stressées à recouvrir leur caractère cultivable dans ces milieux (Gnanou-Besse, 2002). L'augmentation de la période de latence due aux composés sélectifs pourrait également être une cause des problèmes de détection. De nombreuses études ont porté sur l'influence du stress thermique sur l'efficacité de l'enrichissement (Crawford et al., 1989 ; Knabel et al., 1990 ; Busch et Donnelly, 1992 ; Mendonca et Knabel, 1994). Plus récemment Bull et al., 2005 se sont intéressés au stress engendré par les hautes pressions. Face à ce problème d'enrichissement certains auteurs ont étudié et proposé l'utilisation, préalable à l'étape d'enrichissement, d'un pré-enrichissement non sélectif (Busch et Donnelly, 1992 ; Teo et Knabel, 2000 ; Knabel 2002 ; Rijpens et Herman, 2004). Cette étape permet aux cellules stressées de recouvrir tout ou partie de leur capacité de croissance et ainsi de pouvoir se multiplier dans le milieu d'enrichissement.

De la même façon que pour la détection, le dénombrement des cellules stressées de *L. monocytogenes* pose des difficultés (Gnanou-Besse et Colin, 2004). L'état de stress rend les cellules particulièrement sensibles aux agents sélectifs contenus dans les géloses. L'incapacité à se multiplier repose sur les dommages de la membrane des cellules stressées et les problèmes de perméabilité qui les accompagnent (Gnanou-Besse, 2004). Cette incapacité à se multiplier sur les

milieux sélectifs est d'ailleurs utilisée pour déterminer la part des cellules stressées dans une population. Aussi une période dite de « revivification » a été introduite dans les méthodes de dénombrement (Anonyme 1998) afin de permettre aux cellules stressées de *L. monocytogenes* de recouvrir leur cultivabilité sur les milieux sélectifs.

## **II. Ecologie de *L. monocytogenes* dans les industries agro-alimentaires**

### **II.1. Les facteurs environnementaux rencontrés dans l'environnement d'une usine agro-alimentaire**

Dans l'environnement des industries agro-alimentaires, *L. monocytogenes* est exposée à un ensemble de conditions stressantes (Dykes, 1999 ; Gnanou-Besse, 2002). Dans cette partie nous présentons deux des principales conditions stressantes rencontrées par *L. monocytogenes*.

#### **II.1.1. La désinfection**

L'utilisation des désinfectants dans les industries agro-alimentaires est réglementée. Dans le cadre de leur utilisation, il est nécessaire de connaître leur concentration minimale inhibitrice, valeur la plus faible en concentration capable d'arrêter la croissance microbienne ainsi que la concentration minimale létale, valeur la plus faible de la concentration nécessaire pour observer une destruction. En plus de la concentration du désinfectant, le temps de contact conditionne l'efficacité de la désinfection. On distingue parmi les désinfectants les agents à action létale non spécifique des agents à action létale spécifique (Allion, 2004). Les produits à action létale non spécifique sont chimiquement très réactifs. On retrouve dans ce groupe le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'ozone, les acides forts et les bases fortes, les aldéhydes (glutaraldéhyde), l'hypochlorite de sodium et les produits halogénés. Dans le groupe des produits à action létale spécifique, on retrouve principalement les ammoniums quaternaires et biguanides. Les cibles des molécules désinfectantes chez *L. monocytogenes* sont variables, l'action peut s'effectuer au niveau de la membrane (bases fortes, biguanides, ammoniums quaternaires) ou sur les protéines et enzymes (dérivés halogénés, oxydants et aldéhydes) ou encore sur les acides nucléiques (oxydants, acides, aldéhydes). Cependant le schéma d'action des désinfectants reste le même quelle que soit la molécule. Trois phases sont identifiées (McDonnell et Russell, 1999) : l'adsorption de la molécule désinfectante à la paroi du micro-organisme, la pénétration à l'intérieur de la cellule et l'action.

Des phénomènes d'adaptation à un désinfectant ont été montrés pour *L. monocytogenes* si elle est préalablement mise en présence de concentrations non létales. Ce phénomène a été observé pour

les ammoniums quaternaires, des alkylamines, et l'hypochlorite (Aase et al., 2000, Lunden et al., 2003). De plus l'exposition à des concentrations sub-létales à un désinfectant induit une protection de *L. monocytogenes* à l'action d'autres désinfectants (Lunden et al., 2003), rendant le changement périodique de désinfectant inefficace.

### **II.1.2. L'absence de nutriment**

Les cellules de *L. monocytogenes* dans l'environnement d'une industrie sont exposées à des fluctuations de niveau et de type de nutriments. Le stress nutritionnel se traduit généralement par une perte rapide d'une part importante de la population, suivie par un maintien de la fraction survivante pendant de longues périodes (Lou et Youssef, 1996 ; Herbert et Foster, 2001). Le stress nutritionnel se traduit sur la physiologie par une réduction de la taille des cellules (Herbert et Foster, 2001). Les cellules ayant subi un stress nutritionnel présentent une résistance importante à des conditions létale (Lou et Youssef, 1996 ; Casadei et al., 1998 ; Herbert et Foster, 2001).

## **II.2. Les facteurs environnementaux rencontrés dans les aliments**

### **II.2.1. Les catégories de facteurs environnementaux**

Dans les aliments, les facteurs influençant la croissance ou la survie des micro-organismes sont classés en cinq grandes catégories (Mossel, 1983) :

- Les facteurs intrinsèques. Cette catégorie regroupe les caractéristiques physico-chimiques de l'aliment comme le pH, l'activité de l'eau, la concentration en inhibiteurs de la croissance microbienne, le potentiel d'oxydoréduction ;
- Les facteurs extrinsèques. Cette catégorie regroupe les facteurs utilisés pour la conservation des aliments comme la température et la composition de l'atmosphère ;
- Les facteurs technologiques. Cette catégorie regroupe les traitements appliqués pour détruire les micro-organismes : la chaleur, les radiations ionisantes, les hautes pressions, les U.V. sont les principaux traitements appliqués ;
- Les facteurs microbiens. Cette catégorie regroupe l'ensemble des interactions entre les micro-organismes de l'aliment. Ces facteurs sont utilisés pour favoriser ou inhiber la croissance d'espèces microbiennes ;
- Les effets combinés. L'étude des effets combinés consiste en l'étude des interactions entre les quatre facteurs écologiques. L'efficacité d'un facteur peut en effet être dépendant du niveau des autres facteurs. Les effets peuvent être synergiques ou antagonistes. Dans le cas

d'une synergie entre facteur on parle de concept des barrières ou « hurdle concept » (Leinster, 1985, 2000).

## II.2.2. Modélisation de l'interface entre l'environnement croissance

### - non croissance et du taux de croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments

#### **Article 1 :**

Contexte : L' étude de l'influence de chacun de ces facteurs sur la croissance, la survie et l'interface entre croissance/non croissance de *L. monocytogenes* est largement documentée (voir Ross et Dalgaard, 2004 pour une revue). Les études concernant le taux de croissance portent essentiellement sur des facteurs environnementaux comme la température, le pH, l'activité de l'eau, la composition de l'environnement gazeux et la concentration en sels d'acide ou en phénols. Parallèlement à ces études sur l'impact de l'environnement sur le taux de croissance, se sont développées des études définissant les valeurs limites des facteurs environnementaux permettant la croissance de *L. monocytogenes*. Ces études proposent des modèles décrivant une probabilité de croissance (Tienengoon et al., 2000 ; Koutsoumanis et Sofos, 2004 ; Koutsoumanis et al., 2005).

Objectifs : Evaluer la performance des modèles prédisant le taux de croissance ou l'interface entre croissance et non croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments.

Méthodes et résultats : Les différents modèles cardinaux et de type racine carré pour le taux de croissance ont été évalués dans leur aptitude à décrire le comportement dans différents produits alimentaires. Pour le taux de croissance, les modèles sans interactions entre les facteurs sont suffisants pour la prédiction du taux de croissance. Par contre la prédiction de l'interface entre croissance et non croissance nécessite la prise en compte des interactions. Un nouveau modèle pour le taux de croissance, avec une forme nouvelle d'interaction entre les facteurs et une fonction décrivant la probabilité de croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments sont proposés dans cette étude. Les paramètres des différents modèles associés à chacune des catégories d'aliments sont également donnés.

Conclusion : Les nouveaux modèles présentés sont performants pour la prédiction (avec un intervalle de confiance) du taux de croissance et de la probabilité de croissance de *L. monocytogenes* dans les produits carnés, les produits de la mer et les produits laitiers liquides. Ces modèles peuvent également être utilisés pour décrire l'interface entre croissance et non croissance dans les fromages.



# Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions

J.-C. Augustin<sup>1</sup>, V. Zuliani<sup>2,3</sup>, M. Cornu<sup>4</sup> and L. Guillier<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, <sup>2</sup>Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes, Maisons-Alfort, <sup>3</sup>Unité de Recherches Qualité des Produits Animaux, Institut National de la Recherche Agronomique, Saint-Genès Champanelle, <sup>4</sup>Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, and <sup>5</sup>Arilait Recherches, Paris, France

2005/0217: received 2 March 2005, revised 18 May 2005 and accepted 1 June 2005

## ABSTRACT

J.-C. AUGUSTIN, V. ZULIANI, M. CORNU AND L. GUILLIER. 2005.

**Aims:** To evaluate the performances of models predicting the growth rate or the growth probability of *Listeria monocytogenes* in food.

**Methods and Results:** Cardinal and square root type models including or not interactions between environmental factors and probability models were evaluated for their ability to describe the behaviour of *L. monocytogenes* in liquid dairy products, cheese, meat and seafood products. Models excluding interactions seemed sufficient to predict the growth rate of *L. monocytogenes*. However, the accurate prediction of growth/no-growth limits needed to take interactions into account. A complete and a simplified form (preservatives deducted) of a new cardinal model including interactions and parameter values were suggested to predict confidence limits for the growth rate of *L. monocytogenes* in food. This model could also be used for the growth probability prediction.

**Conclusions:** The new cardinal model including interactions was efficient to predict confidence limits for the growth rate of *L. monocytogenes* and its growth probability in liquid dairy products, meat and seafood products. In cheese, the model was efficient to predict the absence of growth of the pathogen.

**Significance and Impact of the Study:** The suggested model can be used for risk assessment and risk management concerning *L. monocytogenes* in dairy, meat and seafood products.

**Keywords:** dairy products, growth rate, growth/no-growth interface, *Listeria monocytogenes*, meat products, seafood products.

## INTRODUCTION

Numerous predictive models have been proposed these last decades to describe the growth rate and the growth boundaries of micro-organisms (see Ross and Dalgaard 2004 for a review). Many of them were specifically developed for *Listeria monocytogenes* in broth and tend thus to provide conservative predictions in food. These fail-safe models give a margin of safety which can be unacceptable for many food applications (Brocklehurst 2004). An alternative

approach is to develop models directly in food (Duffy *et al.* 1994) or to use data obtained in food by challenge testing (Anon 2001, 2003, 2004; Pinon *et al.* 2004). These predictions are generally good but they are food and processes specific. Therefore, it would be more attractive to improve and validate existing models for a more general applicability but it is difficult for users to know the confidence they can have in a model prediction for a specified food (Delignette-Muller *et al.* 1995). Validation studies of proposed models were published (te Giffel and Zwietering 1999; Devlieghere *et al.* 2001; Giménez and Dalgaard 2004) but the extent of the model validations are somewhat uncertain because these studies included few food data or were restricted to a limited range of growth conditions.

Correspondence to: Jean-Christophe Augustin, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général de Gaulle F-94704 Maisons-Alfort, France (e-mail: jcaugustin@vet-alfort.fr).

te Giffel and Zwietering (1999) have shown that models excluding interactions between environmental factors were in many cases sufficiently accurate to predict the growth rate of *L. monocytogenes* in food. To increase the performance of these models near the growth/no-growth interface of *L. monocytogenes*, modifications of these models have been proposed to take into account interactions between environmental factors (Augustin and Carlier 2000b; Le Marc *et al.* 2002). In parallel, probability models have been proposed to describe the growth probability of *L. monocytogenes* (Tienungoon *et al.* 2000; Koutsoumanis *et al.* 2004) in microbiological media. It seems therefore essential to study the performance of predictive models in food with large data sets in order to specify to the users the confidence they can have in the predictions.

The aim of the present study was to study the performance of three type of models to predict the growth rate and/or the growth probability of *L. monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. These three types of models were: standard secondary models, secondary models including interactions between environmental factors, and probability models describing the growth probability of *L. monocytogenes*.

## MATERIALS AND METHODS

### Growth data of *L. monocytogenes*

Growth data of *L. monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products (milk, whey, cream), cheeses, meat products (beef, pork, chicken, turkey meats, deli meats) and seafood products (cold-smoked salmon, cold-smoked trout, marinated herring, cod, crawfish, tarama) were collected from published articles and from unpublished data (Table 1).

**Growth rates.** Maximum specific growth rates were estimated from published viable counts growth kinetics or were directly obtained in papers.

Maximum specific growth rates,  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ), estimated from published growth kinetics were obtained by fitting the logistic with delay growth model (Kono 1968; Broughall *et al.* 1983; Rosso *et al.* 1996; Augustin and Carlier 2000a; Pinon *et al.* 2004). Differences between estimations were often observed depending on the primary growth model used (Augustin and Carlier 2000a; McKellar and Lu 2004). The published growth rates were then corrected according to the primary model used to estimate them. As the logistic with delay growth model was chosen as the reference one, the maximum specific growth rates estimated with the Gompertz, logistic, Baranyi, and log-linear models were multiplied by the factors 0·84, 0·86, 0·97 and 1·00 respectively (Augustin and Carlier 2000a). A total of 588 growth

rates were obtained from 26 studies in microbiological media, 196 were obtained in liquid dairy products from 15 studies, 140 were obtained in cheeses from five studies, 306 were obtained in meat products from 17 studies, and 80 were obtained in seafood products from six studies.

**Growth/no-growth data.** Growth/no-growth data obtained by viable counts or by optical density were obtained from the literature. For these data, the following information was collected: the way to define the growth or the no-growth and the duration of the experimental period. When this information was not available, we assumed that the growth corresponded to at least, a doubling of the initial bacterial concentration within 30 days.

A total of 2724 growth/no-growth data were obtained in microbiological media from 39 studies, 196 were obtained in liquid dairy products from 15 studies, 144 were obtained in cheeses from five studies, 324 were obtained in meat products from 17 studies, and 80 were obtained in seafood products from six studies.

**Environmental factors.** The following factors were notified for each growth data: temperature, pH, main acid present in the medium, water activity, concentration of sodium nitrite, concentration of phenol, and proportion of  $\text{CO}_2$  in the modified atmosphere. We considered that the main acid in food products was lactic acid. Products containing intentionally added acid salts were not included in the present study.

When the water activity ( $a_w$ ) was not reported by the authors, it was estimated using the concentration of NaCl and the moisture of the food product according to the following equation (Resnik and Chirife 1988):  $a_w = 1 - 0\cdot0052471\text{WPS} - 0\cdot00012206\text{WPS}^2$ , where WPS is the water phase salt in %, i.e.  $\text{WPS} = 100 \times \% \text{NaCl} / (\% \text{moisture} + \% \text{NaCl})$  with NaCl being the NaCl concentration (w/v).

The undissociated sodium nitrite concentration, nit ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), was calculated using the following equation (Duffy *et al.* 1994):  $\text{nit} = (\text{nitrite} \times 1000/69\cdot01) / (10^{\text{pH} - 3\cdot37} + 1)$ , where nitrite is the concentration of total sodium nitrite ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

Although the inhibitory effect of  $\text{CO}_2$  was mainly due to the concentration of  $\text{CO}_2$  dissolved into the water phase of foods, we used the proportion of  $\text{CO}_2$  present in the gas mixtures of modified atmosphere packages. Indeed, the dissolved  $\text{CO}_2$  concentration depending greatly on the gas/product ratio (Devlieghere *et al.* 1998), it was not possible to accurately estimate these concentrations without information about these ratios so we used the proportion of  $\text{CO}_2$ , which was a simpler but certainly less accurate parameter. For vacuum packaging, the proportion was set to 0·3 (Beumer *et al.* 1996).

**Table 1** Growth/no-growth data used in the study for the performance evaluation of models describing the behaviour of *Listeria monocytogenes* in microbiological media and foods

Products	References	No. growth rates	No. growth/no-growth data
Liquid microbiological media	El-Shenawy and Marth (1988a,b) George <i>et al.</i> (1988) Ahamad and Marth (1989) Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990) Farber <i>et al.</i> (1989, 1992) Katoh (1989) Petran and Zottola (1989) Sorrells <i>et al.</i> (1989) Cole <i>et al.</i> (1990) Conner <i>et al.</i> (1990) Walker <i>et al.</i> (1990) Hart <i>et al.</i> (1991) McClure <i>et al.</i> (1991) Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991) Miller (1992) Nolan <i>et al.</i> (1992) Duh and Schaffner (1993) Oh and Marshall (1993) Brocklehurst <i>et al.</i> (1995) Bajard <i>et al.</i> (1996) Farber <i>et al.</i> (1996) Patchett <i>et al.</i> (1996) Fernández <i>et al.</i> (1997) McKellar <i>et al.</i> (1997) Membré <i>et al.</i> (1997) Robinson <i>et al.</i> (1998) Tienungoon <i>et al.</i> (2000) Devlieghere <i>et al.</i> (2001) Le Marc (2001), Le Marc <i>et al.</i> (2002) Pin <i>et al.</i> (2001) Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004) Uyttendaele <i>et al.</i> (2004) J.C. Augustin, unpublished data	14 0 6 141 0 12 14 0 0 0 0 26 3 0 0 9 0 0 8 6 3 20 43 2 17 39 13 25 0 0 23 39 0 22 103 26 30 19 21 14 16 12 12 2 12 12 5 6 12 9 16 121 2	12 80 2 66 806 4 9 24 18 6 26 2 993 44 4 6 4 5 2 12 43 1 20 10 20 7 50 48 85 39 182 22 72 26 30 19 21 14 16 12 12 2 12 5 6 9 20 121 2
Liquid dairy products	Donnelly and Briggs (1986) Rosenow and Marth (1987a,b) Marshall and Schmidt (1988) Ryser and Marth (1988) Schaack and Marth (1988) Papageorgiou and Marth (1989a) Pearson and Marth (1990) Walker <i>et al.</i> (1990) Buchanan and Klawitter (1991) El-Gazzar <i>et al.</i> (1991) Wang and Johnson (1992) Zapico <i>et al.</i> (1993) Bajard (1996) Murphy <i>et al.</i> (1996)	26 30 19 21 14 16 12 12 2 12 5 6 12 9	26 30 19 21 14 16 12 12 2 12 5 6 12 9
Cheese	Ryser and Marth (1987, 1989) Genigeorgis <i>et al.</i> (1991) Abdalla <i>et al.</i> (1993) P. Garry, personal communication	16 121 2 1	20 121 2 1

**Table 1** *Continued*

Products	References	No. growth rates	No. growth/no-growth data
Meat products	Kaya and Schmidt (1989)	3	3
	Grau and Vanderlinde (1990, 1992, 1993)	88	88
	Chen and Shelef (1992)	8	8
	Grant <i>et al.</i> (1993)	8	8
	Hudson and Mott (1993c), Hudson <i>et al.</i> (1994)	8	8
	Schlyter <i>et al.</i> (1993)	1	1
	Duffy <i>et al.</i> (1994)	53	53
	Greer and Dilts (1995)	2	2
	Dykes (2003)	22	22
	Stekelenburg (2003)	1	1
	Membré <i>et al.</i> (2004)	5	5
	Barmpalia <i>et al.</i> (2005)	2	2
	Zuliani <i>et al.</i> (2003)	64	64
	J.C. Augustin, unpublished data and P. Garry, personal communication	41	59
Seafood products	Peterson <i>et al.</i> (1993)	21	21
	Pelroy <i>et al.</i> (1994)	10	10
	Giménez and Dalgaard (2004)	5	5
	Cornu <i>et al.</i> (2003) and H. Bergis and M. Cornu, personal communication	44	44

## Growth models

**Growth rate models.** The evaluated growth rate models were on the general form:  $\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}}\tau(T)\rho(\text{pH})\alpha(a_w)\iota(\text{nit}, \text{phe}, \text{CO}_2)\xi(T, \text{pH}, a_w, \text{nit}, \text{phe}, \text{CO}_2)$ , where  $T$  is the temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $a_w$  is the water activity, nit is the undissociated concentration of sodium nitrite ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), phe is the phenol concentration (ppm), and  $\text{CO}_2$  is the  $\text{CO}_2$  proportion.  $\mu_{\text{opt}}$  is the optimal value of the maximum specific growth rate  $\mu_{\max}$  when  $T = T_{\text{opt}}$ ,  $\text{pH} = \text{pH}_{\text{opt}}$ ,  $a_w = a_{w,\text{opt}}$ ,  $\text{nit} = \text{phe} = \text{CO}_2 = 0$ .  $T_{\text{opt}}$ ,  $\text{pH}_{\text{opt}}$  and  $a_{w,\text{opt}}$  were arbitrarily set to  $37^{\circ}\text{C}$ , 7·1 and 0·997 respectively (Augustin and Carlier 2000a).  $\tau$  is a function describing the effect of temperature on  $\mu_{\max}$  in suboptimal conditions ( $T \leq 30^{\circ}\text{C}$ ),  $\rho$  is a function describing the effect of pH on  $\mu_{\max}$  in suboptimal conditions ( $\text{pH} \leq 7\cdot1$ ),  $\alpha$  is a function describing the effect of water activity on  $\mu_{\max}$  in suboptimal conditions ( $a_w \leq 0\cdot997$ ),  $\iota$  is a function describing the effect of nitrite, phenol and  $\text{CO}_2$  on  $\mu_{\max}$  and  $\xi$  is a function describing the interactions between the above environmental factors.

The functions describing the effect of temperature, pH, water activity, preservatives and their interactions on  $\mu_{\max}$ , and the growth rate models used are reported in Table 2. Two different models excluding interactions between environmental factors were evaluated: a cardinal parameter growth model (model #1) and a square root type growth model (model #2). Three different models including interactions between environmental factors were evaluated: a modified form of the cardinal model proposed by Augustin and Carlier (2000b) (model #3), an expanded form of the cardinal model proposed by Le Marc *et al.* (2002) (model #4) and a new model derived from the two previous ones

(model #5). This new model is based on the assumptions of Le Marc *et al.* (2002) regarding the effect of the interactions between environmental factors within the growth range of *L. monocytogenes* and keeps growth/no-growth boundaries on the form of the model proposed by Augustin and Carlier (2000b).

**Growth/no-growth models.** The growth rate models #1 to #5 were evaluated for their ability to describe the growth limits of *L. monocytogenes*. For these models, the growth and no growth were predicted according to the criteria used by the authors in their studies. For example, if the authors defined the growth as a  $1 \log_{10}$  increase of the initial bacterial concentration, the prediction of the model was considered as growth if it also predicted at least a  $1 \log_{10}$  increase during the length of the experiment. The increase of the population was predicted with the logistic with delay primary growth model by setting the lag time, 'lag' to  $2\cdot1/\mu_{\max}$  because  $2\cdot1$  was found to be the median ( $\mu_{\max,\text{lag}}$ )-value for the growth studies concerning *L. monocytogenes* (Augustin and Carlier 2000a).

Two models describing the probability of growth of *L. monocytogenes* as a function of the temperature, the pH and the water activity were evaluated (Table 2). The first one (model #6) was proposed by Tienungoon *et al.* (2000) for temperatures ranging from 3·1 to  $30^{\circ}\text{C}$ , pH ranging from 3·7 to 7·8, and water activities ranging from 0·928 to 0·995. The second one (model #7) was proposed by Koutsoumanis *et al.* (2004) for temperatures ranging from 4 to  $30^{\circ}\text{C}$ , pH ranging from 4·24 to 6·58 and water activities ranging from 0·900 to 0·993. For the evaluation of these probability models, we considered that growth or no growth were

**Table 2** Growth rate and growth/no-growth models evaluated in the study

Models	Equations	Descriptions	References
CM <sub>n</sub>	$CM_n(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{\min} \\ \frac{(X - X_{\min})^n}{(X_{\text{opt}} - X_{\min})^{n-1}} \left[ (X_{\text{opt}} - X_{\min})(X - X_{\min})^n - (X_{\text{opt}} - X_{\min})[(n-1)X_{\text{opt}} + X_{\min} - nX] \right], & X_{\min} < X < X_{\max} \end{cases}$	Effect of $T$ , pH and $a_w$ on $\mu_{\max}$	Rosso <i>et al.</i> (1995)
SR <sub>n</sub>	$SR_n(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{\min} \\ \left(\frac{X - X_{\min}}{X_{\text{opt}} - X_{\min}}\right)^n, & X_{\min} < X \leq X_{\text{opt}} \end{cases}$	Effect of $T$ , pH and $a_w$ on $\mu_{\max}$	Ratkowsky <i>et al.</i> (1982), Zwiering <i>et al.</i> (1991)
SR	$SR(c) = \begin{cases} 1 - \frac{c}{\text{MIC}}, & c < \text{MIC} \\ 0, & c \geq \text{MIC} \end{cases}$	Effect of preservatives on $\mu_{\max}$	Devleghere <i>et al.</i> (2001), Giménez and Dalgaard (2004)
P	$P(X) = \begin{cases} 0, & X \leq X_{\min} \\ \frac{1 - 10^{X_{\min} - X}}{1 - 10^{X_{\text{opt}} - X_{\min}}}, & X_{\min} < X \leq X_{\text{opt}} \end{cases}$	Effect of pH on $\mu_{\max}$	Presser <i>et al.</i> (1997), Tienungoon <i>et al.</i> (2000)
Interactions	$X_{i,\min} = X_{i,\text{opt}} - (X_{i,\text{opt}} - X_{i,\min}^0) \left[ \prod_j \left( \frac{1 - \epsilon_j}{\text{MIC}_j^0} \right) - \sum_{k \neq i} \left( \frac{X_{k,\min} - X_k}{Y_{k,\text{opt}} - Y_{k,\min}} \right)^3 \right]^{\frac{1}{3}}$	Effect of environmental factors on minimal cardinal values	Augustin and Carlier (2000b)
Interactions	$\text{MIC}_j = \text{MIC}_j^0 \left[ 1 - \frac{\sum_i \left( \frac{X_{i,\text{opt}} - X_i}{Y_{i,\text{opt}} - Y_{i,\min}} \right)^3}{\prod_i \left( \frac{1 - \epsilon_i}{\text{MIC}_i^0} \right)} \right]$	Effect of environmental factors on MICs	Augustin and Carlier (2000b)
Interactions	$\xi = \begin{cases} 1, & \psi \leq 0.5 \\ 2(1 - \psi), & 0.5 < \psi < 1 \\ 0, & \psi \geq 1 \end{cases}$	Effect of interactions between environmental factors on $\mu_{\max}$	Le Marc <i>et al.</i> (2002)
Interactions	$\phi_{LM}(T) = [1 - \sqrt{CM_2(T)}]^2$ , $\phi_{LM}(\text{pH}) = [1 - CM_1(\text{pH})]^2$ , $\phi_{LM}(a_w) = [1 - SR(a_w)]^3$	Contributions of environmental factors to the interactions	Le Marc (2001), Le Marc <i>et al.</i> (2002)
Model #1	$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \text{CM}_2(T) \text{CM}_1(\text{pH}) \text{SR}_{\text{I}}(a_w) \text{SR}(\text{nit}) \text{SR}(\text{phe}) \text{SR}(\text{CO}_2)$	Growth rate model excluding interactions	
Model #2	$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \text{SR}_2(T) P(\text{pH}) \text{SR}_{\text{I}}(a_w) \text{SR}(\text{nit}) \text{SR}(\text{phe}) \text{SR}(\text{CO}_2)$	Growth rate model including interactions	
Model #3	$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \text{CM}_2^0(T) \text{CM}_1^0(\text{pH}) \text{SR}_{\text{I}}^0(a_w) \text{SR}^0(\text{nit}) \text{SR}^0(\text{phe}) \text{SR}^0(\text{CO}_2)$	Growth rate model including interactions	
Model #4	$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \text{CM}_2(T) \text{CM}_1(\text{pH}) \text{SR}_{\text{I}}(a_w) \text{SR}(\text{nit}) \text{SR}(\text{phe}) \text{SR}(\text{CO}_2) \zeta(T, \text{pH}, a_w, \text{nit}, \text{phe}, \text{CO}_2)$	Growth rate model including interactions	
Model #5	$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \text{CM}_2(T) \text{CM}_1(\text{pH}) \phi_{LM}(\text{pH}), \phi_{LM}(a_w), \phi_{LM}(\text{nit}), \phi_{LM}(\text{phe}), \phi_{LM}(\text{CO}_2) \zeta(T, \text{pH}, a_w, \text{nit}, \text{phe}, \text{CO}_2)$ with $\phi_{LM}(T), \phi_{LM}(\text{pH}), \phi_{LM}(a_w), \phi_{LM}(\text{nit}), \phi_{LM}(\text{phe}), \phi_{LM}(\text{CO}_2)$	Growth rate model including interactions	
Model #6	$\ln\left(\frac{P}{1-P}\right) = b_0 + b_1 \ln(T - T_{\min}) + b_2 \ln^2(T - T_{\min}) + b_3 \ln[1 - \exp[0.536(T - 48)]] + b_4 \ln(a_w - a_{w,\min}) + b_5 \ln(1 - 10^{pH_{\min} - pH}) + b_6 \ln^2(1 - 10^{pH_{\min} - pH})$ $b_1 = 19.40, b_2 = -3.049, b_3 = 7514, b_4 = 4.635, b_5 = 141.0, b_6 = 240.2, T_{\min} = 0.4164,$ $a_{w,\min} = 0.9142, \text{pH}_{\min} = 3.350 \text{ for the strain Scott A, and } h_0 = -25.36, h_1 = 44.12,$ $b_2 = -7.022, b_3 = 102.57, b_4 = 8.951, b_5 = 291.8, b_6 = 704.1, T_{\min} = -1.623,$ $a_{w,\min} = 0.9152, \text{pH}_{\min} = 3.350 \text{ for the strain L-5}$	Growth probability model	Tienungoon <i>et al.</i> (2000)
Model #7	$\ln\left(\frac{P}{1-P}\right) = a_0 + a_1 T + a_2 \text{pH} + a_3 \sqrt{1 - a_w} + a_4 T \text{pH} + a_5 T \sqrt{1 - a_w} + a_6 \text{pH} \sqrt{1 - a_w}$ $+ a_7 T^2 + a_8 \text{pH}^2$ with $a_0 = -60.535, a_1 = 1.272, a_2 = 180.260, a_3 = 809.232, a_4 = 0.507,$ $a_5 = -4.411, a_6 = -183.674, a_7 = -0.065, a_8 = -11.460 \text{ for broth medium, and } a_0 = -516.908,$ $a_1 = 3.218, a_2 = 130.741, a_3 = 957.558, a_4 = 0, a_5 = -7.574, a_6 = -186.298, a_7 = -0.031,$ $a_8 = -6.667 \text{ for agar medium}$	Growth probability model	Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004)
Model #8	$P = \frac{1}{1 + \exp[\theta(b - \theta)]} \text{ with } \theta = 1 - \sum_j \left( \frac{X_{i,\text{opt}} - X_i}{X_{i,\text{opt}} - X_{i,\min}} \right)^3 - \sum_j \frac{a_i}{\text{MIC}_i}$	Growth probability model	

predicted when the growth probabilities were above 0·5 or below 0·5 respectively.

A new logistic function (model #8) was also proposed in this study to describe the growth probability of *L. monocytogenes* according to a function  $\theta$  which is linked to the effect of the environmental factors and their interactions on  $\mu_{\max}$  (Table 2). This function  $\theta$  varies from  $-\infty$  to approx. 0 within the no-growth domain and from approx. 0 to 1 within the growth domain.

### Estimation of model parameters

**Estimation of minimal cardinal values and minimal inhibitory concentrations.** Growth data obtained in liquid microbiological media were used to estimate the minimal temperature, the minimal pH for HCl and lactic acid, the minimal water activity ( $X_{i,\min}$ ) and the minimal inhibitory concentrations (MICs) for undissociated sodium nitrite, phenol and CO<sub>2</sub> (MIC<sub>j</sub>). We observed a greater variability according to the study considered rather than according to the *L. monocytogenes* strains in use. Therefore, we estimated one parameter value by study or author rather than one value by strain and by study. Mean values of the individual estimations were then used as estimations of the model parameter values.

**Estimation of optimal specific growth rates.** Optimal specific growth rates in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheeses, meat and seafood products were estimated by fitting the growth models with the previously estimated  $X_{i,\min}$ - and MIC<sub>j</sub>-values. The mean values of the individual estimations were adopted as estimations of the optimal specific growth rates.

**Estimation of growth probability model parameters.** Parameters of model #8 were estimated by fitting the model to observed growth probabilities of each study calculated on 0·05 intervals of  $\theta$ .

**Model fitting.** Fits were performed on the square root of  $\mu_{\max}$  to stabilize the variances of the residuals (Zwietering *et al.* 1990; Ratkowsky *et al.* 1991, 1996) by linear or non-linear regression using the least squares criterion. Growth probability model fits were performed by nonlinear regression. The minimum sums of the squared residuals were computed with the REGRESS and NLINFIT subroutines of MATLAB 7.0.1 software (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

### Performance evaluation of models

**Growth rate models.** The comparison of models describing the growth rate of *L. monocytogenes* relied on the calculation of bias ( $B_f$ ) and accuracy ( $A_f$ ) factors (Ross 1996)

from non-nil predicted and observed  $\mu_{\max}$ -values. For these comparisons, we used the mean values of indices giving the same weight to each study.

**Growth/no-growth models.** The comparison of models describing the growth/no growth of *L. monocytogenes* relied on the calculation of correct prediction percentage (CPP) representing the percentage of all cases that were correctly predicted (Hajmeer and Basheer 2003). For this evaluation, observations obtained near the growth/no-growth interface were only used. The tested conditions were characterized by  $\theta$ -values within the range [-0·75; +0·75]. All models accurately predicted growth/no growth outside this range, except probability models #6 and #7. The predictive values of the models were also specified. The positive predictive value, PPV, is the probability that growth actually occurs when growth is predicted by the model: PPV = 100 × [TG/(TG + FG)], and the negative predictive value, NPV, is the probability that no growth occurs when no growth is predicted by the model: NPV = 100 × [TNG/(TNG + FNG)], where TG (true growth) is the number of cases where the model correctly predicts growth, TNG (true no growth) is the number of cases where the model correctly predicts no growth, FG (false growth) is the number of cases where the model incorrectly predicts growth while no growth is observed, and FNG (false no growth) is the number of cases where the model incorrectly predicts no growth while growth is observed.

### Validation of the growth rate and growth/no-growth models for *L. monocytogenes* in food products

Additional growth data obtained in food under suboptimal conditions were used for validation of the selected models. These data were only used for validation because some food characteristics were not specified in the published articles, or because growth rates were estimated from only few counts leading to a great uncertainty on the estimations. In these cases, arbitrarily values were set for the lacking characteristics. A total of 196 growth rates issued from 38 studies (21 for cheeses, 128 for meat products and 47 for seafood products), plus 18 growth/no-growth data obtained in meat products were available for the validation step.

## RESULTS

### Minimal cardinal values and MICs

The minimal cardinal values and the MICs of *L. monocytogenes* in microbiological media obtained with the different growth models are shown in Table 3. Minimal cardinal values could not be obtained using the models excluding

**Table 3** Minimal cardinal values and minimal inhibitory concentrations (MIC) of *Listeria monocytogenes* estimated in liquid microbiological media

Parameters	Models					References
	#1	#2	#3	#4	#5	
$T_{\min}$ (°C)	1.79	1.58	-0.75	0.22	-0.02	El-Shenawy and Marth (1988a,b)
n.a.*	n.a.		-1.48	-1.50	-1.47	George <i>et al.</i> (1988)
-2.42	-3.29		-2.42	-2.42	-2.42	Ahamad and Marth (1989)
-1.29	-2.22		-2.86	-1.30	-1.77	Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990)
n.a.	n.a.		-4.39	-4.96	-5.31	Farber <i>et al.</i> (1989, 1992)
-1.26	-2.43		-1.55	-1.26	-1.26	Katoh (1989)
1.45	-0.19		1.46	1.45	1.45	Petran and Zottola (1989)
n.a.	n.a.		-8.56	-11.11	-9.01	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
n.a.	n.a.		1.91	1.19	1.91	Cole <i>et al.</i> (1990)
-2.77	-2.82		-3.09	-2.88	-3.11	Walker <i>et al.</i> (1990)
-1.86	-2.00		-1.86	-1.86	-1.86	Hart <i>et al.</i> (1991)
n.a.	n.a.		3.30	4.59	3.77	McClure <i>et al.</i> (1991)
n.a.	n.a.		0.19	-0.53	0.19	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
-0.75	-1.67		-0.75	-0.75	-0.75	Duh and Schaffner (1993)
-2.45	-2.75		-4.80	-3.82	-4.04	Oh and Marshall (1993)
-2.36	-2.71		-2.36	-2.36	-2.36	Bajard <i>et al.</i> (1996)
-1.33	-1.46		-4.23	-2.72	-3.91	Farber <i>et al.</i> (1996)
0.90	1.01		-7.04	-2.50	-3.51	Fernández <i>et al.</i> (1997)
-0.54	-1.93		-0.54	-0.54	-0.54	McKellar <i>et al.</i> (1997)
1.37	-1.36		0.74	1.25	1.28	Robinson <i>et al.</i> (1998)
n.a.	n.a.		-2.51	-1.83	-2.08	Tienungoon <i>et al.</i> (2000)
-0.93	-1.47		-2.29	-1.39	-1.73	Le Marc (2001), Le Marc <i>et al.</i> (2002)
-2.43	-2.56		-3.49	-2.68	-3.14	Pin <i>et al.</i> (2001)
n.a.	n.a.		-2.09	-3.03	-1.96	Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004)
-1.27	-1.90		-1.27	-1.27	-1.27	J.C. Augustin, unpublished data
Mean	-0.95	-1.66	-2.03	-1.68	-1.72	
SD	1.49	1.33	2.63	2.78	2.55	
pH <sub>min</sub> HCl	3.84	4.53	3.65	4.01	3.93	El-Shenawy and Marth (1988a,b)
	4.65	4.65	4.28	4.38	4.31	George <i>et al.</i> (1988)
	4.27	4.44	4.07	4.25	4.24	Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990)
	4.79	4.79	4.46	4.67	4.67	Farber <i>et al.</i> (1989, 1992)
	4.55	4.65	4.52	4.55	4.55	Petran and Zottola (1989)
	n.a.	n.a.	4.36	4.40	4.53	McClure <i>et al.</i> (1991)
	4.45	4.79	3.72	4.23	4.20	Oh and Marshall (1993)
	4.03	4.30	3.94	3.93	3.94	Brocklehurst <i>et al.</i> (1995)
	4.42	5.05	3.26	4.33	3.85	Farber <i>et al.</i> (1996)
	4.84	4.92	4.16	4.48	4.28	Fernández <i>et al.</i> (1997)
	4.21	4.61	4.20	4.21	4.21	Robinson <i>et al.</i> (1998)
	4.58	4.58	4.27	4.38	4.32	Tienungoon <i>et al.</i> (2000)
	4.59	4.82	4.20	4.31	4.28	Le Marc (2001), Le Marc <i>et al.</i> (2002)
	4.45	4.45	4.37	4.50	4.37	Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004)
Mean	4.44	4.66	4.10	4.33	4.26	
SD	0.29	0.21	0.35	0.20	0.24	
pH <sub>min</sub> lactic acid	5.04	5.04	4.82	4.93	4.91	Farber <i>et al.</i> (1989, 1992)
	4.61	4.61	4.51	4.53	4.51	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
Mean	4.83	4.83	4.67	4.73	4.71	
SD	0.30	0.30	0.22	0.28	0.28	

**Table 3** *Continued*

Parameters	Models					References
	#1	#2	#3	#4	#5	
$a_{w\min}$	0.894	0.889	0.884	0.895	0.892	Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990)
	0.924	0.924	0.914	0.919	0.921	Farber <i>et al.</i> (1989, 1992)
	0.927	0.927	0.911	0.911	0.911	Cole <i>et al.</i> (1990)
	n.a.	n.a.	0.946	0.953	0.939	McClure <i>et al.</i> (1991)
	0.925	0.925	0.910	0.91	0.910	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
	0.914	0.914	0.914	0.914	0.914	Miller (1992)
	0.921	0.921	0.919	0.919	0.919	Nolan <i>et al.</i> (1992)
	0.935	0.931	0.899	0.912	0.917	Fernández <i>et al.</i> (1997)
	0.918	0.883	0.911	0.917	0.918	Robinson <i>et al.</i> (1998)
	0.914	0.914	0.894	0.895	0.893	Koutsoumanis <i>et al.</i> (2004)
Mean	0.919	0.914	0.910	0.915	0.913	
SD	0.012	0.017	0.017	0.016	0.014	
MIC <sub>nit</sub> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	13.3	11.5	19.7	13.2	14.1	Buchanan <i>et al.</i> (1989), Buchanan and Klawitter (1990), Buchanan and Phillips (1990)
Mean	n.a.	n.a.	80.9	22.1	35.9	McClure <i>et al.</i> (1991)
	13.3	11.5	50.3	17.7	25.0	
	—	—	43.3	6.3	15.4	
MIC <sub>phe</sub> (ppm)	18.2	18.2	30.8	23.5	31.9	Membré <i>et al.</i> (1997)
MIC <sub>CO<sub>2</sub></sub>	1.24	1.24	3.15	1.65	2.21	Farber <i>et al.</i> (1996)
	1.22	1.27	3.14	1.70	3.80	Fernández <i>et al.</i> (1997)
	1.72	1.72	5.92	1.97	3.11	Pin <i>et al.</i> (2001)
Mean	1.39	1.41	4.07	1.77	3.04	
SD	0.28	0.27	1.60	0.17	0.80	

\*Not applicable.

interactions when data sets obviously showed large interactions between environmental factors. The variability of  $T_{\min}$ - and pH<sub>min</sub>-values was relatively low with standard deviations (SDs) representing between 3 and 6% of the growth ranges [ $100 \times \text{SD}/(X_{\max} - X_{\min})$ ]. On the contrary, the variability of  $a_{w\min}$ - and MIC-values was greater. The SDs of  $a_{w\min}$ -values represented between 14 and 20% of the growth range and the SDs of MIC<sub>nit</sub> and MIC<sub>CO<sub>2</sub></sub> represented between 10 and 85% of the growth ranges.

### Optimal specific growth rates

Mean values of the optimal specific growth rates obtained in the different media are shown in Table 4. It was observed that the predictions in seafood products were better by ignoring the concentration of phenol, therefore the  $\mu_{\text{opt}}$ -values presented in Table 4 were estimated by assuming that no phenol was present in these products. The variability of  $\mu_{\text{opt}}$ -values depended on the product under consideration. This variability was low in liquid microbiological media, dairy products and seafood products with coefficients of

variation [100 × (SD/mean)] varying between 15 and 25%. The variability was greater for meat products (30–50%) and was very high in cheese with a coefficient of variation approximating 90%. The individual optimal specific growth rates observed in cheeses are shown in Table 5.

### Evaluation of the model performances

We could observe that the average performances of the tested growth rate models were very close (Table 6). Except for the cheese, bias factors were close to one indicating no over- or under-predictions of the models, which was coherent as the estimations of the model parameters were performed with the same data sets. Accuracy factors varied from 1.3 to 1.5 indicating that predicted growth rate were, on average, different from 30 to 50% compared with the observed ones. The cardinal model including interactions #3 proposed by Augustin and Carlier (2000b) underestimated the growth rates with average bias factors greater than 1, this phenomenon was already pointed out by Cornu *et al.* (2003) and Giménez and Dalgaard (2004) in cold-smoked

**Table 4** Optimal specific growth rates ( $\text{h}^{-1}$ ) of *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheese, meat and seafood products

Products	<i>n</i> *	Models [mean (SD)]					
		#1	#2	#3	#4	#5	#5bis†
Microbiological media	21	1.154 (0.185)	1.423 (0.252)	1.132 (0.277)	1.075 (0.167)	1.047 (0.173)	1.004 (0.218)
Liquid dairy products	14	0.818 (0.150)	1.012 (0.186)	0.746 (0.142)	0.745 (0.131)	0.742 (0.132)	0.742 (0.132)
Cheese	20‡	0.244 (0.213)	0.272 (0.240)	0.257 (0.240)	0.215 (0.189)	0.212 (0.187)	0.212 (0.187)
Meat products	13	1.372 (0.434)	1.547 (0.478)	1.668 (0.857)	1.165 (0.329)	1.168 (0.348)	1.036 (0.318)
Seafood products	4	0.729 (0.164)	0.834 (0.203)	0.844 (0.276)	0.608 (0.120)	0.565 (0.116)	0.480 (0.090)

\*Number of studies.

†Model #5bis is the simplified form of model #5 where inhibitory substances are ignored.

‡Number of cheese.

**Table 5** Optimal specific growth rates ( $\text{h}^{-1}$ ) estimated for *Listeria monocytogenes* in cheese

References	Cheese	Models				
		#1	#2	#3	#4	#5
Ryser and Marth (1987)	Camembert	0.671	0.740	0.801	0.558	0.547
Ryser and Marth (1989)	Brick	0.033	0.030	0.061	0.029	0.028
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Brie (centre)	0.255	0.261	0.247	0.245	0.243
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Brie (centre)	0.410	0.504	0.388	0.393	0.390
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Brie (surface)	0.095	0.125	0.080	0.082	0.081
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Camembert (centre)	0.161	0.211	0.134	0.138	0.136
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Camembert (surface)	0.110	0.144	0.091	0.094	0.093
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Cottage cheese	0.193	0.120	0.119	0.135	0.116
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso fresco	0.021	0.026	0.020	0.020	0.020
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso fresco	0.025	0.029	0.024	0.023	0.022
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso fresco	0.066	0.074	0.061	0.062	0.061
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso panella	0.546	0.655	0.520	0.527	0.522
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso panella	0.049	0.058	0.047	0.047	0.047
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso panella	0.078	0.086	0.076	0.074	0.073
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Queso ranchero	0.449	0.488	0.436	0.425	0.420
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Ricotta	0.452	0.486	0.445	0.435	0.433
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Ricotta	0.458	0.486	0.565	0.390	0.390
Genigeorgis <i>et al.</i> (1991)	Teleme	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
Abdalla <i>et al.</i> (1993)	White pickle	0.542	0.605	0.590	0.419	0.408
P. Garry, personal communication	Emmental	0.250	0.290	0.415	0.199	0.188
Mean		0.244	0.272	0.257	0.215	0.212
SD		0.213	0.240	0.240	0.189	0.187

salmon. The predictions of the growth models in cheese were poor: although the bias factors were close to 1, the accuracy factors were very high with values approximating 3.5 on average.

In microbiological media, the best CPPs (Table 7) were observed with the two cardinal models including interactions #4 and #5, and with the probability model #7 proposed by Koutsoumanis *et al.* (2004). In food products (except for cheese), the model performances were close with average CPPs >90%. The high PPVs of all models indicated a good growth prediction of them, but the cardinal models

including interactions #4 and #5 and the probability model #7 showed the best NPVs for microbiological media, indicating better confidence in no-growth predictions. The good predictive value of the probability model #7 that only accounted for temperature, pH and water activity challenged the need to include the effects of nitrite, phenol and CO<sub>2</sub> in the proposed models. In cheeses, the CPPs were of approx. 50% and were characterized by large SDs indicating a great variability from one study to another. However, high NPVs were obtained for these products, suggesting a relative confidence in no-growth predictions.

**Table 6** Bias ( $B_f$ ) and accuracy ( $A_f$ ) factors of growth rate models for *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheese, meat and seafood products

Products	n*	$B_f$ [mean (SD)]					$A_f$ [mean (SD)]					
		#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#3	#4	#5	#5bis
Microbiological media	22	1·08 (0·26)	1·03 (0·23)	1·18 (0·26)	1·02 (0·20)	1·03 (0·19)	1·00 (0·25)	1·36 (0·22)	1·30 (0·14)	1·49 (0·33)	1·32 (0·12)	1·35 (0·17)
Liquid dairy products	14	1·10 (0·34)	1·06 (0·27)	1·18 (0·62)	1·05 (0·28)	1·06 (0·29)	1·06 (0·29)	1·39 (0·31)	1·33 (0·23)	1·53 (0·59)	1·36 (0·22)	1·38 (0·23)
Cheese	20‡	0·96 (0·90)	0·96 (0·93)	0·99 (0·96)	0·92 (0·86)	0·91 (0·86)	0·91 (0·86)	3·46 (2·48)	3·58 (2·68)	3·62 (2·41)	3·41 (2·32)	3·42 (2·32)
Meat products	14	1·05 (0·34)	1·04 (0·34)	1·24 (0·63)	1·04 (0·32)	1·10 (0·35)	1·03 (0·33)	1·41 (0·21)	1·39 (0·21)	1·85 (0·34)	1·38 (0·18)	1·46 (0·24)
Seafood products	4	0·98 (0·29)	0·97 (0·30)	1·14 (0·46)	0·96 (0·26)	1·00 (0·29)	1·00 (0·27)	1·47 (0·22)	1·48 (0·24)	1·68 (0·28)	1·44 (0·20)	1·46 (0·20)

\* Number of studies.

†Model #5bis is the simplified form of model #5 where inhibitory substances are ignored.

‡Number of cheese.

Although the models excluding interactions between environmental factors #1 and #2 seemed adapted to predict the growth rate, they were less accurate for the growth/no-growth prediction. Two models were then selected to predict the growth of *L. monocytogenes* in food, the new cardinal model including interactions #5 for the growth rate and the growth/no-growth prediction and the probability model #7 for the growth/no-growth prediction. The new cardinal model #5 was preferred to the cardinal model #4 because its analytical form was simpler.

## Performance characterization of the selected models

**Growth rate prediction.** The performance of the new cardinal model including interactions #5 was assessed within the growth range of *L. monocytogenes* according to the function  $\theta$ , which was chosen to quantify the effect of environmental factors on the growth rate. Figure 1 shows the evolution of the average bias and accuracy factors of the model in liquid microbiological media according to the values of  $\theta$ . A significant increase of the bias factor was observed when  $\theta$  decreased to 0, i.e. near the growth limits. This phenomenon was explained by the fact that the bias factor could not account for null growth rates. Therefore, only non-nil observed growth rates were used in this region leading to an apparent underestimation of the model predictions. An increase of the average accuracy factor was observed when  $\theta$  decreased, signifying less accurate predictions when growth limits were approached. This index was difficult to use to define confidence intervals for predicted growth rates because it was not possible to use it when the predicted growth rate was null. To define confidence limits for predictions and to overpass the difficulties linked to the use of the classical bias and accuracy factors, we used the model parameter estimations distributions to estimate lower and upper confidence limits for the predicted growth rates. We assumed that the minimal cardinal values and the MICs were normally distributed and that the optimal specific growth rates followed a gamma distribution (Pouillot *et al.* 2003). The distribution expectations were set to the mean of the observed values (Table 3), that was  $-1\cdot72^\circ\text{C}$  for  $T_{\min}$ , 4·26 for  $\text{pH}_{\min}$  HCl, 4·71 for  $\text{pH}_{\min}$  lactic acid, 0·913 for  $a_w \min$ ,  $25\cdot0 \mu\text{mol l}^{-1}$  for  $\text{MIC}_{\text{nit}}$ ,  $31\cdot9 \text{ ppm}$  for  $\text{MIC}_{\text{phe}}$ , and 3·04 for  $\text{MIC}_{\text{CO}_2}$ . The distribution SDs were set according to the variability of the parameter estimations observed. The variability of  $T_{\min}$  and  $\text{pH}_{\min}$  was assumed to be equal to 5% of the growth range [ $\text{SD}/(X_{\max}-X_{\min}) = 0\cdot05$ ]. The SDs for  $T_{\min}$ ,  $\text{pH}_{\min}$  HCl and  $\text{pH}_{\min}$  lactic acid were then set to  $2\cdot34^\circ\text{C}$ , 0·27 and 0·25 respectively. The variability of  $a_w \min$  was assumed to be 15%, so, the SD was set to 0·013. The variability of MIC-values was assumed to be 60% for nitrite and 30% for phenol and  $\text{CO}_2$ , so the SDs for  $\text{MIC}_{\text{nit}}$ ,

**Table 7** Correct prediction percentages (CPP), positive predictive values (PPV), and negative predictive values (NPV) of growth/no-growth models for *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheese, meat and seafood products

Products	<i>n</i> *	Indices	Models [mean (SD)]							
			#1	#2	#3	#4	#5	#6†	#7‡	#5bis§
Microbiological media	33	CPP (%)	85.1 (17.1)	85.7 (16.4)	86.0 (15.0)	89.5 (14.3)	90.3 (12.9)	83.5 (18.5)	89.1 (16.7)	88.6 (16.2)
		PPV (%)	92.2 (11.9)	92.0 (12.8)	94.0 (12.4)	95.3 (10.3)	94.4 (11.9)	89.5 (18.2)	88.0 (18.3)	92.1 (15.5)
		NPV (%)	62.1 (38.5)	62.0 (34.4)	58.7 (37.2)	67.5 (34.5)	70.9 (34.4)	65.1 (38.6)	90.7 (21.0)	78.2 (30.6)
Liquid dairy products	14	CPP (%)	99.1 (3.3)	100.0 (0.0)	98.2 (6.7)	98.2 (6.7)	99.1 (3.3)	98.2 (6.7)	98.2 (6.7)	99.1 (3.3)
		PPV (%)	100.0 (0.0)	96.4 (13.4)	98.6 (5.3)	98.6 (5.3)	98.6 (5.3)	100.0 (0.0)	97.6 (8.9)	98.6 (5.3)
		NPV (%)	100.0 (–)	–	100.0 (–)	100.0 (–)	100.0 (–)	50.0 (70.7)	100.0 (–)	100.0 (–)
Cheese	49¶	CPP (%)	53.4 (46.1)	54.1 (46.6)	56.1 (40.5)	57.5 (40.3)	56.8 (40.4)	54.4 (36.6)	63.3 (37.6)	56.8 (40.4)
		PPV (%)	45.2 (45.9)	45.9 (46.6)	39.1 (46.7)	39.4 (46.8)	39.4 (46.8)	40.3 (45.6)	40.9 (47.0)	39.4 (46.8)
		NPV (%)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	83.3 (36.5)	84.1 (35.8)	84.1 (35.8)	79.3 (41.2)	86.0 (33.9)	84.1 (35.8)
Meat products	14	CPP (%)	90.7 (14.6)	90.3 (15.5)	93.6 (9.1)	91.2 (14.2)	91.0 (14.3)	90.1 (14.8)	91.9 (14.7)	90.7 (14.4)
		PPV (%)	92.2 (15.1)	91.0 (15.1)	96.8 (6.5)	93.4 (13.9)	93.5 (13.9)	92.2 (15.0)	94.1 (14.0)	92.2 (14.9)
		NPV (%)	73.1 (38.8)	58.3 (50.0)	59.9 (44.2)	68.8 (39.7)	67.2 (40.0)	67.1 (37.8)	69.3 (33.4)	71.7 (41.5)
Seafood products	4	CPP (%)	97.7 (4.5)	97.7 (4.5)	91.0 (10.5)	98.3 (3.4)	98.3 (3.4)	92.7 (9.5)	98.9 (2.3)	98.3 (3.4)
		PPV (%)	97.7 (4.5)	97.7 (4.5)	98.1 (3.8)	98.3 (3.5)	98.3 (3.5)	97.7 (4.5)	98.8 (2.4)	98.3 (3.5)
		NPV (%)	–	–	10.0 (14.1)	100.0 (–)	50.0 (70.7)	0.0 (–)	100.0 (–)	100.0 (–)

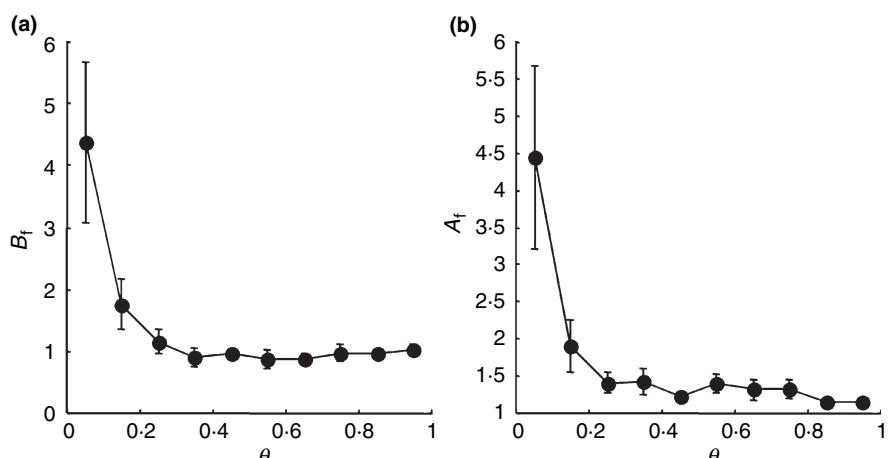
\*Number of studies.

†Strain L5 parameters for microbiological media, dairy, meat and seafood products, and Scott A parameters for cheeses.

‡Broth parameters for microbiological media and liquid dairy products and agar parameters for solid food.

§Model #5bis is the simplified form of model #5 where inhibitory substances are ignored.

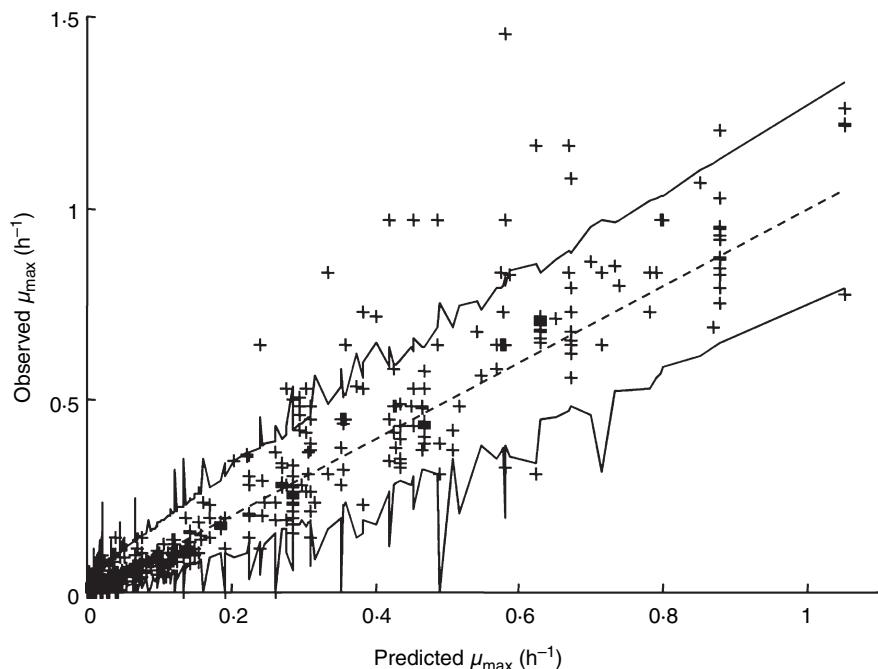
¶Number of cheese.



**Fig. 1** Evolution of the (a) bias ( $B_f$ ) and (b) accuracy ( $A_f$ ) factors of the new cardinal model including interactions #5 within the growth range of *Listeria monocytogenes* in microbiological media. Plotted points are the mean values and vertical bars indicate 1 SD

$MIC_{phe}$  and  $MIC_{CO_2}$  were set to  $15.0 \mu\text{mol l}^{-1}$ ,  $9.6 \text{ ppm}$ , and  $0.91$  respectively. The optimal specific growth rates in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheeses, meat and seafood products were characterized by means (Table 4) of  $1.05$ ,  $0.74$ ,  $0.21$ ,  $1.17$ , and  $0.57 \text{ h}^{-1}$  and the SDs were rounded to  $0.21$ ,  $0.15$ ,  $0.21$ ,  $0.35$  and  $0.11 \text{ h}^{-1}$  respectively. These mean values and SDs corresponded to the following parameters of gamma distributions:  $\alpha = 25.00$  and  $= 0.0420$ ,  $\alpha = 24.34$  and  $\beta = 0.0304$ ,  $\alpha = 1.00$  and  $\beta = 0.2100$ ,  $\alpha = 11.87$  and  $\beta = 0.1047$ ,  $\alpha = 26.85$  and

$\beta = 0.0212$  for microbiological media, dairy products, cheeses, meat and seafood products respectively. By using the 10th and 90th percentiles of the distributions of model parameters (Figs 2 and 3), we could hold approx. 95% of the observed maximum specific growth rates (null values included). 95% confidence limits for the growth rate of *L. monocytogenes* could then be proposed by using the following parameter values: (i) for the lower limits:  $T_{min} = 1.28^\circ\text{C}$ ,  $pH_{min} \text{ HCl} = 4.61$ ,  $pH_{min} \text{ lactic acid} = 5.03$ ,  $a_w \text{ min} = 0.930$ ,  $MIC_{nit} = 5.8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ,  $MIC_{phe} =$



**Fig. 2** Plots of observed maximum specific growth rates for *Listeria monocytogenes* in microbiological media against predicted growth rates with the new cardinal model including interactions #5. The dotted line represents the perfect adequacy between observations and predictions and the solid lines represent the confidence limits of the predictions

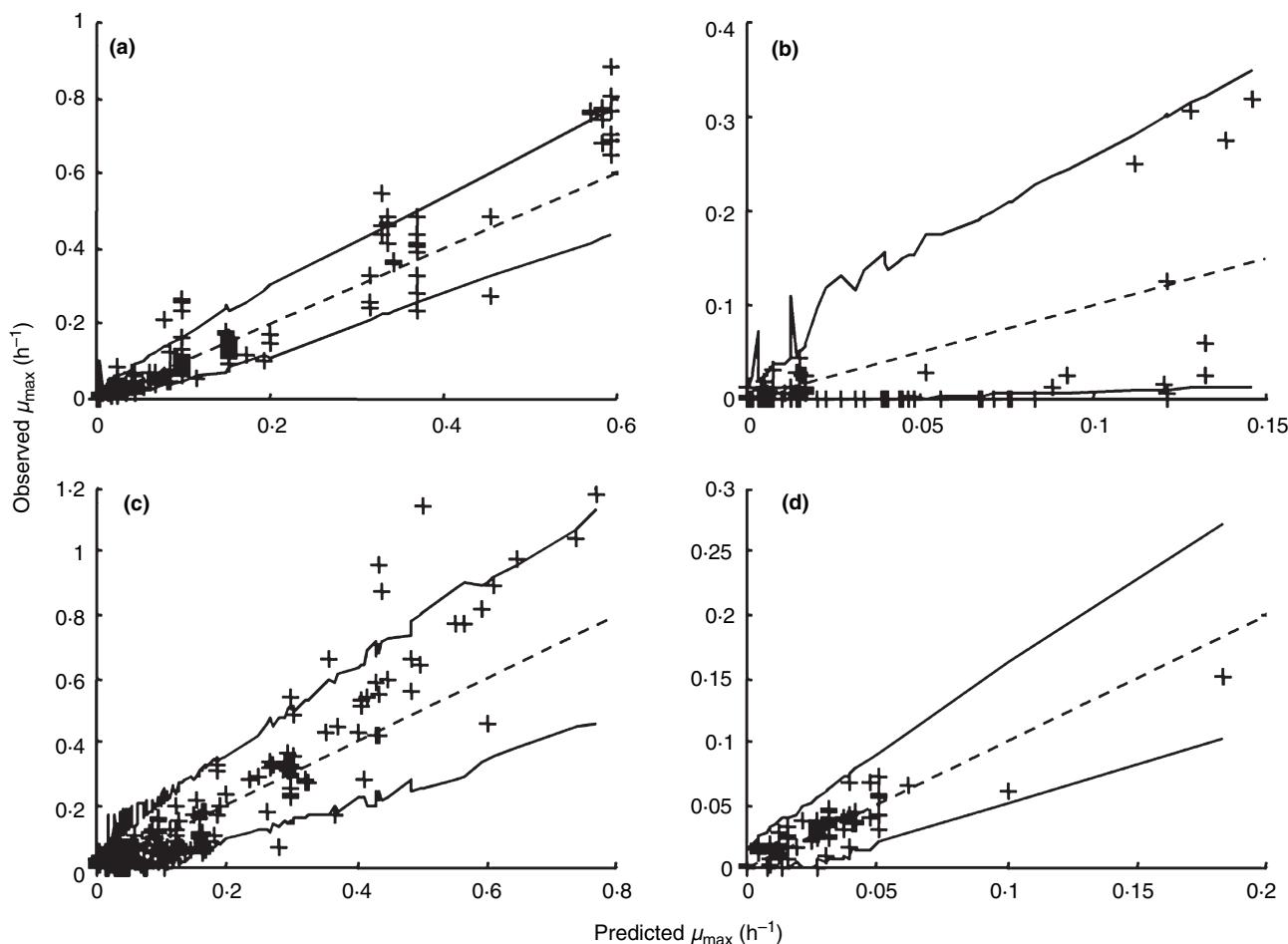
19.6 ppm,  $MIC_{CO_2} = 1.87$ , microbiological media  $\mu_{opt} = 0.79 \text{ h}^{-1}$ , liquid dairy products  $\mu_{opt} = 0.56 \text{ h}^{-1}$ , cheese  $\mu_{opt} = 0.02 \text{ h}^{-1}$ , meat products  $\mu_{opt} = 0.75 \text{ h}^{-1}$ , seafood products  $\mu_{opt} = 0.43 \text{ h}^{-1}$ , (ii) for the upper limits:  $T_{min} = -4.72^\circ\text{C}$ ,  $pH_{min} \text{ HCl} = 3.91$ ,  $pH_{min} \text{ lactic acid} = 4.39$ ,  $a_w \text{ min} = 0.896$ ,  $MIC_{nit} = 44.2 \mu\text{mol l}^{-1}$ ,  $MIC_{phe} = 44.2 \text{ ppm}$ ,  $MIC_{CO_2} = 4.21$ , microbiological media  $\mu_{opt} = 1.33 \text{ h}^{-1}$ , liquid dairy products  $\mu_{opt} = 0.94 \text{ h}^{-1}$ , cheese  $\mu_{opt} = 0.48 \text{ h}^{-1}$ , meat products  $\mu_{opt} = 1.63 \text{ h}^{-1}$ , seafood products  $\mu_{opt} = 0.71 \text{ h}^{-1}$ .

**Growth/no-growth prediction.** The average positive and NPVs of the new cardinal model including interactions #5 are reported in Table 8. We could observe that PPV and NPV for growth data in the predicted growth domain near the growth limits were complementary. Indeed, although we were in the growth domain, no growth could be predicted because of the criteria used to define the growth (large bacterial population increase and/or short duration of observation). As PPV and NPV were complementary, we only referred to the PPV to predict the growth/no growth. The evolution of the average of the PPV (i.e. growth probability) with  $\theta$  is shown in Fig. 4. The estimated parameters of the model #8 describing the growth probability with  $\theta$  were  $a = 11.1$  (95% confidence interval [8.9; 13.3]),  $b = 0.019$  (95% confidence interval [0.000; 0.039]).

As a great variability of the PPV was observed according to the data sets (Fig. 4), we proposed the following method to obtain reliable growth/no-growth predictions. An average

CPP value of 92.3% was obtained for liquid microbiological media, by using the model #8 to predict the growth probability of *L. monocytogenes* and by considering that growth or no growth occurred when the probability was above 0.5 or below 0.5 respectively. This average CPP value increased to 97.0% when using the following decision rule: growth was predicted when the growth probability was above 0.9 and no growth was predicted when the growth probability was below 0.1. The performances of this method are reported in Table 9. The drawback of this rule was that predictions were available for only 74% of the data. The space defined by environmental factors could then be divided into three parts: a reliable no-growth domain, a reliable growth domain, and an uncertain domain. The performances of the method for dairy products, cheese, meat and seafood products are reported in Table 9. No NPV could be calculated for seafood products because the absence of growth was never predicted by the model. The low NPV obtained for meat products was in fact only linked to two false no-growth predictions. By giving the same weight to each data, we obtained an NPV of 96.7% (two false no growth for 26 no-growth predictions). The rule seemed then usable for dairy products, meat and seafood products. The predictive performances were poor in cheese, but the model could be used for no-growth prediction in the cheese.

**Simplification of the new cardinal model including interactions.** Because of the good performance of the probability model #7, we evaluated the need to take into



**Fig. 3** Plots of observed maximum specific growth rates for *Listeria monocytogenes* in (a) liquid dairy products, (b) cheese, (c) meat, and (d) seafood products against predicted growth rates with the new cardinal model including interactions #5. The dotted line represents the perfect adequacy between observations and predictions and the solid lines represent the confidence limits of the predictions

account preservatives encountered in food for the growth prediction of *L. monocytogenes*. New estimations were then performed with the cardinal model including interactions #5 by deducting nitrite, phenol and  $\text{CO}_2$  (model #5bis). The cardinal values previously estimated were conserved and new  $\mu_{\text{opt}}$  mean values (and SDs) were estimated (Table 4). The performances of the simplified model were very close from the ones obtained with the complete model (Tables 6 and 7). In microbiological media, the lower PPV (Table 7) was due to the high concentrations of nitrite used in some experiments where no growth was observed. Therefore, the simplified model was adapted for the growth prediction of *L. monocytogenes* in food products.

Growth rate confidence limits were defined using the same approach as previously described. The following  $\mu_{\text{opt}}$ -values ( $\text{h}^{-1}$ ) were proposed for the lower and upper limits in microbiological media, meat and seafood products: [0·74; 1·28], [0·66; 1·47], [0·36; 0·61] respectively. The  $\mu_{\text{opt}}$ -values

for liquid dairy products and cheese were the same as in the complete model (no preservatives added in these products).

The study of the predictive values of the simplified model gave the same type of results as with the complete model (Fig. 5). The estimated parameters of the model #8bis describing the evolution of the growth probability with the function  $\theta_{\text{TPA}}(\theta)$  where  $c_j = 0$  were  $a = 10·2$  (95% confidence interval [8·0; 12·5]),  $b = 0·037$  (95% confidence interval [0·012; 0·062]).

When using the decision rule previously defined (growth and no-growth prediction when the growth probability was above 0·9 and below 0·1 respectively), the performances of the simplified model #8bis (Table 9) were inferior to the ones of the complete model #8 in microbiological media because of the presence of high preservative concentrations, however, the performances were equivalent for food products. The growth/no-growth predictive value of the prob-

$\theta$	CPP (%)		PPV (%)		NPV (%)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<-0.75	100.0	0.0	—	—	100.0	0.0
[-0.75; -0.70]	95.0	11.2	—	—	95.0	11.2
[-0.70; -0.65]	100.0	0.0	—	—	100.0	0.0
[-0.65; -0.60]	90.7	13.5	—	—	90.7	13.5
[-0.60; -0.55]	91.7	16.7	—	—	91.7	16.7
[-0.55; -0.50]	92.9	18.9	—	—	92.9	18.9
[-0.50; -0.45]	100.0	0.0	—	—	100.0	0.0
[-0.45; -0.40]	97.6	6.3	—	—	97.6	6.3
[-0.40; -0.35]	94.3	15.1	—	—	94.3	15.1
[-0.35; -0.30]	100.0	0.0	—	—	100.0	0.0
[-0.30; -0.25]	94.2	10.2	—	—	94.2	10.2
[-0.25; -0.20]	65.8	41.0	—	—	65.8	41.0
[-0.20; -0.15]	87.2	29.4	—	—	87.2	29.4
[-0.15; -0.10]	82.0	29.9	—	—	82.0	29.9
[-0.10; -0.05]	90.0	17.7	—	—	90.0	17.7
[-0.05; 0.00]	67.1	38.2	—	—	67.1	38.2
[0.00; 0.05]	46.2	37.7	63.3	41.5	47.0	39.3
[0.05; 0.10]	49.9	42.0	70.8	43.9	26.5	41.8
[0.10; 0.15]	57.4	37.9	67.5	39.7	20.8	40.1
[0.15; 0.20]	71.0	39.2	82.5	34.2	7.5	15.0
[0.20; 0.25]	90.8	22.5	92.2	22.2	0.0	0.0
[0.25; 0.30]	93.0	18.5	93.9	18.5	0.0	0.0
[0.30; 0.35]	92.5	19.9	92.5	19.9	—	—
[0.35; 0.40]	98.2	7.2	98.2	7.2	—	—
[0.40; 0.45]	99.1	3.7	99.1	3.7	—	—
[0.45; 0.50]	99.4	2.3	99.4	2.3	—	—
[0.50; 0.55]	96.1	15.7	96.1	15.7	—	—
[0.55; 0.60]	96.9	12.5	96.9	12.5	—	—
[0.60; 0.65]	100.0	0.0	100.0	0.0	—	—
[0.65; 0.70]	100.0	0.0	100.0	0.0	—	—
[0.70; 0.75]	100.0	0.0	100.0	0.0	—	—
>0.75	100.0	0.0	100.0	0.0	—	—

ability model #7 was also increased by the above decision rule (Table 9). The performances of this model were a little bit lower than the performances of the model #8bis. However, the advantage of this probability model was its narrow uncertain domain, as the predictable percentages were higher than 90%. Figure 6 illustrates the confident growth/no-growth domains, and uncertain domains for the two models.

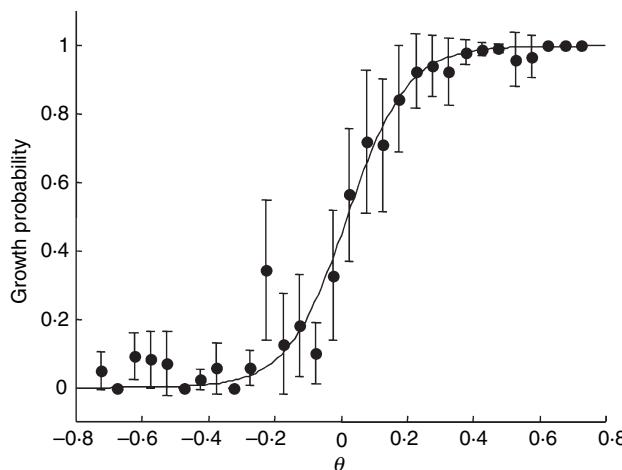
### Validation of the growth rate and growth/no-growth models

The results obtained for the validation of the complete and simplified cardinal model including interactions #5 and #5bis and the probability models #7, #8 and #8bis are shown in Table 10. Four per cent of the observed growth rates were below the lower confidence limit of the predicted ones with the complete model #5 against 15% with the

**Table 8** Evolution of the correct prediction percentage (CPP), the positive predictive value (PPV), and the negative predictive value (NPV) of the new cardinal growth model including interactions #5 for *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, according to the function  $\theta$  describing the effects of temperature, pH, water activity, nitrite, phenol and CO<sub>2</sub> and their interactions (model #8)

simplified model #5bis. This was due to the fact that the presence of preservatives in meat (nitrite and CO<sub>2</sub>) and seafood products (CO<sub>2</sub>) was not taken into account by the simplified model. Examples of this phenomenon are presented in Table 11. Approximately 3% of the observed growth rates were above the upper confidence limits of the predictions with both models. However, some of them were questionable, for example, the  $\mu_{\text{max}}$ -value of 0.16 h<sup>-1</sup> (Table 11) observed in Camembert cheese at 10°C by Murphy *et al.* (1996) seemed very high.

The better capacity of the probability model #7 to produce a growth/no-growth prediction (96% of cases) compared with model #8 (70%) was however linked to a decreased CPP. Indeed, the percentage of false growth predictions for this model was 16% against 8% for the model #8 and it predicted three false no growth in meat products. The performance of the simplified probability model #8bis was intermediate.



**Fig. 4** Evolution of the growth probability of *Listeria monocytogenes* in microbiological media according to the function  $\theta$  describing the effects of temperature, pH, water activity, nitrite, phenol and  $\text{CO}_2$ , and their interactions. Plotted points are the mean values and vertical bars indicate 1 SD. The solid line is the fitted model #8

## DISCUSSION

All tested models showed quite bias and accuracy factors. The models appeared then equivalent to predict the growth rate of *L. monocytogenes* in food. Polynomial models available on the free Pathogen Modeling Program (U.S. Department of Agriculture, <http://www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm>) were not evaluated in this study because they were shown to overestimate the growth rates in food (Pinon *et al.* 2004). Although acceptable limits were proposed for bias and accuracy factors (Ross 1999; Dalgaard 2000; Ross and

McMeekin 2003), the interpretation of these indices remained difficult because the calculated values depended largely on the formula used (Baranyi *et al.* 1999). Models including interactions between environmental factors appeared more effective to predict the growth/no growth of the pathogen. In order to compare the model performance for growth/no growth, it was essential to consider the way to define growth or no growth. This definition was indeed differently interpreted according to the authors. For example, Buchanan *et al.* (1989) considered that there was no growth when the cultures displayed  $<1 \log_{10}$  cycle increase of the initial bacterial concentration during the experimental period, Cole *et al.* (1990) reported growth when a visible growth was observed in microtitre plate wells within a period of 60 days, and Koutsoumanis *et al.* (2004) reported no growth when no increase of the turbidity of the broth medium was observed within 30 days of incubation with a confirmation by bacterial counts. The best effectiveness of models including interactions was more obvious near the growth limits. Therefore, the average CPP of models excluding interactions was 47% for data corresponding to  $\theta$ -values between  $-0.1$  and  $0.1$  even though the average CPP of models including interactions was 63% for the same data. The new cardinal model including interactions was then preferred to the other models for two reasons: first, it was more effective to predict the growth/no-growth limits and secondly, its analytical form was simpler than the form proposed by Le Marc *et al.* (2002). This model was based on the same hypothesis concerning the growth/no-growth interface as the model proposed by Augustin and Carlier (2000b) but it now progressively takes into account the effect of interactions between environmental factors on the growth rate in the manner proposed by Le Marc *et al.* (2002), with a

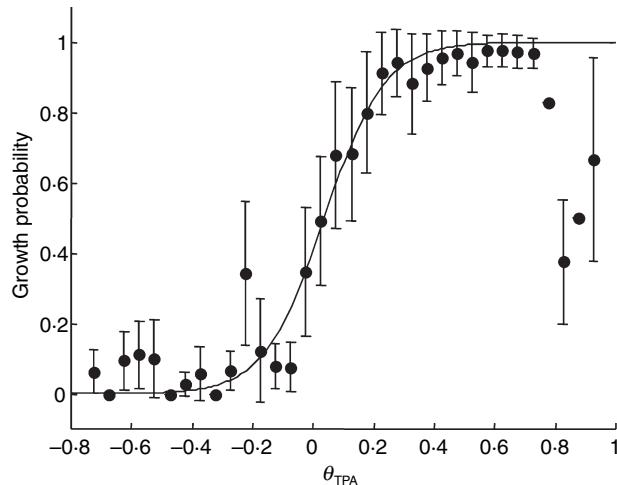
**Table 9** Correct prediction percentages (CPP), positive predictive values (PPV), negative predictive values (NPV) and prediction percentages (PP) of growth probability models for *Listeria monocytogenes* in liquid microbiological media, liquid dairy products, cheeses, meat and seafood products (growth predicted when growth probability is above 0.9, no growth predicted when growth probability is below 0.1)

Products	<i>n</i> *	Models											
		#8				#8bis†				#7			
		CPP (%)	PPV (%)	NPV (%)	PP (%)	CPP (%)	PPV (%)	NPV (%)	PP (%)	CPP (%)	PPV (%)	NPV (%)	PP (%)
Microbiological media	33	97.0	98.3	94.6	74.5	93.1	94.8	94.2	72.5	89.6	89.0	91.0	97.0
Liquid dairy products	14	100.0	100.0	100.0	95.9	100.0	100.0	100.0	91.8	98.2	97.6	100	100
Cheese	49‡	52.4	42.9	73.3	81.9	52.4	42.9	73.3	81.3	62.9	41.9	84.8	99.5
Meat products	14	97.8	97.7	75.0	74.4	97.3	97.2	100.0	81.5	93.1	94.8	67.6	90.9
Seafood products	4	98.7	98.7	—	88.8	98.2	98.2	—	96.3	98.8	98.8	100	98.8

\*Number of studies.

†Model #8bis is the simplified form of model #8 where inhibitory substances are ignored.

‡Number of cheese.

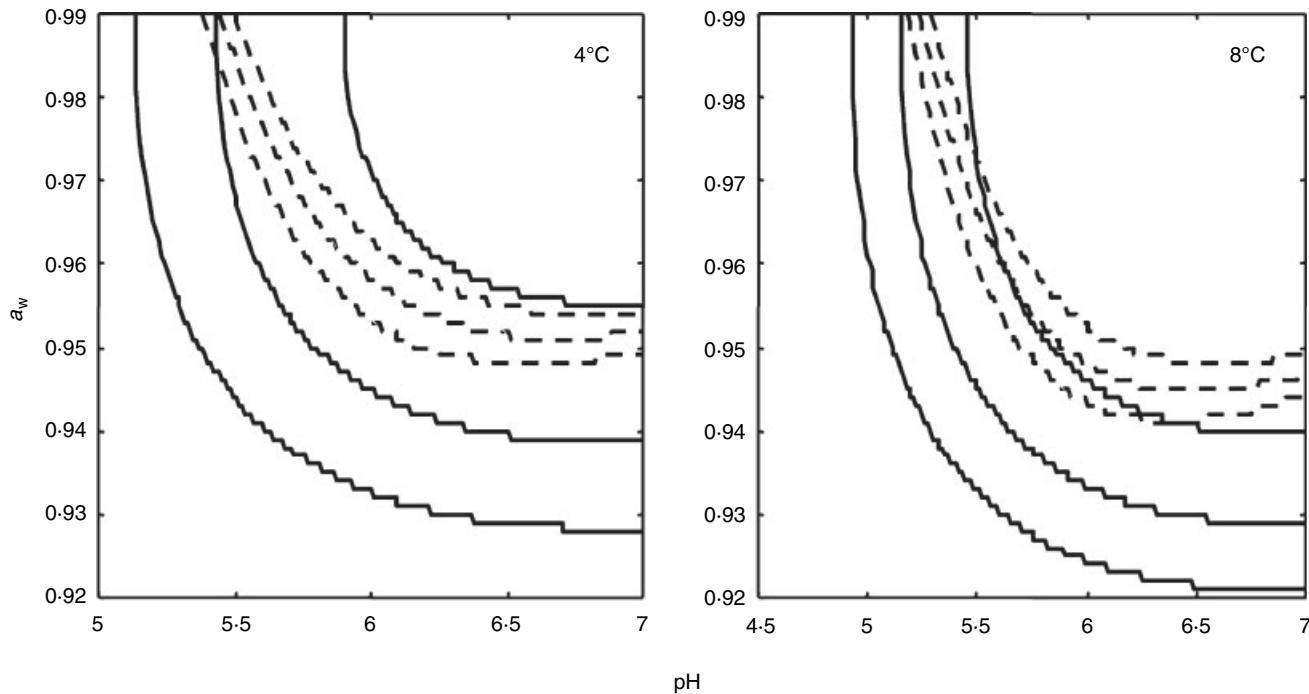


**Fig. 5** Evolution of the growth probability of *Listeria monocytogenes* in microbiological media according to the function  $\theta_{TPA}$  describing the effects of temperature, pH, water activity, and their interactions ( $\theta$  without inhibitory substances). Plotted points are the mean values and vertical bars indicate 1 SD. The solid line is the fitted model 8bis

space where environmental factors have independent effects on the growth rate. The model proposed in 2000 by Augustin and Carlier was shown to overestimate the effect of

interactions on the growth rate (Cornu *et al.* 2003; Giménez and Dalgaard 2004; Ross and Dalgaard 2004) which contrary to the new model acted on the entire growth range. Whatever the model chosen, it is important to insist on the fact that models shall be used with parameter values consistent with these models. Indeed, as it was pointed out by Ross and Dalgaard (2004), large differences were observed between cardinal values, MICs and optimal specific growth rates for *L. monocytogenes*, depending on the model used to estimate them.

The observed dispersion of parameter estimations included the biological variability and the uncertainty on these parameters. The dispersion was sometimes consistent with the biological variability obtained by other authors. Thus, Pouillot *et al.* (2003) observed a mean SD of 1.26°C for the biological variability of  $T_{min}$  against an SD of 2.55°C in our study. For the optimal specific growth rate of *L. monocytogenes* in milk, they observed a mean SD of 0.18 h<sup>-1</sup> against 0.13 h<sup>-1</sup> in our study. We can then consider that the observed variability is to some extent representative of the biological variability of the growth parameters of *L. monocytogenes*. Nevertheless some other factors not yet identified certainly interacted with this biological variability, as the dispersion of the optimal specific growth rate was very dependent on the food



**Fig. 6** Predicted growth and no-growth domains for *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C according to the pH and the water activity of food. The solid lines represent the limits predicted by the simplified probability model #8bis and the dotted lines represent the limits predicted in agar by the probability model #7 proposed by Koutsoumanis *et al.* (2004). The lower lines correspond to a growth probability of 0.1, the middle lines correspond to a probability of 0.5 and the upper lines correspond to a probability of 0.9

**Table 10** Results of the validation of the *Listeria monocytogenes* growth models in food

Predictions	Indices	Food products	<i>n</i> *	Models		
				#5 and #8	#5bis and #8bis†	#7
Growth rate	No. above upper limit	Cheese	21	1	1	—
		Meat	128	1	1	—
		Seafood	47	4	5	—
		Total	196	6 (3%)	7 (4%)	—
	No. below lower limit	Cheese	21	2	2	—
		Meat	128	5	21	—
		Seafood	47	0	6	—
		Total	196	7 (4%)	29 (15%)	—
Growth/no growth‡	No. of predictions	Cheese	21	18	18	21
		Meat	146	92	103	137
		Seafood	47	40	44	47
		Total	214	150 (70%)	165 (77%)	205 (96%)
	No. of false growths	Cheese		2	2	8
		Meat		8	14	21
		Seafood		2	3	3
		Total		12 (8%)	19 (12%)	32 (16%)
	No. of false no growths	Cheese		0	0	0
		Meat		0	0	3
		Seafood		0	0	0
		Total		0	0	3 (1%)

\*Number of data.

†Models #5bis and #8bis are the simplified forms of models #5 and #8 where inhibitory substances are ignored.

‡Growth predicted when growth probability is above 0·9, no growth predicted when growth probability is below 0·1.

considered. The coefficient of variation of 90% observed for cheeses was certainly because of unidentified abiotic (heterogeneity of pH or aw, lactic acid concentration) or biotic (competitive microflora) factors influencing the growth rate of *L. monocytogenes*. In addition, large variations in optimal growth rates were observed for identical cheeses (Table 5) without explanation. For example, Genigeorgis *et al.* (1991) observed an increase of the population of *L. monocytogenes* of  $0.59 \log_{10}$  on the surface of Brie cheese at pH 7·2 in 30 days at 4°C whereas the increase of the population was of  $0.86 \log_{10}$  in 6 days in the centre of the same cheese at pH 6. Some refinements of the model should then be made to take these factors into account and thus, to reduce the confidence interval of the predictions. Therefore, the proposed model was a simplification of the real situation and the observed dispersion did certainly better reflect the completeness error of the model (Baranyi and Roberts 1995) than the biological variability. However, the observed parameter variability constituted an important knowledge for quantitative risk assessment studies but it should carefully be used. Indeed, the dispersions observed according to the strains used in experimental studies were probably not representative of the frequency of the distribution of strains naturally contaminating food.

For model validation, our results confirmed that it was important to collect data from a large number of studies rather than from a large number of data issued from few studies (te Giffel and Zwietering 1999). The observed growth data were effectively relatively variable depending on the study from which they were issued and a model could show good or poor performances depending on the data sets used. This phenomenon was particularly pronounced for the growth of *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon, where large differences in growth rates were observed between naturally and artificially contaminated samples. The weak growth of the pathogen in naturally contaminated salmon (Cortesi *et al.* 1997; Lappi *et al.* 2004) was mainly attributed to the effect of the competitive microflora (Dalgaard and Jørgensen 1998; Ross *et al.* 2000; Ross and McMeekin 2003), and models were proposed to take into account these interactions (Giménez and Dalgaard 2004).

In order to take into account the completeness error of the model and the biological variability, we proposed parameter values that allowed to predict limits of *L. monocytogenes* growth rates with a confidence level of approx. 95%. Although the proposed method was empirically derived, with assumptions on the parameter distributions, it gave (except for cheese) confidence limits including on average more than 95% of the observed growth rates in a well-

**Table 11** Observed and predicted growth of *Listeria monocytogenes* in food

References	Food products	T (°C)	pH	a <sub>w</sub>	nit (μmol l <sup>-1</sup> )	phe (ppm)	CO <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	Growth	#5	#5bis*	#8	#8bis*	#7	Growth probability (%)		
Papageorgiou and Marth (1989b)	Feta cheese	4	4.75	0.975	0	0	0	0.00	No	0 (0; 0) <sup>†</sup>	0 (0; 0)	0	0	0	0	0	
Hicks and Lund (1991)	Cottage cheese	4	4.68	(0.985)‡	0	0	0	0.00	No	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0	0	0	0	0	
Murphy <i>et al.</i> (1996)	Camembert cheese	4	6.4	4.63 (0.985)	0	0	0	0.00	No	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1	1	0	1	0	
Wang and Johnson (1997)	Camembert cheese	4	6.4	0.982	0	0	0	0.01	Yes	0.01 (0; 0.02)	0.01 (0; 0.02)	98	96	100	98	100	
McAuliffe <i>et al.</i> (1999)	Cottage cheese	4	6.2	(0.985)	0	0	0	0.02	Yes	0.01 (0; 0.02)	0.01 (0; 0.02)	100	100	100	100	100	
Buchanan and Klawitter (1991)	Canned meat	5	(6.3)	(0.99)	(0)	0	0	0.02	Yes	0.04 (0; 0.11)	0.04 (0; 0.10)	99	98	100	99	100	
Buncic <i>et al.</i> (1991)	Frankfurters	4	(6.2)	0.977 (0.5)	0	0	0	0.04	Yes	0.04 (0; 0.11)	0.04 (0; 0.10)	99	98	100	99	100	
Hart <i>et al.</i> (1991)	Fermented sausage	18	5.13	0.970	21.1	0	0	0.00	No	0 (0; 0)	0 (0; 0.18)	99	99	100	99	100	
Marshall <i>et al.</i> (1991)	Chicken breast	1	5.8	(0.99)	0	0	1	0.00	No	0 (0; 0)	0 (0; 0.11)	99	98	100	99	100	
Schillinger <i>et al.</i> (1991)	Chicken nuggets	3	(6.0)	(0.98)	(0)	0	0.3	0.07	Yes	0.19 (0; 0.34)	0.18 (0; 0.33)	100	100	100	99	100	
Schmidt (1995)	Minced beef	8	5.8	(0.99)	(0)	0	0.8	0.02	Yes	0 (0; 0.03)	0 (0; 0.05)	33	36	100	99	100	
Beumer <i>et al.</i> (1996)	Comminuted cured raw pork	15	5.7	0.989	2.7	0	0	0.02	Yes	0.06 (0; 0.13)	0.05 (0; 0.12)	99	98	100	99	100	
Campanini <i>et al.</i> (1993)	Salami	14	5.45	0.971	29.9	0	0	0.08	Yes	0.24 (0; 1; 0.4)	0.22 (0; 1; 0.38)	100	100	100	100	100	
Hudson and Mott (1993a)	Pâté	10	6.1	(0.98)	(0)	0	0	0.06	Yes	0 (0; 0)	0 (0; 0.19)	0	98	100	98	100	
Manu-Tawiah <i>et al.</i> (1993)	Pork loins	4	5.8	(0.99)	0	0	0	0.01	Yes	0.11 (0; 0.21)	0.09 (0; 0.19)	100	100	100	100	100	
Avery <i>et al.</i> (1994)	Beef striploins	5	5.4	(0.99)	0	0	0	0.3	0.01	Yes	0 (0; 0.05)	0 (0; 0.06)	90	87	100	88	100
McKellar <i>et al.</i> (1994)	Beef wieners	5	6.23	0.970	0.4	5	0.3	0.01	Yes	0 (0; 0.07)	0 (0; 0.08)	67	96	100	60	69	
Blom <i>et al.</i> (1997)	Frankfurters	2	6.2	(0.97)	(0)	0	0.3	0.02	Yes	0 (0; 0.04)	0 (0; 0.07)	38	91	100	65	80	
Duffy <i>et al.</i> (2000)	Cooked chicken breast	7	6.2	(0.97)	(0)	0	0.3	0.05	Yes	0.05 (0; 0.11)	0.05 (0; 0.11)	98	99	100	98	100	
Nissen <i>et al.</i> (2000)	Minced beef	4	(5.8)	(0.99)	0	0	0.3	0.04	Yes	0.06 (0; 0.13)	0 (0; 0.13)	98	99	100	51	87	
Nyati (2000)	Chicken breast	0	5.6	0.990	0	0	0	0.09	Yes	0 (0; 0.04)	0 (0; 0.04)	56	51	64	18	17	

Table 11 Continued

References	Food products	<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>a<sub>w</sub></i>	nit (μmol l <sup>-1</sup> )	phe (ppm)	CO <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	Growth	Observed		Predicted $\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )		Growth probability (%)	
									$\mu_{\max}$	#5	#5bis*	#8	#8bis*	#7
Bedie <i>et al.</i> (2001)	Frankfurters	4	6.23	0.946 (0)	0	0.3	0.00	Yes	0 (0; 0.04)	0 (0; 0.04)	48	68	2	
	Sterile ham	4	5.87	0.962 (0)	0	0.3	0.00	No	0 (0; 0.05)	0 (0; 0.05)	65	80	52	
Devlieghere <i>et al.</i> (2001)		4	6.19	0.982 (0)	0	0	0.03	Yes	0 (0; 0.08)	0 (0; 0.07)	97	95	100	
Dykes and Moorhead (2002)	Beef	12	6.19	0.982 (0)	0	0	0.09	Yes	0 (0; 0.28)	0 (0; 0.25)	100	100	100	
Mbandi and Shelef (2002)	Beef bologna	4	(5.8)	(0.99)	0	0	0.3	No	0 (0; 0.07)	0 (0; 0.07)	76	87	100	
Ingham <i>et al.</i> (2004)	Beef snack sticks	5	6.3	(0.97)	(0)	0	0.01	Yes	0 (0; 0.09)	0 (0; 0.08)	98	97	100	
P. Garry, personal communication	Elk sausage	21	5.3	0.96 (0)	0	0	NK	No	0 (0; 0.29)	0 (0; 0.26)	99	98	99	
Rørvik <i>et al.</i> (1991)	Summer sausage	21	4.9	0.95 (0)	0	0	NK	No	0 (0; 0.15)	0 (0; 0.13)	38	35	0	
Smoked salmon	8	5.91	0.952 (0)	0	0	0.00	No	0 (0; 0.10)	0 (0; 0.09)	96	94	78		
Cod fish fillets	4	6.19	0.982 (0)	0	0	0.3	0.02	Yes	0 (0; 0.03)	0 (0; 0.03)	90	95	100	
Wang and Shelef (1992)		5	(6.0)	(0.99)	0	0	0.01	Yes	0 (0; 0.04)	0 (0; 0.04)	97	96	100	
Dorsa <i>et al.</i> (1993)	Crawfish tail meat	20	(6.0)	(0.99)	0	0	0.29	Yes	0 (0; 0.26)	0 (0; 0.23)	100	100	100	
Hudson and Mott (1993b)	Cold-smoked salmon	6	(6.0)	(0.99)	0	0	0.01	Yes	0 (0; 0.01)	0 (0; 0.01)	53	48	100	
Oh and Marshall (1994)	Crawfish tail meat	10	6.1	0.983 (0)	0	0	0.03	Yes	0 (0; 0.05)	0 (0; 0.05)	98	97	100	
Rosso <i>et al.</i> (1996)	Salmon	8	6.0	0.984 (0)	11	0	0.03	Yes	0 (0; 0.04)	0 (0; 0.04)	98	96	100	
Nilsson <i>et al.</i> (1997)	Cold-smoked salmon	5	6.15	0.973 (0)	0	0.3	0.09	Yes	0 (0; 0.09)	0 (0; 0.08)	99	100	100	
Dalggaard and Jørgensen (1998)	Cold-smoked salmon	5	6.15	0.973 (0)	0	0.7	0.01	Yes	0 (0; 0.03)	0 (0; 0.03)	94	92	100	
Szabo and Cahill (1999)	Hot-smoked salmon	4	6.1	(0.97)	0	0.0	0.3	0.06	Yes	0 (0; 0.04)	0 (0; 0.03)	93	96	100
Nykanen <i>et al.</i> (2000)	Cold-smoked trout	10	6.3	(0.97)	0	0.3	0.06	Yes	0 (0; 0.08)	0 (0; 0.07)	75	96	100	
Katla <i>et al.</i> (2001)	Cold-smoked salmon	8	(6.0)	(0.97)	0	0.3	0.01	Yes	0 (0; 0.03)	0 (0; 0.03)	93	96	100	
Ginanou Besse (2004)	Cold-smoked salmon	8	(6.0)	(0.97)	0	6	0.3	0.01	Yes	0 (0; 0.05)	0 (0; 0.05)	98	99	100

\*Models#5bis and#8bis are the simplified forms of models#5 and#8, where inhibitory substances are ignored.

<sup>†</sup>In brackets: confidence limits of predictions.

<sup>‡</sup>In brackets: characteristics arbitrarily set because not specified in the study.

§Not known.

balanced manner. Thus, the mean percentages of growth rates above the upper limits in microbiological media and meats were 1·4 and 1·9%, respectively, and the mean percentages of growth rates below the lower limits in microbiological media and meats were 1·6 and 1·8% respectively. In the validation study, some observed growth rates were above the predicted upper limits in seafood products, but these data were obtained by challenge testing in smoked salmon for which it was pointed out that growth in naturally contaminated samples was weaker (Cortesi *et al.* 1997; Lappi *et al.* 2004). On the contrary, some observed growth rates in meat products were below the predicted lower limits. This was mainly due to the presence of preservatives (e.g. nitrite) not taken into account by the model as the concentrations were not specified in the studies.

Another advantage of this new model was its capacity to predict the growth probability of *L. monocytogenes* in food. A probability model based on the results obtained with the new cardinal model including interactions was proposed. When considering that no growth is observed when the growth probability is below 0·1 and that growth occurs when this probability is above 0·9, we obtained a relatively consistent decision rule. Growth was sometimes wrongly predicted in cheese as lactic acid concentration and microbial interactions were certainly very important factors, that were not taken into account by the model. In meat products, false growth was also predicted for the reason described above (presence of inhibitory substances not known). In the validation study, the model never predicted false no-growth, which was important for a pathogenic micro-organism. Thus, this decision rule seemed safely usable for the no-growth prediction of *L. monocytogenes* in food. The only drawback of this rule was its poor prediction capacity as only 70% of the situations were predictable in the validation study. In these cases the calculated probability could however give an idea of the micro-organism behaviour, and the prediction obtained with the probability model proposed by Koutsoumanis *et al.* (2004) could also be used although this one predicts more false growth (16% of the previsions in this study) and sometimes false no growth (1% of the previsions in this study).

The simplification of the model by ignoring the effects of nitrite, phenol and CO<sub>2</sub> could be used when these parameters were not known. In seafood products, the effect of phenol is controversial (Ross *et al.* 2000; Giménez and Dalgaard 2004), and it was indeed observed in the present study that ignoring the phenol concentration led to better predictions. On the contrary, the predictions were improved when the CO<sub>2</sub> concentration was taken into account. In all food products, the predictions obtained with the simplified model were logically more conservative than those obtained with the complete one and no false no growth was predicted.

When information on the presence of preservatives in food was available, it appeared preferable to use the complete model for the refinement of predictions.

In conclusion, the proposed models seemed suitable to predict the growth rate and the growth probability of *L. monocytogenes* in liquid dairy products, meat and seafood products under suboptimal growth conditions. In cheese, the models seemed appropriate for the no-growth prediction but refinements should be performed to increase the PPV of the model.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Hélène Bergis and Pascal Garry for providing growth data obtained from seafood products, deli meats, and cheese, and Carole Feurer who checked the manuscript for the correct use of English.

## REFERENCES

- Abdalla, O.M., Christen, G.L. and Davidson, P.M. (1993) Chemical composition of and *Listeria monocytogenes* survival in white pickled cheese. *J Food Prot* **56**, 841–846.
- Ahamad, N. and Marth, E.H. (1989) Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. *J Food Prot* **52**, 688–695.
- Anon (2001) *Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments relatif à la classification des aliments selon le danger représenté par Listeria monocytogenes*. Maisons-Alfort, France: AFSSA (<http://www.afssa.fr>).
- Anon (2003) *Quantitative Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods*. FDA, Center for Safety and Applied Nutrition, USDA, Food Safety and Inspection Service, Washington, USA (<http://www.cfsan.fda.gov>).
- Anon (2004) *Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods*. Geneva, Switzerland: FAO/WHO (<http://www.who.int/foodsafety>).
- Augustin, J.-C. and Carlier, V. (2000a) Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **56**, 29–51.
- Augustin, J.-C. and Carlier, V. (2000b) Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int J Food Microbiol* **56**, 53–70.
- Avery, S.M., Hudson, J.A. and Penney, N. (1994) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on normal ultimate pH beef (pH 5·3–5·5) at abusive storage temperatures by saturated carbon dioxide controlled atmosphere packaging. *J Food Prot* **57**, 331–333.
- Bajard, S. (1996) Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *Listeria monocytogenes*. PhD Thesis, Université Claude-Bernard Lyon 1, Lyon, France.
- Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G. and Flandrois, J.P. (1996) The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. *Int J Food Microbiol* **29**, 201–211.

- Baranyi, J. and Roberts, T.A. (1995) Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* **26**, 199–218.
- Baranyi, J., Pin, C. and Ross, T. (1999) Validating and comparing predictive models. *Int J Food Microbiol* **48**, 159–166.
- Barmpalias, I.M., Koutsoumanis, K.P., Georaras, I., Belk, K.E., Scanga, J.A., Kendall, P.A., Smith, G.C. and Sofos, J.N. (2005) Effect of antimicrobials as ingredients of pork bologna for *Listeria monocytogenes* control during storage at 4 or 10°C. *Food Microbiol* **22**, 205–211.
- Bedie, G.K., Samelis, J., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A. and Smith, G.C. (2001) Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on Frankfurters stored at 4°C in vacuum packages. *J Food Prot* **64**, 1949–1955.
- Beumer, R.R., te Giffel, M.C., de Boer, E. and Rombouts, F.M. (1996) Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. *Food Microbiol* **13**, 333–340.
- Blom, H., Nerbrink, E., Dainty, R., Hagtvedt, T., Borch, E., Nissen, H. and Nesbakken, T. (1997) Addition of 2·5% lactate and 0·25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory-acceptable servelat sausage and cooked ham stored at 4°C. *Int J Food Microbiol* **38**, 71–76.
- Brocklehurst, T. (2004) Challenge of food and the environment. In *Modeling Microbial Responses in Food* ed. McKellar, R.C. and Lu, X. pp. 197–232. Boca Raton, FL: CRC Series in Contemporary Food Science, CRC Press.
- Brocklehurst, T.F., Parker, M.L., Gunning, P.A., Coleman, H.P. and Robins, M.M. (1995) Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II-Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *J Appl Bacteriol* **78**, 609–615.
- Broughall, J.M., Anslow, P.A. and Kilsby, D.C. (1983) Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development of mathematical models describing the effect of water activity. *J Appl Bacteriol* **55**, 101–110.
- Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1990) Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4·5. *J Food Sci* **55**, 1754–1756.
- Buchanan, R.L. and Klawitter, L.A. (1991) Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *Int J Food Microbiol* **12**, 235–246.
- Buchanan, R.L. and Phillips, J.G. (1990) Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **53**, 370–376.
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G. and Whiting, R.C. (1989) Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **52**, 844–851.
- Buncic, S., Paunovic, L. and Radisic, D. (1991) The fate of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages and in vacuum-packaged Frankfurters. *J Food Prot* **54**, 413–417.
- Campanini, M., Pedrazzoni, I., Barbuti, S. and Baldini, P. (1993) Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *Int J Food Microbiol* **20**, 169–175.
- Chen, N. and Shelef, L.A. (1992) Relationship between water activity, salts of lactic acid, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *J Food Prot* **55**, 574–578.
- Cole, M.B., Jones, M.V. and Holyoak, C. (1990) The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* **69**, 63–72.
- Conner, D.E., Scott, V.N. and Bernard, D.T. (1990) Growth, inhibition, and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *J Food Prot* **53**, 652–655.
- Cornu, M., Beaufort, A., Rudelle, S., Bergis, H., Miconnet, N., Serot, T. and Delignette-Muller, M.L. (2003) Growth of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. Comparison and validation of predictive models. In *Predictive Modelling in Foods 4th International Conference-Conference proceedings* ed. van Impe, J.F.M., Geeraerd, A.H., Leguérin, I. and Mafart, P. pp. 105–107. Leuven, Belgium: Katholieke Universiteit Leuven/BioTec.
- Cortesi, M.L., Sarli, T., Santoro, A., Murru, N. and Pepe, T. (1997) Distribution and behavior of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally-contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 and 10°C. *Int J Food Microbiol* **37**, 209–214.
- Dalgaard, P. (2000) Fresh and lightly preserved seafood. In *Shelf-life Evaluation of Foods* ed. Man, C.M.D. and Jones, A.A. pp. 110–139. London: Aspen Publishers, Inc.
- Dalgaard, P. and Jørgensen, L.V. (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol* **40**, 105–115.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L. and Flandrois, J.P. (1995) Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. *Int J Food Microbiol* **27**, 139–146.
- Devlieghere, F., Debevere, J. and van Impe, J. (1998) Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. *Int J Food Microbiol* **43**, 105–113.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Vandewaetere, B., van Impe, J. and Debevere, J. (2001) Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiol* **18**, 53–66.
- Donnelly, C.W. and Briggs, E.H. (1986) Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J Food Prot* **49**, 994–998.
- Dorsa, W.J., Marshall, D.L., Moody, M.W. and Hackney, C.R. (1993) Low temperature growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in precooked crawfish tail meat. *J Food Prot* **56**, 106–109.
- Duffy, L.L., Vanderlinde, P.B. and Grau, F.H. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate. *Int J Food Microbiol* **23**, 377–390.
- Duffy, G., Walsh, D., Sheridan, J.J., Logue, C.M., Harrington, D., Blair, I.S. and McDowell, D.A. (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua* during storage of minced beef under vacuum or in air at 0°C and 10°C. *Food Microbiol* **17**, 571–578.
- Duh, Y.-H. and Schaffner, D.W. (1993) Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **56**, 205–210.
- Dykes, G.A. (2003) Behaviour of *Listeria monocytogenes* on two processed meat products as influenced by temperature or attached growth during preincubation. *Food Microbiol* **20**, 91–96.
- Dykes, G.A. and Moorhead, S.M. (2002) Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *Int J Food Microbiol* **73**, 71–81.

- El-Gazzar, F.E., Bohner, H.F. and Marth, E.H. (1991) Growth of *Listeria monocytogenes* at 4, 32, and 40°C in skim milk and in retentate and permeate from ultrafiltered skim milk. *J Food Prot* **54**, 338–342.
- El-Shenawy, M.A. and Marth, E.H. (1988a) Sodium benzoate inhibits growth of or inactivates *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **51**, 525–530.
- El-Shenawy, M.A. and Marth, E.H. (1988b) Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. *J Food Prot* **51**, 842–847.
- Farber, J.M., Sanders, G.W., Dunfield, S. and Prescott, R. (1989) The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **9**, 181–183.
- Farber, J.M., Coates, F. and Daley, E. (1992) Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **15**, 103–105.
- Farber, J.M., Cai, Y. and Ross, W.H. (1996) Predictive modelling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO<sub>2</sub> environments. *Int J Food Microbiol* **32**, 133–144.
- Fernández, P.S., George, S.M., Sills, C.C. and Peck, M.W. (1997) Predictive model of the effect of CO<sub>2</sub>, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **37**, 37–45.
- Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D. and Farver, T.B. (1991) Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30°C. *J Food Prot* **54**, 662–668.
- George, S.M., Lund, B.M. and Brocklehurst, T.F. (1988) The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **6**, 153–156.
- te Giffel, M.C. and Zwietering, M.H. (1999) Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **46**, 135–149.
- Giménez, B. and Dalgaard, P. (2004) Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol* **96**, 96–109.
- Gnanou Besse, N. (2004) Effet de la taille et de la composition de la population initiale sur la croissance de *Listeria monocytogenes*. *PhD Thesis*, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.
- Grant, I.R., Nixon, C.R. and Patterson, M.F. (1993) Comparison of the growth of *Listeria monocytogenes* in unirradiated and irradiated cook-chill roast beef and gravy at refrigeration temperatures. *Lett Appl Microbiol* **17**, 55–57.
- Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef. *J Food Prot* **53**, 739–741.
- Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B. (1992) Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J Food Prot* **55**, 4–7.
- Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B. (1993) Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: equations describing the effects of temperature and pH. *J Food Prot* **56**, 96–101.
- Greer, G.G. and Dilts, B.D. (1995) Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. *Int J Food Microbiol* **25**, 141–151.
- Hajmeer, M. and Basheer, I. (2003) Comparison of logistic regression and neural network-based classifiers for bacterial growth. *Food Microbiol* **20**, 43–55.
- Hart, C.D., Mead, G.C. and Norris, A.P. (1991) Effects of gaseous environment and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. *J Appl Bacteriol* **70**, 40–46.
- Hicks, S.J. and Lund, B.M. (1991) The survival of *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *J Appl Bacteriol* **70**, 308–314.
- Hudson, J.A. and Mott, S.J. (1993a) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in pâté and comparison with predictive models. *Int J Food Microbiol* **20**, 1–11.
- Hudson, J.A. and Mott, S.J. (1993b) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiol* **10**, 61–68.
- Hudson, J.A. and Mott, S.J. (1993c) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cooked beef under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiol* **10**, 429–437.
- Hudson, J.A., Mott, S.J. and Penney, N. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J Food Prot* **57**, 204–208.
- Ingham, S.C., Buege, D.R., Dropp, B.K. and Losinski, J.A. (2004) Survival of *Listeria monocytogenes* during storage of ready-to-eat meat products processed by drying, fermentation, and/or smoking. *J Food Prot* **67**, 2698–2702.
- Katla, T., Moretø, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L. and Naterstad, K. (2001) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol* **18**, 431–439.
- Katoh, H. (1989) Determination of mean generation time for *Listeria monocytogenes*. *Jap J Food Microbiol* **6**, 135–138.
- Kaya, M. and Schmidt, U. (1989) Verhalten von *Listeria monocytogenes* im hackfleisch bei kuhl- und gefrierlagerung. *Fleischwirtsch* **69**, 617–620.
- Kono, T. (1968) Kinetics of microbial cell growth. *Biotech Bioeng* **10**, 105–131.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A. and Sofos, J.N. (2004) A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and  $a_w$  when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiol* **21**, 415–422.
- Lappi, V.R., Ho, A.H., Gall, K. and Wiedmann, M. (2004) Prevalence and growth of *Listeria* on naturally contaminated smoked salmon over 28 days of storage at 4°C. *J Food Prot* **67**, 1022–1026.
- Le Marc, Y. (2001) Developpement d'un modèle modulaire décrivant l'effet des interactions entre les facteurs environnementaux sur les aptitudes de croissance de *Listeria*. *PhD Thesis*, Université de Bretagne Occidentale, Quimper, France.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P. and Thuault, D. (2002) Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int J Food Microbiol* **73**, 219–237.
- Manu-Tawiah, W., Myers, D.J., Olson, D.G. and Molins, R.A. (1993) Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packaged under modified gas atmospheres. *J Food Sci* **58**, 475–479.
- Marshall, D.L. and Schmidt, R.H. (1988) Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk preincubated with selected pseudomonads. *J Food Prot* **51**, 277–282.

- Marshall, D.L., Wiese-Lehigh, P.L., Wells, J.H. and Farr, A.J. (1991) Comparative growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken nuggets stored under modified atmospheres. *J Food Prot* **54**, 841–843, 851.
- Mbandi, E. and Shelef, L.A. (2002) Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *Int J Food Microbiol* **76**, 191–198.
- McAuliffe, O., Hill, C. and Ross, R.P. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. *J Appl Microbiol* **86**, 251–256.
- McClure, P.J., Kelly, T.M. and Roberts, T.A. (1991) The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **14**, 77–92.
- McKellar, R.C. and Lu, X. (2004) Primary models. In *Modeling Microbial Responses in Food* ed. McKellar, R.C. and Lu, X. pp. 21–62. Boca Raton, FL: CRC Series in Contemporary Food Science, CRC Press.
- McKellar, R.C., Moir, R. and Kalab, M. (1994) Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retail wieners. *J Food Prot* **57**, 387–392.
- McKellar, R.C., Butler, G. and Stanich, K. (1997) Modelling the influence of temperature on the recovery of *Listeria monocytogenes* from heat injury. *Food Microbiol* **14**, 617–625.
- Membré, J.M., Thurette, J. and Catteau, M. (1997) Modelling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* **82**, 345–350.
- Membré, J.-M., Kubaczka, M., Dubois, J. and Chéné, C. (2004) Temperature effect on *Listeria monocytogenes* growth in the event of contamination of cooked pork products. *J Food Prot* **67**, 463–469.
- Miller, A.J. (1992) Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Prot* **55**, 414–418.
- Murphy, P.M., Rea, M.C. and Harrington, D. (1996) Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in a skim milk medium and validation studies in a range of dairy products. *J Appl Bacteriol* **80**, 557–564.
- Nilsson, L., Huss, H.H. and Gram, L. (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int J Food Microbiol* **38**, 217–227.
- Nissen, H., Alvseike, O., Bredholt, S., Holck, A. and Nesbakken, T. (2000) Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. *Int J Food Microbiol* **59**, 211–220.
- 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*. *Int J Food Microbiol* **16**, 323–335.
- Nyati, H. (2000) Survival characteristics and the applicability of predictive mathematical modelling to *Listeria monocytogenes* growth in sous vide products. *Int J Food Microbiol* **56**, 123–132.
- Nykanen, A., Weckman, K. and Lapvetelainen, A. (2000) Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *Int J Food Microbiol* **61**, 63–72.
- Oh, D.-H. and Marshall, D.L. (1993) Influence of temperature, pH, and glycerol monolaurate on growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **56**, 744–749.
- Oh, D.-H. and Marshall, D.L. (1994) Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* by glycerol monolaurate with organic acids. *J Food Sci* **59**, 1258–1261.
- Papageorgiou, D.K. and Marth, E.H. (1989a) Behavior of *Listeria monocytogenes* at 4 and 22°C in whey and skim milk containing 6 or 12% sodium chloride. *J Food Prot* **52**, 625–630.
- Papageorgiou, D.K. and Marth, E.H. (1989b) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. *J Food Prot* **52**, 82–87.
- Patchett, R.A., Watson, N., Fernandez, P.S. and Kroll, R.G. (1996) The effect of temperature and growth rate on the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to environmental stress conditions. *Lett Appl Microbiol* **22**, 121–124.
- Pearson, L.J. and Marth, E.H. (1990) Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of cocoa, carrageenan, and sugar in a milk medium incubated with and without agitation. *J Food Prot* **53**, 30–37.
- Pelroy, G., Peterson, M., Rohinee, P., Almond, J. and Eklund, M.W. (1994) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-process (smoked) salmon by sodium nitrite and packaging method. *J Food Prot* **57**, 114–119.
- Peterson, M.E., Pelroy, G.A., Paranjpye, R.N., Poysky, F.T., Almond, J.S. and Eklund, M.W. (1993) Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products: sodium chloride and packaging method. *J Food Prot* **56**, 938–943.
- Petran, R.L. and Zottola, E.A. (1989) A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Sci* **54**, 458–460.
- Pin, C., García de Fernando, G.D., Ordóñez, J.A. and Baranyi, J. (2001) Applying a generalized  $z$ -value concept to quantify and compare the effect of environmental factors on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* **18**, 539–545.
- Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J.-M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L. et al. (2004) Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1081–1087.
- Pouillot, R., Albert, I., Cornu, M. and Denis, J.-B. (2003) Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using Bayesian inference. Application to *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **81**, 87–104.
- Presser, K., Ratkowsky, D.A. and Ross, T. (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2355–2360.
- Rørvik, L.M., Yndestad, M. and Skjerve, E. (1991) Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4°C. *Int J Food Microbiol* **14**, 111–118.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A. and Ball, A. (1982) Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol* **149**, 1–5.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A. and Olley, J. (1991) Comparison of Arrhenius-type and Belehradek-type models for prediction of bacterial growth in foods. *J Appl Bacteriol* **71**, 452–459.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., Macario, N., Dommett, T.W. and Kamperman, L. (1996) Choosing probability distributions for modelling generation time variability. *J Appl Bacteriol* **80**, 131–137.
- Resnik, S.L. and Chirife, J. (1988) Proposed theoretical water activity values at various temperatures for selected solutions to be used as

- reference sources in the range of microbial growth. *J Food Prot* **51**, 419–423.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A. and Marth, E.H. (1998) The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **44**, 83–92.
- Rosenow, E.M. and Marth, E.H. (1987a) Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21, and 35°C. *J Food Prot* **50**, 452–459.
- Rosenow, E.M. and Marth, E.H. (1987b) Addition of cocoa powder, cane sugar, and carrageenan to milk enhances growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **50**, 726–729.
- Ross, T. (1996) Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol* **81**, 501–508.
- Ross, T. (1999) *Predictive Food Microbiology Models in the Meat Industry*. Sydney: Meat and Livestock Australia.
- Ross, T. and Dalgaard, P. (2004) Secondary models. In *Modeling Microbial Responses in Food* ed. McKellar, R.C. and Lu, X. pp. 63–150. Boca Raton, FL: CRC Series in Contemporary Food Science, CRC Press.
- Ross, T. and McMeekin, T.A. (2003) Modeling microbial growth within food safety risk assessments. *Risk Anal* **23**, 179–197.
- Ross, T., Dalgaard, P. and Tienungoon, S. (2000) Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol* **62**, 231–245.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S. and Flandrois, J.P. (1995) Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl Environ Microbiol* **61**, 610–616.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J. and Veit, P. (1996) Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *J Food Prot* **59**, 944–949.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (1987) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *J Food Prot* **50**, 372–378.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (1988) Growth of *Listeria monocytogenes* at different pH values in uncultured whey or whey cultured with *Penicillium camemberti*. *Can J Food Microbiol* **34**, 730–734.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (1989) Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Brick cheese. *J Dairy Sci* **72**, 838–853.
- Schaack, M.M. and Marth, E.H. (1988) Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. *J Food Prot* **51**, 600–606.
- Schillinger, U., Kaya, M. and Lücke, F.-K. (1991) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J Appl Bacteriol* **70**, 473–478.
- Schltyter, J.H., Degnan, A.J., Loeffelholz, J., Glass, K.A. and Luchansky, J.B. (1993) Evaluation of sodium diacetate and ALTA™ 2341 on viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. *J Food Prot* **56**, 808–810.
- Schmidt, U. (1995) Sliced, vacuum-packed Frankfurter-type sausage. Technological measures to inhibit the growth of *listeriae*. *Fleischwirtsch* **75**, 804–807.
- Sorrells, K.M., Enigl, D.C. and Hatfield, J.R. (1989) Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **52**, 571–573.
- Stekelenburg, F.K. (2003) Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. *Food Microbiol* **20**, 133–137.
- Szabo, E.A. and Cahill, M.E. (1999) Nisin and ALTA™ 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100% CO<sub>2</sub>. *Lett Appl Microbiol* **28**, 373–377.
- Tapia de Daza, M.S., Villegas, Y. and Martinez, A. (1991) Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature. *Int J Food Microbiol* **14**, 333–337.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A. and Ross, T. (2000) Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4979–4987.
- Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., François, K., Devlieghere, F. and Debevere, J. (2004) Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **90**, 219–236.
- Walker, S.J., Archer, P. and Banks, J.G. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Appl Bacteriol* **68**, 157–162.
- Wang, L.-L. and Johnson, E.A. (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl Environ Microbiol* **58**, 624–629.
- Wang, L.-L. and Johnson, E.A. (1997) Control of *Listeria monocytogenes* by monoglycerides in foods. *J Food Prot* **60**, 131–138.
- Wang, C. and Shelef, L.A. (1992) Behavior of *Listeria monocytogenes* and the spoilage microflora in fresh cod fish treated with lysozyme and EDTA. *Food Microbiol* **9**, 207–213.
- Zapico, P., Gaya, P., Nunez, M. and Medina, M. (1993) Goats' milk lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **56**, 988–990.
- Zuliani, V., Garry, P., Vendevre, J.-L., Augustin, J.-C., Lebert, I. and Lebert, A. (2003) Growth of *Listeria monocytogenes* in ground pork as a function of pH and water activity. In *Predictive Modelling in Foods 4th International Conference-Conference Proceedings* ed. van Impe, J.F.M., Geeraerd, A.H., Leguerinel, I. and Mafart, P. pp. 43–45. Leuven, Belgium: Katholieke Universiteit Leuven/BioTec.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and van't Riet, K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1875–1881.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C. and van't Riet, K. (1991) Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1094–1101.

## Chapitre ii : Modélisation de la latence bactérienne

Les modèles primaires de croissance sont utilisés pour décrire la cinétique de croissance des bactéries dans les aliments. Les modèles primaires utilisent deux paramètres : le temps de latence et le taux de croissance. Les modèles secondaires décrivent l'influence des facteurs environnementaux sur ces deux paramètres. Dans l'article 1 nous avons décrit les différents modèles secondaires pour le taux de croissance. Dans cette partie, nous donnons les différentes approches de modélisation primaires et secondaires du temps de latence.

### I. Définitions du temps de latence

#### I.1. Durée de la phase de latence

Nous avons déjà présenté la phase de latence comme une des phases de la cinétique de croissance d'une population bactérienne (Figure 1). Cette phase de latence est une phase d'adaptation d'une population à son nouvel environnement. La durée de cette phase est quantifiée par le temps de latence *lag*. Buchanan et Solberg (1972) ont proposé une première définition du temps de latence comme étant le temps nécessaire pour observer un doublement de la population initiale. Buchanan et Cygnarowicz (1990) ont proposé une autre approche basée sur l'accélération progressive du taux de croissance pendant la phase de latence pour calculer le temps de latence. Le temps de latence est dans ce cas défini comme le temps pour lequel cette accélération est maximale. Une troisième approche consiste à estimer le temps de latence à l'aide de la cinétique de croissance du logarithme de la concentration cellulaire. Le temps de latence est ainsi estimé par l'intersection entre la tangente de la phase exponentielle avec le niveau de la population initiale (Figure 1). C'est cette dernière définition qui est aujourd'hui la plus utilisée pour déterminer la durée de la phase de latence.

#### I.2. Temps de latence populationnel

Il existe deux approches de modélisation pour déterminer le temps de latence à partir d'une cinétique de croissance du logarithme de la population : une approche déterministe et une stochastique. Ces deux approches sont présentées ci-dessous. Dans le cas de l'approche déterministe de la croissance, le temps de latence est un des paramètres du modèle. Nous appellerons ce temps de latence, le temps de latence déterministe (ou *lag*).

Pour l'approche stochastique, le temps de latence est une variable aléatoire qui est fonction des temps de latence des  $x_0$  cellules constituant la population. Nous appellerons ce temps de latence le temps de latence stochastique (ou  $lag(x_0)$ ).

### I.3. Temps de latence cellulaire et cycle cellulaire

Le cycle complet de division bactérienne est divisé en trois périodes distinctes B, C et D (Botello et Nordström, 1998). Ce cycle est schématisé sur la Figure 2. Nous avons indiqué dans le chapitre I.I.1.1 que la durée de la période B joue un rôle primordial sur la durée de la période du cycle cellulaire complet (Koppes et al., 1980 ; Kutilik et al., 2005b). Le cycle complet cellulaire ou premier temps de division d'une cellule bactérienne doit cependant ne pas être confondu avec le temps de latence cellulaire. En effet, le premier temps de génération regroupe le temps de latence cellulaire et le temps de génération.

Nous utiliserons la notation  $\tau_i$  pour les temps de latence cellulaires dans le reste du document.

## II. Modèles de croissance et latence bactérienne

### II.1. Les modèles primaires

Les modèles primaires permettent de décrire les cinétiques de croissance bactérienne et ses trois phases : phase de latence, phase exponentielle et phase stationnaire. Les modèles primaires utilisent les quatre paramètres suivants :

- le temps de latence (*lag*) que nous venons de définir,
- le taux de croissance maximum,  $\mu_{\max}$ , qui est égal à  $\ln(2)/T_g$ ,  $T_g$  étant le temps de génération,
- la concentration bactérienne initiale  $x_0$ ,
- la concentration bactérienne maximale atteinte  $x_{\max}$ .

Il existe deux types de modèles primaires, les modèles déterministes et les modèles stochastiques. La plupart des modèles primaires développés sont des modèles déterministes. Ils utilisent, pour décrire la croissance d'une population, un jeu unique de valeurs des quatre paramètres ( $x_0$ ,  $x_{\max}$ ,  $\mu_{\max}$  et *lag*). Pour les modèles stochastiques, le comportement de chacune des cellules dans la population est pris en compte et est relié au comportement de la population. Dans l'approche stochastique (également appelée approche probabiliste) les paramètres du modèle sont des variables aléatoires représentant la variabilité biologique au sein d'une population.

### II.1.1. Approches déterministes

- Structure générale des modèles primaires

Les premiers modèles primaires utilisés étaient des modèles sigmoïdes (Gibson et al., 1988 ; Zwietering et al., 1990). Cependant ces modèles sont purement empiriques et ne reposent sur aucune hypothèse biologique. Depuis les années 1990, de nouveaux modèles primaires moins empiriques ont été proposés. Ces modèles primaires sont basés sur l'équation différentielle suivante, selon un modèle proposé par Baranyi et al. (1993) :

$$\frac{dx}{xdt} = \mu_{\max} \alpha(t) f(x) \text{ avec } x(t=0)=x_0$$

$x$  étant la concentration cellulaire,  $\mu_{\max}$  le taux de croissance spécifique maximum,  $\alpha(t)$  une fonction d'ajustement qui décrit l'adaptation de la population bactérienne à son environnement et  $f(x)$  une fonction qui décrit l'entrée en phase stationnaire. Cette dernière est généralement décrite par la fonction de freinage suivante :  $f(x) = \left(1 + \frac{x}{x_{\max}}\right)$ . Récemment, Baty et Delignette-Muller (2004) ont comparé les différents modèles primaires existants. Bien que basés sur des hypothèses biologiques différentes, ces auteurs ont montré qu'un certain nombre de modèles étaient mathématiquement équivalents. Ainsi, ils ont identifié trois formes de modèle primaire basées sur l'équation différentielle de Baranyi où  $\alpha(t)$  varie selon le type de modèle.

- Le modèle logistique avec délai :

Pour ce modèle l'adaptation  $\alpha(t)$  est immédiate :

$$\alpha(t) = \begin{cases} 0 & (t \leq \text{lag}) \\ 1 & (t > \text{lag}) \end{cases}$$

- Le modèle de Baranyi et Roberts (1994) :

$$\alpha(t) = \frac{q(t)}{1+q(t)} \text{ où } \frac{dq}{dt} = \mu_{\max} \cdot q \text{ avec } q(t=0)=q_0$$

- Le Modèle de Hills et Wright (1994) :

$$\alpha(t) = \frac{\mu_{\max}}{\exp(\mu_{\max} \cdot \text{lag}) - 1} \left( \frac{m - x(t)}{x(t)} \right) \text{ et } \frac{dm}{dt} = \mu_{\max} \cdot m \text{ où } m(t=0)=x_0$$

### II.1.2. Approches stochastiques

- Le modèle de Buchanan et al. (1997)

Buchanan et al. (1997) ont proposé un modèle décrivant les courbes de croissance en trois parties distinctes, la phase de latence, la phase stationnaire pour lesquelles le taux de croissance est nul et la phase de croissance exponentielle où le logarithme du nombre de cellules augmente de façon linéaire avec le temps. À première vue ce modèle apparaît comme purement déterministe. Cependant le modèle proposé comporte une partie stochastique pour le temps de latence. Pour une cellule bactérienne, les auteurs font l'hypothèse que le temps de latence est divisé en deux parties : le temps d'ajustement et la période métabolique. Le temps d'ajustement,  $\tau_i$ , correspond au temps d'adaptation des cellules à leur nouvel environnement. La période métabolique,  $t_{mi}$ , correspond au temps nécessaire à la cellule bactérienne pour générer suffisamment d'énergie et pour synthétiser le matériel biologique utile à la réPLICATION, on a donc :

$$lag_i = \tau_i + t_{mi}$$

Pour ce modèle les auteurs font l'hypothèse qu'il existe une variabilité biologique des deux périodes pour des cellules individuelles. Cette variabilité induit une distribution des temps de latence des cellules. Si la variabilité de  $\tau_i$  et  $t_{mi}$  est grande, elle explique la transition progressive de la latence à la phase exponentielle au niveau de la population.

- Le modèle de Baranyi (1998), généralisé par Katalik et al. (2005a)

Baranyi (1998) a proposé une relation entre les temps de latence cellulaires  $\tau_i$  et le temps de latence populationnel  $lag(x_0)$ . Le modèle part de l'hypothèse que les  $N_0$  cellules constituant l'inoculum de départ se comportent indépendamment les unes des autres. L'auteur considère deux compartiments dans la population bactérienne ( $x(t)$ ) : les cellules en phase exponentielle ( $x_{exp}(t)$ ) et les cellules en phase de latence ( $x_{lag}(t)$ ) :

$$x(t) = x_{lag}(t) + x_{exp}(t) \text{ avec}$$

$$\frac{dx_{lag}}{dt} = -\nu \cdot x_{lag}(t) \text{ et } \frac{dx_{exp}}{dt} = \mu_{max} \cdot x_{exp}(t) + \nu \cdot x_{lag}(t) \text{ et } x(0) = x_{lag}(0) = x_0$$

où  $\nu$  est la vitesse de passage des cellules de la phase de latence à la phase exponentielle.

Cependant cette relation repose sur une forme particulière de la distribution des temps de latence cellulaires : la distribution exponentielle. Katalik et al. (2005a) ont étendu cette relation à toutes les distributions :

$$\frac{dx_{lag}}{dt} = -f(t) \text{ et } x_{lag}(0) = x_0 \cdot F(0)$$

$$\frac{dx_{\text{exp}}}{dt} = \mu_{\max} \cdot x_{\text{exp}}(t) + f(t) \text{ et } x_{\text{exp}}(0) = x_0 \cdot (1 - F(0))$$

où  $f$  est la fonction de densité de probabilité de la distribution des temps de latence cellulaires, et  $F$  leur fonction de répartition.

- Le modèle de McKellar (2001)

Dans le modèle de McKellar (2001), il existe trois compartiments :

- le compartiment des cellules en croissance (compartiment G),
- le compartiment des cellules ne se multipliant pas (compartiment NG),
- le comportement de l'état physiologique de chacune des cellules (noté  $\pi_i$ ).

Ce modèle stochastique est un modèle Continu-Discret-Continu où la transition est possible entre les compartiments G et NG. Au départ toutes les cellules se trouvent dans le compartiment NG et une valeur d'état physiologique est donnée à chacune d'entre elles. Une distribution Normale tronquée aux valeurs positives est utilisée pour les valeurs de  $\pi_i$ . Les cellules passent dans le compartiment G quand  $\pi_i(t)$  est égal à zéro. La vitesse d'adaptation est proportionnelle au taux de croissance :

$\frac{d\pi_i}{dt} = -\mu_{\max}$ . Ce modèle présente la possibilité d'avoir une approche dynamique de la latence en conditions environnementales changeantes.

## II.2. Liens entre le temps de latence stochastique et le temps de latence de l'approche déterministe

Baranyi (1998, 2002) et Baranyi and Pin (1999, 2001) ont abordé le lien entre la latence déterministe ( $lag$ ), le temps de latence stochastique ( $lag(x_0)$ ) et les temps de latence cellulaires ( $\tau_i$ ). Plus récemment Kutalik et al. (2005a) ont démontré que  $lag \leq E(lag(x_0)) \leq E(\tau_i)$ , où  $E(-)$  est l'espérance de la variable aléatoire entre parenthèses. Les auteurs ont ensuite précisé, détaillé et développé les relations entre ces différentes latences.

### II.2.1. Lien entre le temps de latence déterministe et les temps de latence cellulaires

En partant du modèle stochastique proposé par Baranyi (1998) (présenté dans la partie II.1.2.a), Kutalik et al. (2005a) ont montré que le temps de latence déterministe pouvait être estimé à partir des temps de latence cellulaires à l'aide la relation suivante :

$$lag = -\frac{1}{\mu} \log(E(\exp(-\mu \cdot \tau_i)))$$

où  $E(\cdot)$  est l'espérance de la variable aléatoire entre parenthèses.

Il faut noter que cette relation peut être utilisée pour estimer  $lag$  à partir des  $\tau_i$  mais que l'inverse n'est pas possible.

### II.2.2. Lien entre le temps de latence stochastique et les temps de latence cellulaires

Le lien entre ces deux temps de latence a été proposé par Baranyi (1998) :

$$lag(x_0) = -\frac{1}{\mu} \log\left(\frac{1}{x_0} \sum_{i=1}^{x_0} \exp(-\mu \cdot \tau_i)\right).$$

Comme les temps de latence cellulaires,  $lag(x_0)$  est une variable aléatoire. Pour cette raison, Katalik et al. (2005a) ont précisé le lien entre l'espérance et la variance du temps de latence stochastique et les temps de latence cellulaires des populations. Dans notre étude, nous n'utiliserons que la relation proposée par Baranyi (1998).

### II.2.3. Lien entre le temps de latence stochastique et le temps de latence déterministe

Le lien entre ces deux temps latences a été proposé par Baranyi (1998). La valeur de l'espérance du temps de latence stochastique tend vers le temps de latence déterministe quand  $x_0$  devient suffisamment grand :

$$\lim_{x_0 \rightarrow \infty} lag(x_0) = lag = -\frac{1}{\mu} \cdot \ln(E[\exp(-\mu \cdot \tau_i)])$$

Les caractéristiques des distributions des temps de latence cellulaires rendent la convergence plus ou moins rapide du temps de latence stochastique vers sa limite  $lag$ . Un exemple de l'influence de la taille de  $x_0$  sur le temps de latence stochastique et de la convergence est représenté sur la Figure 3.

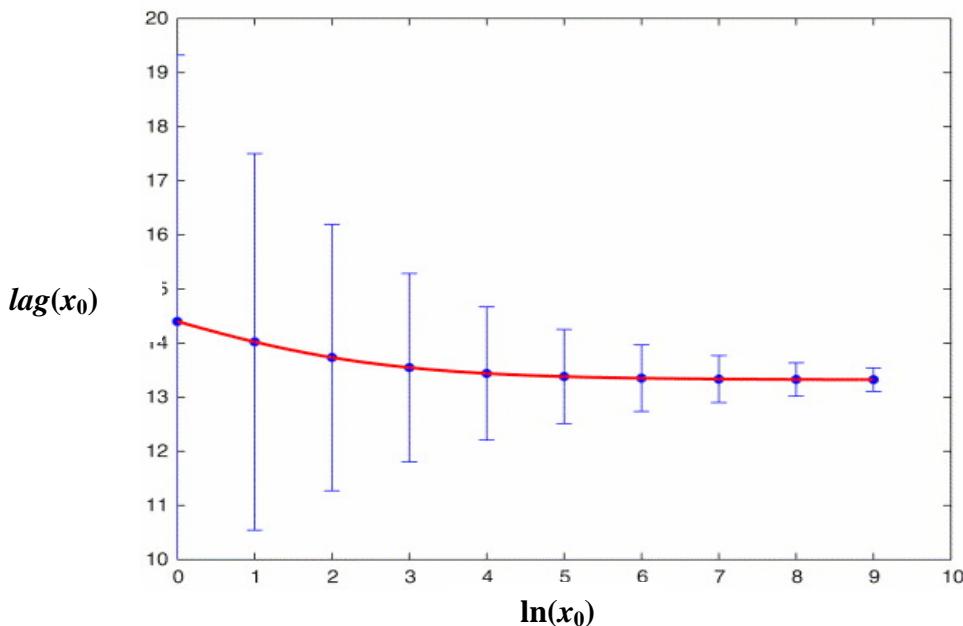


Figure 3. Relation entre le nombre initial de cellules ( $x_0$ ) et le temps de latence stochastique ( $lag(x_0)$ ). Les barres verticales représentent +/- un écart type. (D'après Katalik et al., 2005a).

## II.3. Facteurs influençant la durée de la phase de latence

### II.3.1. Les conditions de croissance

L'approche la plus utilisée est basée sur l'hypothèse que le produit  $\mu_{\max} \times lag$  (Baranyi et Roberts, 1994 ; Zietering et al., 1994 ; Rosso, 1995 ; McKellar, 1997 ; Deligenette Muller, 1998 ; Augustin et Carlier, 2000) ou  $\mu_{\max} \times \tau_i$  (McKellar et al., 2002a) ne dépend pas des conditions de croissance mais uniquement des conditions pré-incubatoires. Robinson et al. (1998) ont décrit ce produit comme représentant le « work to be done » (travail à accomplir) par les cellules au cours de la latence afin de pouvoir entrer en phase exponentielle de croissance.

Avec cette hypothèse le temps de latence peut être facilement déduit à partir de la valeur de  $\mu_{\max}$  et de la valeur de la constante pour une condition pré-incubatoire donnée. C'est cette approche qui a été utilisée par les modèles secondaires de type cardinaux (Rosso et al., 1995 ; Augustin et Carlier, 2000 ; LeMarc et al., 2002).

D'autres auteurs ont également utilisé cette approche pour transformer les modèles secondaires de  $\mu_{\max}$  de type racine carré (Adair et al., 1989 ; Zwietering et al., 1991 ; Devlieghere et al., 2000) ou Arrhenius (Davey, 1991) en modèles secondaires pour le temps de latence.

Plusieurs auteurs ont proposé une modélisation de la latence indépendante du taux de croissance. Dans ce cas, des modèles polynomiaux (Buchanan et Phillips, 1990 ; Zaika et al., 1998) ou des approches par réseau de neurones (Geeraerd et al., 1998) furent utilisés pour décrire

l'influence des conditions environnementales sur le temps de latence déterministe estimé à partir d'un modèle primaire.

Enfin une dernière approche de la modélisation secondaire de la latence est celle proposée par Zwietering et al. (1991), où une fonction hyperbolique est utilisée pour décrire l'influence de la température sur la latence. Les auteurs ont également proposé une transformation logarithmique du temps de latence pour stabiliser la variance des mesures.

### II.3.2. Les conditions de pré-incubation

Nous avons donné divers exemples de l'impact de l'état physiologique initial, induit par les conditions de pré-incubation, sur le temps de latence pour *L. monocytogenes* dans le chapitre i.I.2.2. Cependant les publications tentant de modéliser cet impact des conditions pré-incubatoires sont plus rares et portent essentiellement sur l'impact du changement de température entre les conditions de croissance et les conditions pré-incubatoires (Zwietering et al., 1994 ; Bréand et al., 1997 ; Augustin et al., 2000b ; Whiting et Bagi, 2002 ; Delignette-Muller et al., 2005). Whiting et Bagi (2002) ont proposé un modèle polynomial décrivant la latence (déterministe) en fonction des températures d'incubation ( $T_{growth}$ ) et de pré-incubation ( $T_{prior}$ ). Ce modèle est un modèle polynomial :

$$\log_{10}(lag) = a + b \cdot T_{prior} + c \cdot T_{growth} + d \cdot T_{prior}^2 + e \cdot T_{growth}^2 + f \cdot T_{prior} \cdot T_{growth}$$

Whiting et Bagi ont également proposé un paramétrage différent en fonction de l'état physiologique des cellules (en phase exponentielle, stationnaire ou ayant préalablement subi un stress nutritionnel, froid ou par dessiccation). En reprenant les mêmes données, Delignette-Muller et al. (2005) ont proposé un modèle linéaire simple pour décrire l'évolution du produit du temps de latence et du taux de croissance en fonction des températures d'incubation et de pré-incubation.

L'approche d'Augustin et al. (2000b), en plus de la température de pré-incubation ( $T_i$ ), prend en compte la durée de cette période ( $t_i$ ) dans un modèle secondaire. Selon l'origine des cellules, les auteurs distinguent trois scénarios :

Pour les cellules prélevées au cours d'une culture en phase de latence (de durée  $\lambda_i$ ) à une température  $T_i$ , à un temps  $t_i$  ( $t_i < \lambda_i$ ) :

$$\lambda \cdot \mu_{max} = \mu_{max,i} \cdot (\lambda_i - t_i)$$

On retrouve dans ce cas le modèle secondaire proposé en cas de condition dynamique de croissance décrit en ii.II.3.1.

Pour des cellules provenant d'une culture en phase exponentielle, l'adaptation au nouvel environnement est considérée comme étant instantanée et indépendante des conditions de pré-incubation :

$$\lambda \cdot \mu_{max} = 0$$

Pour des cellules prélevées à  $t_i$  dans une culture entrée en phase stationnaire depuis le temps  $t_s$  :

$$\lambda \cdot \mu_{\max} = \sqrt{k \cdot (t_i - t_s)}$$

où k est une fonction de  $\mu_{\max}$ . L'explication à cette relation tient au fait que les cellules entrées en phase stationnaire réduisent leur biomasse et ainsi le « travail à accomplir » devient plus important.

Bréand et al. (1997, 1999) ont également modélisé l'influence de la durée et de la température du traitement thermique sur la latence de la part de la population survivante de *L. monocytogenes*. Bréand et al. (1997) ont dans un premier temps proposé un modèle décrivant l'influence de la durée de stress ( $d_s$ ) pour des températures de pré-incubation ( $T_s$ ) supérieures à la température maximale de croissance  $T_{\max}$  :

$$\text{lag}(d_s) = L_{\min} + \frac{A(d_s)}{1 - \exp(B(d_s) - 1.12)}, \text{ avec } A(d_s) = \left[ \frac{(1.33 \times L_{opt} - 0.33 \times L_{\min} - L_0) \times d_s + (L_0 - L_{\min})}{d_{opt}} \right]$$

et  $B(d_s) = \left[ 3.81 \times \frac{(1.33 \times L_{opt} - 0.33 \times L_{\min} - L_0) \times (d_s - d_{opt})}{d_{opt} \times (L_{opt} - L_{\min})} \right]$

pour lesquelles  $L_{\min}$  représente le seuil de latence atteint pour des durées de stress longues,  $L_0$  la latence pour une durée de stress nulle,  $L_{opt}$  la latence la plus grande et  $d_{opt}$  la durée de stress engendrant cette latence maximale.

Ensuite les auteurs ont développé un modèle secondaire décrivant l'influence de la température de stress sur les paramètres de leur premier modèle. A ce dernier modèle, ils ont introduit un nouveau paramètre,  $\alpha$ , la pente de la première phase linéaire. De plus les auteurs ont considéré  $L_0$  comme une condition initiale du modèle et ils ont ré-exprimé le paramètre  $L_{opt}$  en fonction de  $L_{\min}$ ,  $\alpha$ ,  $L_0$  et  $d_{opt}$ .

Les auteurs ont proposé les modèles secondaires suivants pour les paramètres du modèle temps de latence :

$$d_{opt} = c_1 \times 10^{c_2 T_s} + \varepsilon$$

$$\alpha = c_3 \times 10^{c_4 T_s} + \varepsilon$$

$$L_{\min} = c_5 + \varepsilon.$$



## **Chapitre *iii* : Acquisition de données pour la mesure du temps de latence**

Le développement de modèle nécessite l'acquisition de données. La quantité de données est particulièrement importante pour le développement des modèles stochastiques, où il faut caractériser la variabilité biologique du temps de latence. Dans cette partie nous présentons les principales méthodes qui sont utilisées pour la détermination des temps de latence.

### **I. Dénombrements des unités formant colonie**

La méthode des dénombrements des unités formant colonies reste encore aujourd’hui la méthode la plus utilisée et la méthode de référence pour l’acquisition des paramètres de croissance (Baty et Delignette-Muller, 2004).

#### **I.1. Principe**

Cette méthode nécessite l’ensemencement d’un échantillon de la culture bactérienne ou d’une de ses dilutions sur une ou plusieurs boîtes de Pétri contenant un milieu de culture. Il s’agit de la méthode standard de dénombrement du nombre de cellules bactériennes par unité de volume. Cette technique suppose qu'à une bactérie déposée au départ correspond après incubation exactement une colonie. La croissance est ainsi mesurée en unités formant colonies (ufc). Le nombre et la qualité des dénombrements réalisés (Baty et Delignette-Muller, 2004) définissent la qualité de l'estimation du temps de latence. La répartition des dénombrements (Poschet et al., 2004) a également une influence sur l'incertitude de l'estimation du paramètre.

#### **I.2. Méthodes de détermination des temps de latence**

L'ajustement d'un modèle primaire de croissance à une cinétique consiste en l'estimation de 4 paramètres : temps de latence (*lag*), taux de croissance maximal ( $\mu_{\max}$ ), densité bactérienne de l'inoculum ( $N_0$ ) et densité bactérienne finale ou capacité maximale ( $N_{\max}$ ). Par convention, ils sont nommés "paramètres de cinétique". Parmi ces quatre paramètres, le temps de latence (*lag*) et le taux de croissance maximal ( $\mu_{\max}$ ) sont nommés les paramètres de croissance. Les modèles primaires le plus souvent utilisés pour la détermination de la latence sont décrits dans le chapitre *ii.II.1*.

## **II. Mesure de l'absorbance d'une culture bactérienne**

La méthode basée sur l'absorbance ou densité optique (DO) est une méthode rapide, peu coûteuse et facilement automatisable.

### **II.1. Principe**

La mesure de l'absorbance (ou turbidité ou densité optique) est une technique alternative à la technique par dénombrement des unités formant colonies (ufc). La turbidité est le ratio entre l'intensité de la lumière incidente et celle de la lumière réfléchie par le milieu. La limite de détection de cette méthode correspond à des concentrations cellulaires supérieures à  $10^6$  cellules/ml (Dalgaard et al., 1994). Au delà de ce seuil ( $10^6$  à  $10^{7.5}$  cellules  $\text{ml}^{-1}$ ) l'absorbance est proportionnelle à la concentration en cellules (McMeekin et al., 1993 ; Begot et al., 1996). Cette relation de proportionnalité dépend de la taille et de la forme des cellules bactériennes qui peuvent être influencées par les conditions environnementales (Métris et al, 2003). La gamme de validité de cette relation peut être très étroite, par exemple, LeMarc (2002) a montré que pour *L. monocytogenes* cette gamme était très réduite en présence d'acide lactique. La corrélation entre la concentration cellulaire et l'absorbance est également dépendante de l'espèce bactérienne (Bégot et al., 1996) et même de la souche (Baty et al., 2002). En passant par une étape de calibration entre DO et concentration cellulaire, certains auteurs ont directement déterminé les paramètres de croissance avec les courbes de DO (Dalgaard et al., 1994, Begot et al., 1996 ; Bréand et al, 1997 ; Augustin et al., 1999, Dalgaard et Koutsoumanis, 2001). Cependant si l'on considère un inoculum inférieur au seuil de détection de l'appareil, il est nécessaire de disposer d'une courbe de calibration et de connaître l'inoculum de départ. De plus, si l'on compare la méthode par DO et la méthode par dénombrement des ufc, des différences significatives sont parfois observées (Augustin et al., 1999 ; Dalgaard et Koutsoumanis, 2001). Comme l'ont montré et Baty et al. (2002), l'estimation des paramètres de croissance dépend non seulement de la technique utilisée mais aussi des modèles employés. En effet d'après Baty et al. (2002), c'est le choix du modèle plus que de la méthode (DO ou ufc) qui est important.

### **II.2. Méthodes pour la détermination des temps de latence**

Plusieurs méthodes ont été proposées pour la détermination des temps de latence à partir des DO.

- Augustin et al. (1999) ont comparé différents modèles et ont proposé la détermination du temps de latence en deux temps. D'abord les auteurs proposent l'utilisation du modèle

exponentiel avec délai ajusté sur les cinétiques de DO pour la détermination du taux de croissance.

Le taux de croissance, ainsi estimé est ensuite corrigé par un facteur 0.94 puis utilisé dans le modèle

$$\text{suivant : } \text{lag} = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln \left( \frac{x_0 \cdot (x_{\max} - x(t))}{x(t) \cdot (x_{\max} - x_0)} \right).$$

À partir de ce modèle et de deux dénombrements réalisés pendant la phase exponentielle de croissance et avant la limite de détection, le temps de latence moyen est calculé.

- Dalgaard et Koutsoumanis (2001) ont utilisé différentes méthodes de détermination du taux de croissance et de la latence par DO. Afin de choisir quelle était la meilleure méthode, les auteurs ont comparé les résultats obtenus par DO aux résultats obtenus par dénombrement des ufc. Le modèle de Richards s'est révélé le meilleur pour l'estimation du temps de latence et du taux de croissance à partir des cinétiques de DO. L'estimation de la latence se fait en deux temps, d'abord le taux de croissance ( $\mu_{DO_R}$ ) est déterminé à partir des courbes de DO et du modèle de Richard :

$$DO_t = DO_{\min} + \frac{DO_{\max} - DO_{\min}}{\left[1 + \exp(-\mu_{DO_R} \cdot m \cdot (t - t_i))\right]^{\frac{1}{m}}}, \text{ où } t_i \text{ est le point d'inflexion de la courbe et } m \text{ une constante de valeur 0.5, 1 ou 2. Ensuite la latence est calculée à partir de la relation proposée par Baranyi et Pin (1999) :}$$

$$\text{lag} = T_d - \frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu_{DO_R}}, \text{ où } T_d \text{ est le temps correspondant à une augmentation de } DO_{\min} \text{ de 0.05 unité, } N_d \text{ le nombre d'ufc à } T_d \text{ et } N_0 \text{ l'inoculum de départ.}$$

- Une autre approche consiste en l'utilisation du temps nécessaire à un nombre initial de cellules ( $x_0$ ) pour atteindre un niveau détectable de DO (Baranyi et Pin, 1999 ; McKellar et Knight , 2000 ; Métris et al., 2003) plutôt que l'utilisation de la courbe entière. La méthode développée par Baranyi et Pin (1999) repose sur l'équation suivante :

$$\text{lag} = T_d - \frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu}. \text{ A partir de différentes séries de valeur de } T_d \text{ générées par}$$

différents inoculums ( $N_0$ ) et en connaissant précisément  $N_d$ , les auteurs ont proposé une méthode basée sur l'analyse de la variance pour déterminer lag et  $\mu$ .

- Enfin la quatrième et dernière approche consiste dans un premier temps à transformer les données de DO en ufc/ml à l'aide de courbes de calibration. Une fois la transformation

réalisée, le temps de latence de l'inoculum de départ est déterminé par l'intersection de la phase exponentielle obtenue à partir des courbes de DO et du niveau de l'inoculum. Bréand et al. (1997) ont proposé cette méthode avec un inoculum élevé. François et al. (2005a) ont adapté cette méthode pour la détermination des temps de latence cellulaires. Cette adaptation est rendue possible par la maîtrise de l'inoculum. En effet François et al. (2003) ont proposé une méthode assurant dans 80% des cas d'avoir une cellule par puits.

### **III. Observation des cellules par microscopie**

#### **III.1. Principe**

Un grand avantage de la microscopie est de permettre le suivi direct de cellules individuelles sur des périodes longues. Ainsi, pour la détermination des temps de latence cellulaires, cette méthode présente un avantage par rapport à des méthodes indirectes basées sur des temps de détection. En effet la méthode de détermination des temps de latence cellulaires à partir des valeurs de  $T_d$  présente des difficultés (Métris et al., 2003 ; Swinnen et al., 2004). Par exemple, la part de la variabilité des distributions de  $T_d$  expliquée par les distributions des temps de latence reste difficile à déterminer (Métris et al., 2003).

De plus l'automatisation et les outils d'analyse d'image rendent la technique encore plus abordable. Cependant, au vu de la bibliographie, l'utilisation de cette technique en microbiologie prévisionnelle reste rare et se limite à la publication de Wu et al. (2000). Cette technique jusqu'à récemment présentait l'inconvénient de ne permettre l'acquisition que de peu de données. L'utilisation de cette technique étant surtout intéressante pour la détermination des distributions des temps de latence, la microscopie n'a plus été utilisée dans ce but jusqu'à récemment.

Elfwing et al. (2004) ont apporté une solution au problème du faible nombre de données. En développant une méthode d'acquisition d'images de plusieurs milliers de cellules simultanément ils ont répondu au principal inconvénient de l'acquisition des temps de latence cellulaires par microscopie. Les cellules bactériennes utilisées sont déposées sur une surface, où elles adhèrent. Elles sont alimentées par un flux de milieu de culture et peuvent entamer leur division cellulaire. Une fois la division terminée une des deux cellules est emportée par le flux de nutriments tandis que l'autre reste adhérente à la surface. Ainsi le champ microscopique n'est pas encombré par les nouvelles cellules et il est possible de suivre la division de la cellule adhérente après sa première division. Cette technique ouvre de nouvelles perspectives, notamment l'étude de la transition entre la phase de latence et la phase de croissance exponentielle cellulaire (Métris et al., 2005 ; Katalik et al., 2005b). On peut cependant se demander si l'état physiologique particulier des cellules

adhérentes ne biaise pas les résultats par rapport à ceux que l'on obtiendrait avec des cellules planctoniques ou immobilisées. En effet, plusieurs études ont montré des changements phénotypiques importants des cellules adhérentes. Par exemple, Williams et al. (1999) et Lupens et al. (2002) ont observé pour *Staphylococcus aureus* une diminution du taux de croissance et de la taille des cellules adhérentes par rapport à des cellules planctoniques. Ces différences ont également été observées au niveau de la modulation de l'expression de plusieurs gènes (Stanley et al., 2003) chez *Bacillus subtilis*. En outre, le phénomène d'adhésion est fortement lié à l'état physiologique des cellules (Reid et al., 1999) ; un biais de sélection des cellules analysées serait ainsi réalisé.

### **III.2. Méthodes pour la détermination des temps de latence**

La latence déterminée par observation est différente de la latence déterminée par DO ou par dénombrement. En effet l'observation microscopique permet d'observer le premier temps de génération. Ce temps comprend le temps de latence plus le temps de division. Le premier temps de génération d'une cellule individuelle dans son nouvel environnement est donc par définition plus long que la latence cellulaire. Grâce à la méthode décrite par Elfwing et al. (2004) et au modèle primaire de Kutilik et al. (2005b), il est possible de retrouver le temps de latence cellulaire, défini dans ce cas comme le temps où aucune augmentation de la taille n'est observée.

## **IV. Mesure de la surface ou du volume de colonies bactériennes**

### **IV.1. Principe**

De la même façon que pour la microscopie, l'automatisation et l'analyse d'image rendent plus accessibles l'utilisation du suivi de la croissance des colonies bactériennes. L'avantage principal de cette technique tient surtout à la possibilité de travailler en milieux solides qui sont proches des conditions environnementales des matrices alimentaires (Rasch, 2004). En effet les cellules bactériennes en milieu solide sont immobilisées et forment des colonies (Dodd and Waites, 1991 ; Wimpenny et al. 1995 ; Johnson et al., 1996 ; Parker et al., 1998 ; Brocklehurst 2004). Différents dispositifs ont été mis au point pour le suivi de la croissance des cellules ou des colonies en surface (Chapuis et al., 1995 ; Wimpenny et al., 1995 ; McKey et al., 1997 ; Harrison et al. 2000, Stecchini et al., 1998 et 2001) ou dans la masse (Mitchell et Wimpenny, 1997 ; Wright et al., 2000 ; Hornbaek et al., 2004). Les méthodes du suivi de la croissance des colonies reposent sur trois techniques :

- Le système « gel-cassette » (Brocklehurst et al., 1997 ; Wright et al., 2000). Ce système comprend une cassette contenant le gel inoculé avec des cellules. Ce gel est soumis à un laser qui illumine successivement les différentes zones de la surface de la cassette. La mesure de la croissance des colonies est réalisée par la mesure de l'angle du faisceau incident du laser dévié par les colonies. Ce système nécessite une calibration entre les mesures laser et le nombre d'ufc. Mais l'inconvénient majeur de ce système est que cette calibration doit être recommandée à chaque nouvelle expérience.
- La mesure de la densité optique (DO). Cette technique développée par Wimpenny et al. (1995) est basée sur l'analyse d'image et la mesure de la DO en différents points d'une colonie. Le taux de croissance à l'intérieur des colonies est calculé en posant l'hypothèse que la DO est proportionnelle au nombre de cellules présentes. Avec une transformation logarithmique de la DO et la mesure de celle-ci au cours du temps,  $\mu$  est obtenu par la relation suivante :

$$\mu = \frac{\ln(DO_2) - \ln(DO_1)}{t_2 - t_1}$$

Cependant cette technique n'a jamais été appliquée pour la détermination

du temps de latence, mais plutôt pour démontrer l'hétérogénéité du taux de croissance en fonction de l'emplacement des cellules à l'intérieur d'une colonie.

- La mesure des surfaces et des volumes. Des cinétiques de l'augmentation des surfaces et volumes de colonies sont réalisées par analyse d'image. Une calibration entre la surface ou le volume des colonies et le nombre d'ufc les constituant est alors nécessaire. De cette manière, Harrison et al. (2000) ont réussi à suivre la croissance de *L. monocytogenes* et *Yersinia enterocolitica*. Hornbaek et al. (2004) en mesurant le volume de colonies au cours du temps ont réussi à déterminer le temps de latence et le taux de croissance en utilisant le modèle de Baranyi et Roberts (1994).

## IV.2. Méthodes pour la détermination des temps de latence

Les temps de latence ne peuvent être déterminés que lorsque l'on dispose d'une courbe de calibration entre les mesures (surface, volume, intensité) et les ufc formant les colonies. À notre connaissance, deux études ont utilisé cette transformation et effectué une estimation du temps de latence : les études de Wright et al. (2000) et de Hornbaek et al. (2004). Les auteurs ont déterminé les paramètres de croissance à l'aide de modèles primaires à partir des mesures d'intensité (Wright et al., 2000) ou des volumes de colonies (Hornbaek et al., 2004) transformées en ufc.





## RÉSULTATS & DISCUSSIONS

Nous avons vu que les tentatives de modélisation de l'effet des conditions pré-incubatoires sur le temps de latence de *L. monocytogenes* portaient uniquement sur l'effet de la température (Chapitre *ii*). Nous nous sommes proposés d'étendre l'étude des conditions de pré-incubation à des conditions réalistes par rapport aux situations de contamination des produits alimentaires. Dans le Chapitre A, nous allons présenter les aspects méthodologiques portant sur la préparation de 22 états physiologiques différents de *L. monocytogenes*.

Il ressort également de la revue bibliographique (Chapitre *iii*) qu'il n'existe pas de méthode pour étudier les temps de latence au niveau cellulaire en milieu solide. Nous décrivons une nouvelle méthode de détermination des temps de latence cellulaires en milieu solide dans le Chapitre B.

Nous présenterons ensuite les distributions observées des temps de latence cellulaires pour les 22 états physiologiques dans une condition de re-croissance en milieu liquide (Chapitre C) ainsi que les résultats pour trois des états physiologiques dans différentes conditions de re-croissance (Chapitre D). Nous aborderons également l'effet souche sur les temps de latence cellulaires dans le Chapitre E.

Pour terminer, nous proposerons une distribution théorique décrivant l'ensemble des données et un modèle reliant le temps de latence populationnel et les temps de latence cellulaires (Chapitre F).

## **Chapitre A : Souche utilisée et protocoles des stress simples ou combinés appliqués**

Pour répondre à la question de l'impact de l'état physiologique sur les distributions des temps de latence cellulaires, nous avons choisi de porter notre étude sur un grand nombre d'états physiologiques. L'objectif était de proposer une classification des stress selon leurs effets et de décrire les conséquences de l'association de plusieurs stress. Dans cette partie sont présentés les protocoles de stress appliqués à une souche de *L. monocytogenes* ainsi que les pertes de cultivabilité associées aux protocoles de stress.

### **I. Souche utilisée et conditions de conservation**

La souche de *L. monocytogenes* utilisée est la souche 14 (ou INRA 100), de sérotype 4b. C'est une des souches de référence du programme français de microbiologie prévisionnelle SYMPREVIUS. Elle a déjà été caractérisée dans une étude de Bégot et al. (1997). C'est une souche isolée de l'environnement d'une usine de produits carnés.

Cette souche est conservée sur cryobilles à  $-25^{\circ}\text{C}$ .

### **II. Préparations des cultures avant le stress**

La quasi-totalité des stress appliqués a pour point de départ une culture en phase exponentielle de croissance. Le protocole suivant a été appliqué afin d'obtenir une suspension de cellules en phase exponentielle de croissance :

Une cryobille est inoculée dans un tube de bouillon TSBye. Ce tube est incubé 24 heures à  $30^{\circ}\text{C}$ . La densité cellulaire atteint alors environ  $10^9$  cellules  $\text{ml}^{-1}$ . La culture est ensuite diluée successivement afin d'obtenir  $10^3$  cellules  $\text{ml}^{-1}$  dans du TSBye à  $25^{\circ}\text{C}$ . Cette culture est incubée 20 heures à  $25^{\circ}\text{C}$ . Au terme de l'incubation, on obtient approximativement  $10^8$  cellules  $\text{ml}^{-1}$  en phase exponentielle de croissance.

Le protocole pour l'obtention d'une culture en phase stationnaire (utilisée comme point de départ par un des stress appliqués) consiste simplement en l'incubation d'une cryobille pendant 24 heures à  $30^{\circ}\text{C}$  en TSBye.

### **III. Détermination de la perte de cultivabilité**

Les pertes de cultivabilité ont été déterminées sur différents milieux gélosés et en milieux liquides. En milieu solide, la gélose Tryptone soja + 0.6 % d'extrait de levures a été utilisée pour les

dénombrements de tous les protocoles de stress. En plus du dénombrement sur gélose, la perte de cultivabilité a parfois été vérifiée sur gélose sélective Oxford et Palcam.

En outre, les pertes de cultivabilité ont été déterminées en bouillon Tryptone soja + 0.6 % d'extrait de levures. La concentration des cellules cultivables en milieu liquide a été effectuée par la méthode du NPP (Nombre le Plus Probable). Cette méthode est précisément décrite dans l'article 4.

## **IV. Stress appliqués**

Le choix des stress appliqués répond à deux objectifs :

- hiérarchiser leur impact sur les distributions de temps de latence cellulaires par l'intermédiaire de chocs standardisés en termes de perte de cultivabilité sur milieu de culture non-sélectif. Les chocs étudiés à ce stade ont été appliqués individuellement puis certaines combinaisons ont été abordées afin d'appréhender l'impact de la succession de plusieurs stress ;
- connaître l'impact des stress et des combinaisons de stress représentatifs de situations rencontrées sur le terrain lors de contaminations accidentelles des aliments. Ces chocs ont été définis par le comité de pilotage du projet après identification des scénarios responsables de ces contaminations accidentnelles.

### **IV.1 Stress standardisés sur la base d'une perte de cultivabilité**

#### **IV.1.1 Critères de choix de ces stress**

Nous avons choisi neuf stress unitaires les plus représentatifs de la diversité des conditions de stress dans l'environnement des industries alimentaires, des procédés de fabrication et de conservation des aliments. Parmi les facteurs technologiques, nous avons choisi un traitement par la chaleur, parmi les facteurs extrinsèques une température négative, parmi les facteurs intrinsèques l'acide lactique et le chlorure de sodium. Quatre stress représentent les conditions rencontrées pendant le nettoyage et la désinfection des surfaces et matériels, avec une base forte (NaOH), un acide fort (HCl) et deux désinfectants (hypochlorite et chlorure de benzalkonium). Le dernier stress est lui caractéristique de l'environnement de *L. monocytogenes* dans un environnement propre : le stress par privation de nutriments.

#### **IV.1.2 Protocoles des stress standardisés**

Le point de départ des protocoles correspond à une culture en phase exponentielle. Les deux premières étapes sont communes à tous les stress :

- 1ère centrifugation : à 5000 rpm à 4°C pendant 10 min, élimination du milieu de culture puis reprise dans 10 ml d'eau physiologique (0.85% NaCl) à 25°C.
- 2ème centrifugation : à 5000 rpm à 4°C pendant 10 min, puis le surnageant est éliminé.

Ensuite les protocoles diffèrent :

- Pour le stress par l'acide chlorhydrique (stress HCl), le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique ajusté au pH 3. La solution est maintenue à 25°C.
- Pour le stress par l'acide lactique (stress acide lactique), le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique ajusté au pH 4.6. La solution est maintenue à 25°C.
- Pour le stress par la soude (stress NaOH), le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique ajusté au pH 12. La solution est maintenue à 25°C.
- Pour le stress par le chlorure de benzalkonium (stress BAC), le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique à 4 mg l<sup>-1</sup>. La solution est maintenue à 25°C.
- Pour le stress par l'hypochlorite (stress hypochlorite), le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique à 2.4 ppm. La solution est maintenue à 25°C.
- Pour le stress par les basses températures (stress froid), le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique. Ce tube est réparti en aliquotes de 1 ml qui sont immédiatement placés et conservés à -25°C.
- Pour le stress par la chaleur (stress chaud). Le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique à 25°C. Cette suspension est ensuite diluée au 1 :100 dans de l'eau physiologique à 55°C.
- Pour le stress par le chlorure de sodium (stress NaCl), le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique contenant 250 g l<sup>-1</sup> de NaCl. La solution est maintenue à 25°C.
- Pour le stress par privation de nutriment (stress nutritionnel) le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique puis centrifugé à 5000 rpm à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 10 ml d'eau physiologique. La solution est maintenue à 30°C.

#### IV.1.3. Pertes de cultivabilité observées pour ces stress

L'objectif était de déterminer le temps d'application et l'intensité nécessaire afin d'obtenir une perte de cultivabilité de 1.5 log<sub>10</sub> ufc/ml sur TSAye. Les cinétiques d'inactivation ont été ajustées à l'aide des modèles publiés par Peleg (2000). Les données sont exprimées sous la forme du ratio de cellules cultivables S(t), défini comme le ratio entre la concentration initiale N<sub>0</sub> et la concentration après t minutes d'exposition au stress N(t) :  $S(t) = \frac{N(t)}{N_0}$ .

Tableau 2. Conditions de stress et modèles des cinétiques de perte de viabilité de *L. monocytogenes* 14 pour les neuf stress standardisés sur une même perte de  $1.5 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$  sur milieu non-sélectif TSAye.

Dénomination du Stress	Conditions de stress	Modèle des cinétiques de survie	Valeurs des paramètres	Temps d'exposition au stress (h)
BAC	4 mg l <sup>-1</sup>	$\log_{10} S(t) = -k \cdot t$	$k = 6.82 \text{ h}^{-1}$	0.22
Hypochlorite	2.4 ppm	$\log_{10} S(t) = -k \cdot t$	$k = 30.74 \text{ h}^{-1}$	0.025
Chaud	55°C	$\log_{10} S(t) = -k \cdot t$	$k = 59 \text{ h}^{-1}$	0.05
HCl	pH 3	$t < t_1 \quad \log_{10} S(t) = 0$ $t > t_1 \quad \log_{10} S(t) = -k \cdot (t-t_1)$	$t_1 = 0.34 \text{ h}$ $k = 6.45 \text{ h}^{-1}$	0.57
Acide lactique	pH 4.6	$t < t_1 \quad \log_{10} S(t) = 0$ $t > t_1 \quad \log_{10} S(t) = -k \cdot (t-t_1)$	$t_1 = 1.65 \text{ h}$ $k = 0.031 \text{ h}^{-1}$	48
Froid	-25°C	$\log_{10} S(t) = -t / (k_1 + k_2 \cdot t)$	$k_1 = 21.04 \text{ h}^{-1}$ $k_2 = 0.18 \text{ h}^{-1}$	48
NaCl	25% (w/v)	$\log_{10} S(t) = -t / (k_1 + k_2 \cdot t)$	$k_1 = 1.66 \text{ h}^{-1}$ $k_2 = 0.56 \text{ h}^{-1}$	25
NaOH	pH 12	$\log_{10} S(t) = -t / (k_1 - k_2 \cdot t)$	$k_1 = 0.41 \text{ h}^{-1}$ $k_2 = 0.52 \text{ h}^{-1}$ $t_1 = 24 \text{ h}$	0.36
Nutritionnel	30°C	$t < t_1 \quad \log_{10} S(t) = -t / (k_1 - k_2 \cdot t)$ $t > t_1 \quad \log_{10} S(t) = a$	$k_1 = 4.45 \text{ h}^{-1}$ $k_2 = -0.63 \text{ h}^{-1}$ $a = -1.5$	24

Le Tableau 2 résume la forme des cinétiques de destruction pour les neuf stress étudiés, les paramètres estimés à partir des données expérimentales et le temps nécessaire à la perte de cultivabilité de  $1.5 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$  sur TSAye.

Pour les stress hypochlorite, BAC et chaud, les cinétiques d'inactivation des cellules de *L. monocytogenes* suivent une cinétique de type log-linéaire. Les deux stress acides (acide lactique et HCl) génèrent une cinétique log-linéaire précédée d'une latence. Pour les autres stress appliqués les cinétiques suivent des formes variées avec par exemple une allure convexe, concave, ou concave suivie d'une phase de maintien de la population (stress nutritionnel).

En plus de la perte de cultivabilité sur TSAye nous avons estimé la perte en milieu TSBye à partir de la proportion de puits positifs. Il apparaît (Tableau 3) qu'il existe une différence significative entre le nombre de cellules cultivables sur gélose TSAye et en milieu liquide TSBye. La perte de cultivabilité est plus importante en milieu solide qu'en milieu liquide pour les stress standardisés suivants : acide lactique, hypochlorite, NaOH, NaCl et chaud. Le rapport de recouvrement entre TSAye et TSBye s'élève jusqu'à 6 pour le stress chaud.

Il est également intéressant d'observer les pertes sur les milieux sélectifs Oxford et Palcam. En effet un des outils de détermination du pourcentage de cellules stressées est de regarder la proportion cultivable sur les milieux sélectifs par rapport au milieu non-sélectif (Meyer et Donnelly,

1992). Selon ce critère, on pourrait conclure que les stress chaud et BAC sont les stress engendrant le plus de dommages aux cellules et ainsi entraîner les temps de latence les plus longs.

Tableau 3. Valeurs observées des pertes de cultivabilité de *L. monocytogenes* 14 pour treize stress en fonction de la nature solide, liquide ou sélective du milieu utilisé pour le dénombrement des cellules.

Dénomination du Stress	Perte de cultivabilité en $\log_{10}$ ufc/ml			Rapport recouvrement TSAye/TSBye – Moyenne (Ecart type)	
	Moyenne (Ecart type)				
	TSAye	Oxford	Palcam		
HCl	1.46 (0.22)	1.65 (0.30)	1.65 (0.32)	0.79 (0.25)	
Froid	1.47 (0.22)	1.57(0.28)	1.62(0.30)	0.95 (0.33)	
Acide lactique	1.56 (0.13)	-	-	0.37 (0.01)	
Chlore	1.38 (0.28)	-	-	0.28 (0.14)	
NaOH	1.54 (0.22)	2.56 (0.14)	2.87(0.22)	0.20 (0.09)	
NaCl	1.41 (0.12)	2.31 (0.48)	2.51 (0.53)	0.42 (0.12)	
Nutritionnel	1.43 (0.29)	1.63 (0.49)	1.82 (0.51)	0.71 (0.27)	
BAC	1.50 (0.21)	3.04 (0.59)	3.04 (0.41)	0.78 (0.07)	
Chaud	1.60 (0.21)	2.61 (0.78)	-	0.16 (0.04)	
Acide lactique 4.4	1.39 (0.02)	-	-	-	
NaCl 48h	2.69 (0.40)	-	-	0.05 (0.03)	
NaCl 15°C	0.96 (0.18)	-	-	0.72 (0.14)	
Froid 1 an	5.00 (-)	-	-	-	

- non déterminée.

## IV.2. Modifications de stress standardisés

### IV.2.1. Critères de choix de ces stress

Les modifications doivent permettre de donner des éléments de réponse aux trois questions suivantes :

- Quelle est la conséquence de l'augmentation de la durée d'exposition à un stress sur les distributions des temps de latence cellulaires des cellules survivantes ?
- Quelle est la conséquence de l'augmentation de l'intensité du stress sur les distributions des temps de latence cellulaires des cellules survivantes ?
- Quelle est la conséquence des paramètres environnementaux associés à un stress sur les distributions des temps de latence cellulaires des cellules survivantes ?

#### IV.2.2. Protocoles de stress

Trois stress parmi les neuf stress standardisés ont été modifiés : les stress acide lactique, NaCl et froid. Pour répondre à la question de l'effet d'une augmentation de l'intensité d'un stress, le stress acide lactique a été modifié. Le pH a été ajusté à 4.4 (contre 4.6) et le temps d'application est passé de 48 h à 24 h. Pour étudier l'augmentation du temps d'exposition à un stress, les variantes des stress NaCl et froid ont été étudiées. La durée d'application du stress NaCl a été étendue à 48 h au lieu de 24 h. Le stress froid a lui été appliqué une année au lieu de 48 heures. Pour répondre à la question de l'influence des paramètres environnementaux associés à un stress nous avons procédé à un changement de la température d'application du stress NaCl, en utilisant 15°C au lieu de 25°C. Les pertes de cultivabilité de ces quatre stress sont reportées dans le Tableau 3.

#### IV.3. Successions de stress standardisés

Dans un second temps, les stress standardisés ont été appliqués successivement sur des cellules en phase exponentielle de croissance. Quatre successions ont été testées. Le passage de la première condition stressante à la seconde a été effectué par dilution au 1/100<sup>e</sup>. La première succession associait le stress nutritionnel suivi par le stress thermique, la seconde le stress nutritionnel suivi du stress osmotique. Pour la troisième succession, le stress osmotique était suivi par le stress acide lactique, ce dernier étant appliqué 8 heures au lieu de 48 heures. La quatrième et dernière succession correspond à la troisième mais dans un ordre inversé. Les pertes de cultivabilité observées pour ces quatre successions sont résumées dans le Tableau 5. En observant les pertes de viabilité de la succession 1, on se rend compte que le stress nutritionnel n'améliore pas la résistance des cellules de *L. monocytogenes* à un chauffage à 55°C par rapport à des cellules en phase exponentielle de croissance. Il en est de même pour le stress acide lactique sur la résistance au stress NaCl. Par contre le stress nutritionnel rend plus résistante *L. monocytogenes* au stress osmotique par rapport à des cellules en phase exponentielle de croissance. Et le stress osmotique sensibilise les cellules au stress acide lactique.

Tableau 4. Pertes de cultivabilité de *L. monocytogenes* 14 pour des successions de deux stress.

États physiologiques	Perte de cultivabilité en log <sub>10</sub> (ufc/ml) sur TSAYe – Moyenne (Ecart type)			Rapport recouvrement TSAYe/TSBye Moyenne (Ecart type)
	1 <sup>er</sup> stress	2 <sup>nd</sup> stress	Cumul	
Nutritionnel – Chaud	1.61	1.47	3.08 (0.32)	0.45 (0.13)
Nutritionnel – NaCl	1.68	0.12	1.79 (0.36)	0.51 (0.16)
NaCl-acide lactique 8h	1.51	2.33	3.81 (0.07)	0.43 (0.31)
Acide lactique 8h – NaCl	0	1.62	1.62 (0.22)	0.74 (0.08)

## IV.4. Combinaisons de stress industriels

En plus des stress précédemment étudiés, des combinaisons de stress représentatives de situations industrielles ont été appliquées sur *L. monocytogenes* 14 :

- quatre scénarios de contamination de fromage à pâte molle et croûte lavée ;
- un scénario de contamination de saumon fumé.

Ces cinq scénarios de stress ont été réalisés en milieu liquide TSBye. La température, le pH, l'activité de l'eau et la présence d'inhibiteur sont choisis pour simuler des situations rencontrées au cours des procédés de fabrication de ces deux produits.

### IV.4.1. Combinaisons de stress représentatives de la contamination par *L. monocytogenes* d'un fromage à pâte molle et croûte lavée

Les scénarios de contamination des fromages à pâte molle et croûte lavée ont été envisagés à partir du diagramme de fabrication présenté ci-dessous.

- ❶** Dans la plupart des cas (exception faite des fromages au lait cru), le lait subi un traitement thermique :
  - une thermisation : chauffage du lait cru pendant au moins 15 secondes à une température comprise entre 55 et 68 °C. Le lait présente après le traitement une réaction positive au test de la phosphatase.
  - une pasteurisation : traitement mettant en œuvre une température d'au moins 72°C pendant un court laps de temps (pendant 15 secondes ou toute combinaison équivalente). Le lait doit présenter une réaction négative au test phosphatase.
- ❷** Ensuite une coagulation du lait est effectuée. La coagulation fait intervenir des enzymes de coagulation et/ou l'acide lactique produit par des fermentations lactiques (caillage mixte). La température du lait est d'environ 30°C, ce qui favorise l'activité enzymatique et le développement des fermentations lactiques.
- ❸** Le coagulum est ensuite égoutté pendant 24 à 48 heures. Au cours de l'égouttage une partie du lactosérum est éliminée. Cette élimination peut être accélérée par tranchage ou émiettage. On obtient alors le caillé. Les caractéristiques physico-chimiques du caillé se traduisent par une faible teneur en calcium et par un pH bas de l'ordre de 4.6.
- ❹** Le caillé est ensuite moulé et salé. Deux techniques sont utilisées : le salage à sec et le salage en saumure. La quantité de sel et la durée du salage dépendent de la taille des fromages. À la fin de cette étape le sel se retrouve principalement dans les premiers millimètres de la surface des fromages. Le sel diffuse au cours de l'affinage dans le reste du

fromage. Pour les fromages à pâte molle et croûte lavée, la teneur en sel est comprise entre 1.6 et 2% (Anonyme 2004b).

❸ Les fromages sont ensuite affinés pendant une durée de 2 à 6 semaines à une température comprise entre 12 à 18°C pour une humidité relative supérieure à 85%. Les surfaces des fromages sont régulièrement lavées à l'aide d'une solution légèrement salée (de l'ordre de 3%) qui peut être additionnée d'alcool. Au cours de l'affinage différentes espèces microbiennes se succèdent : au cours des 3 à 8 premiers jours, les levures acidophiles se développent en consommant l'acide lactique (période de levurage). Le pH du fromage remonte et permet l'implantation et la multiplication de bactéries acido-sensibles. Ce sont principalement des bactéries à Gram positif halotolérantes (*Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* etc.). Le début de l'affinage s'effectue dans un hâloir dans un environnement à saturation d'humidité puis l'affinage se termine en cave d'affinage où l'humidité est proche de 85%.

Une des sources de contamination des fromages est la matière première : le lait cru (Meyer-Broseta et al., 2002). Cependant la maîtrise de cette source de contamination est assurée par le traitement thermique. Le respect des barèmes de pasteurisation du lait assure une élimination de *L. monocytogenes*. L'autre source de contamination des fromages par *L. monocytogenes* est l'environnement de l'atelier de fabrication (Rudolf & Scherer, 2001). En effet, *L. monocytogenes* peut persister dans l'environnement d'un atelier (sols, matériels de moulage, bacs de saumurage, claires d'affinage, etc.). C'est cette seconde source que nous avons considérée pour reproduire les conditions physico-chimiques rencontrées par *L. monocytogenes* au cours de la fabrication. Les quatre scénarios envisagés font intervenir la contamination au cours des étapes de coagulation ou de salage.

- Le premier scénario (S1) simule les conditions rencontrées par des cellules lors de la contamination en surface d'un caillé lactique néoformé. Les cellules sont alors exposées à un pH de 4.6 à une température de 25°C pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite placées dans une solution à 25 % (masse/volume) de NaCl à 15°C et pH 4.6 pendant 1 heure. Cette étape représente l'étape de salage par immersion dans une saumure des fromages. Pour terminer, les cellules sont maintenues à pH 4.6 et 2.5% de NaCl pendant 72 heures à 15°C (température dans les hâloirs pendant l'affinage).

Tableau 5. Conditions physico-chimiques et perte de cultivabilité observée pour le scénario de contamination de la surface du caillé (S1) par *L. monocytogenes*.

Temps (heures)	Conditions environnementales			Perte de cultivabilité sur TSAye en $\log_{10}$ ufc ml <sup>-1</sup> par étape	Perte de cultivabilité cumulée en $\log_{10}$ ufc ml <sup>-1</sup>			Rapport recouvrement TSAye/TSBye  Moyenne (Ecart type)
	Température [°C]	pH [-] (acide lactique)	NaCl [% w/v]		Moyenne	(Ecart type)		
					TSAye	Oxford	Palcam	
0-24	25	4.6	0.5	0.23	0.23	-	-	-
24-25	15	4.6	25	1.30	1.54	-	-	-
25-96	15	4.6	2.5	2.80	4.33 (0.29)	4.32 (0.29)	5.48 (0.65)	0.44 (0.17)

- Le second scénario (S2) simule l'apport de cellules de *L. monocytogenes* sur la surface du caillé par une saumure contaminée. Dans un premier temps, les cellules sont placées pendant 24 heures à 15°C dans une solution à 25% de NaCl. Ensuite les conditions physico-chimiques correspondent aux conditions de surface d'un fromage saumuré (identiques à la dernière étape de la combinaison S1), c'est-à-dire un pH de 4.6 et 2.5% de NaCl. Les cellules sont maintenues dans ces conditions pendant 72 heures à 15°C (durée de la période avant la remontée du pH). Les pertes de cultivabilité observées sont reportées dans le Tableau 6. Il est intéressant d'observer que lors de la deuxième étape, la perte de cultivabilité est moins importante en comparaison de la même étape pour la combinaison S1. Le saumurage prolongé rend les cellules plus résistantes au pH 4.6 par rapport à un temps d'exposition à la saumure plus court (1 h).

Tableau 6. Conditions physico-chimiques et pertes de cultivabilité observées pour le scénario de contamination de la surface du caillé par des cellules de *L. monocytogenes* présentes dans la saumure (stress S2).

Temps (heures)	Conditions environnementales (eau 0-24, TSBye 25-96)			Perte de cultivabilité sur TSAye en $\log_{10}$ ufc ml <sup>-1</sup>  Perte par étape	Perte cumulée	Rapport recouvrement TSAye/TSBye – Moyenne (Ecart type)	
	Température [°C]	pH [-] (acide lactique)	NaCl [% w/v]				
0-24	15	7	25	1.04	1.04	-	
25-96	15	4.6	2.5	1.14	2.18 (0.16)	0.80 (0.27)	

- La troisième combinaison (S3) reproduit les conditions rencontrées par des cellules de *L. monocytogenes* à l'intérieur d'un caillé avant et au cours de sa formation. Dans ce cas, les cellules

ne sont pas confrontées à un changement brutal de pH comme pour les deux combinaisons précédentes où les cellules arrivaient sur une surface à pH 4.6. Pour la combinaison S3, les cellules sont présentes avant la baisse du pH. Elles subissent donc une évolution progressive de ce pH d'une valeur 6 à 4.4 en 24 heures, puis un maintien de ces conditions pendant 96 heures à 15°C (Tableau 7). De plus elles ne subissent pas comme pour les deux premières combinaisons les fortes concentrations en NaCl des cellules situées en surface. Pour cette combinaison, la perte de cultivabilité est très faible et le rapport de recouvrement entre milieux solide et liquide est proche de 1 (Tableau 7).

Tableau 7. Conditions physico-chimiques et perte de cultivabilité observée pour le scénario de contamination du caillé en formation (stress S3) par des cellules de *L. monocytogenes*.

Temps (heures)	Conditions environnementales			Perte de cultivabilité cumulée TSAye $\log_{10}$ ufc ml <sup>-1</sup>	Rapport recouvrement TSAye/TSBye
	Température [°C]	pH [-] (acide lactique)	NaCl [% w/v]		
0-0.5	25	6	0.5		
0.5-2	15	5	0.5		
2-4	15	4.8	0.5	0.35 (0.22)	0.90 (0.15)
4-24	15	4.6	0.5		
24-120	15	4.4	0.5		

- La quatrième combinaison (S4) reprend les mêmes étapes que la combinaison S1. Mais les cellules sont exposées au préalable à des conditions environnementales proches de celles de l'environnement d'un atelier de fabrication. L'environnement d'un atelier est caractérisé par une absence de nutriments et par le nettoyage et la désinfection. L'absence de nutriments a été simulée par une culture en phase stationnaire de 24 heures à 30°C et le traitement désinfectant par une concentration de 360 ppm d'hypochlorite pendant 2 minutes à 25°C. La suite des conditions pour les cellules survivantes reprend exactement la combinaison S1. La perte de cultivabilité est présentée dans le Tableau 8. Pour les trois dernières étapes, nous avons observé une perte de 0.85  $\log_{10}$  ufc ml<sup>-1</sup>, alors que pour la combinaison S1 la perte est de 4.3  $\log_{10}$  ufc ml<sup>-1</sup> pour les trois mêmes étapes (Tableau 5).

Tableau 8. Conditions physico-chimiques et pertes de cultivabilité observées pour le scénario de contamination du caillé par des cellules de *L. monocytogenes* provenant de l'environnement de l'atelier (stress S4).

Temps (heures)	Conditions environnementales				Perte de cultivabilité sur TSAYe en $\log_{10}$ ufc ml <sup>-1</sup> par étape	Perte de cultivabilité cumulée en $\log_{10}$ ufc ml <sup>-1</sup> - Moyenne (Ecart type)			Rapport recouvrement TSAYe/TSBye	Moyenne (Ecart type)
	Température [°C]	pH [-] (acide lactique)	NaCl [% w/v]	Chlore [ppm]		TSAYe	Oxford	Palcam		
0-0.033	25	7	0.5	360	0.71	0.71	-	-	-	-
0-24	25	4.6	0.5	3.6	0.69	1.40	-	-	-	-
24-25	15	4.6	25	0	0.39	1.79	-	-	-	-
25-96	15	4.6	2.5	0	0.46	2.25 (0.50)	2.03 (0.47)	2.15 (0.57)	0.56 (0.10)	

#### IV.4.2. Combinaisons de stress représentatives de la contamination

##### par *L. monocytogenes* du saumon fumé

Le diagramme de fabrication ci-dessous reprend le procédé de fabrication du saumon fumé à partir de l'arrivée du saumon frais sur le lieu de sa transformation. La majorité des saumons pêchés est transportée dans de la glace sur le lieu de transformation ; le délai entre le jour de pêche (dans les fermes d'élevage) et le début de la transformation est compris entre 1 et 5 jours (Fonnesbech Vogel et al., 2001).

① La première étape consiste à préparer les saumons. Les saumons sont d'abord étêtés, lavés puis les filets sont récupérés. Ces opérations sont réalisées dans un environnement compris entre 10 et 18°C.

② La seconde étape consiste à saler les filets. Deux techniques sont possibles

- par injection de saumure dans les filets ;
- par immersion dans une saumure. La durée de cette immersion est comprise entre 2 et 24 heures.

Cette étape est généralement réalisée avec une saumure à basse température (0 à 2°C). La concentration de la saumure est ajustée de façon à obtenir une concentration dans les filets de 2.5 à 4% de NaCl.

③ Les filets sont ensuite fumés. Le fumage des saumons se fait à l'aide de fumée liquide. Le fumage dure de 4 à 24 heures à une température comprise entre 10 et 32°C. Au terme de cette étape, les filets contiennent des composés phénoliques.

④ Les filets sont ensuite rapidement congelés à -18°C pendant 2 à 4 jours.

❸ Enfin, les filets sont tranchés et conditionnés (généralement emballés sous vide).

L'origine de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé semble plus être due à une contamination par l'environnement des ateliers de transformation qu'à une contamination de la matière première (Fonnesbech Vogel et al., 2001). Les étapes de tranchage et de saumurage sont particulièrement à risque (Rorvik et al., 1995 ; Autio et al., 1999 ; Fonnesbech Vogel et al., 2001). Nous avons donc envisagé une contamination des filets par la saumure. Par conséquent la combinaison représentative de la contamination du saumon fumé par *L. monocytogenes* reprend les étapes de salage, de fumage et raidissement par le froid du saumon (S5).

Des cellules de *L. monocytogenes* en phase exponentielle sont tout d'abord placées dans une solution à 25% de NaCl à 2°C pendant 24 heures. Dans un second temps, les cellules sont placées pendant quatre heures dans une solution contenant 200 ppm de phénol et 3% de NaCl à 25°C. Pour terminer, les cellules sont transférées dans une solution contenant 15% de glycérol et 3% de NaCl et congelées à -18°C pendant 3 jours. Les pertes de cultivabilité et le rapport de recouvrement entre les milieux de dénombrement des cellules sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9. Conditions physico-chimiques et perte de cultivabilité observée pour le scénario de contamination du saumon fumé (S5) par *L. monocytogenes* à l'étape de salage.

Temps (heures)	Conditions environnementales				Perte de cultivabilité cumulée TSAye $\log_{10}$ ufc ml <sup>-1</sup>	Perte de cultivabilité cumulée TSAye $\log_{10}$ ufc ml <sup>-1</sup>
	Température [°C]	pH [-]	NaCl [%w/v]	Glycérol [% w/v]		
0-24	2	6	25	0	0.61 (0.16)	
24-28	25	5	3	0	0.23 (0.24)	
						1.04 (0.16)
28-96	-18°C	4.6	3	15	0.21 (0.18)	

## V. Conditions d'accueil testées pour la détermination des temps de latence cellulaires

Le milieu liquide choisi pour l'accueil des cellules de *L. monocytogenes* ayant subi les protocoles de stress et la détermination des temps de latence cellulaires est le TSBYe. Pour le milieu solide, la gélose TSAye a été choisie.

Tous les états physiologiques ont été testés dans le TSBYe à 30°C. De plus, pour les combinaisons de stress industrielles S1, S4 et S5, nous avons évalué l'impact des conditions de croissance sur les distributions. La température de croissance, le pH (à l'aide d'acide lactique) ou

encore l'activité de l'eau (à l'aide de NaCl) du TSBye et du TSAye ont été modifiés. Les conditions d'accueil testées sont résumées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Température, pH et activité de l'eau des conditions d'accueil utilisées pour la détermination des distributions des temps de latence cellulaires pour les 22 états physiologiques différents de *L. monocytogenes* 14. (X) TSBye, (⊗) TSBye et TSAye.

Numéro	Etat physiologique	T [°C]	30	30	30	30	25	20	20	20	20	15	15	12	12	12	12			
		pH [-] aw [-]	Fraser 1/2	Fraser 1/2	7.1	7.1	5,5	5,5	7.1	7.1	7.1	6	5,8	5,5	7.1	7.1	6	7.1	7.1	5,5
1	HCl			X																
2	Froid				X															
3	Acide lactique					X														
4	Chlore					X														
5	NaOH					X														
6	NaCl					X														
7	Nutritionnel					X														
8	BAC					X														
9	Chaud					X														
10	Acide lactique 4,4					X														
11	NaCl 48 h					X														
12	NaCl 15°C					X														
13	Froid 1 an					X														
14	Nutritionnel – Chaud					X														
15	Nutritionnel – NaCl					X														
16	NaCl-acide lactique 8 h					X														
17	Acide lactique 8 h –NaCl					X														
18	S1	X	⊗	X	X	X									X	X	X	X		
19	S2		X																	
20	S3		X																	
21	S4		X				X	⊗	⊗	X	X	⊗	⊗				X			
22	S5		X	X	X											X	X	X		



# **Chapitre B : Mise au point d'une méthode du suivi de la croissance en milieu solide et détermination des temps de latence cellulaires**

Dans cette partie, nous présentons les enjeux de la mise au point d'une nouvelle méthode en milieu solide. Ensuite nous décrivons le dispositif, les outils développés pour piloter ce dispositif. Enfin nous présentons la méthode de détermination des temps de latence cellulaires à partir des temps de détection des colonies en milieu solide, ou de l'augmentation de DO en milieu liquide.

## **I. Contexte et objectifs de la mise au point d'une méthode en milieu solide**

La méthode la plus largement utilisée pour l'acquisition des temps de latence cellulaires des micro-organismes est une méthode basée sur la mesure de la densité optique en milieu liquide (Stephens et al., 1997, Baranyi et Pin, 1999, McKellar et Knight, 2000, Wu et al., 2000, Robinson et al., 2001, Smelt et al., 2002). La détermination des temps de latence cellulaires repose sur la mesure des temps de détection (cf. chapitre *iii.II*). Wu et al. (2000) ont proposé une méthode directe de détermination par microscopie et observation du premier temps de génération de cellules immobilisées. Le principal inconvénient de cette technique est la difficulté d'acquérir suffisamment de données pour la caractérisation des distributions des temps de latence (Swinnen et al., 2004). Plus récemment, Elfwing et al. (2004) ont développé un outil se basant sur l'observation d'un grand nombre de cellules simultanément. Mais avec cette méthode, les cellules sont adhérentes, ce qui pose le problème d'un biais de sélection des cellules analysées. En effet, les cellules stressées ont-elles toutes les mêmes capacités d'adhésion ? (cf. chapitre *iii.III.2*)

Pour l'instant aucune des techniques proposées ne permet l'acquisition d'un grand nombre de données pour des cellules immobilisées. L'étude des cellules immobilisées est essentielle car les cellules dans les aliments solides sont contraintes de former des colonies (Wilson et al., 2002). L'étude de cellules bactériennes immobilisées a souvent mis en évidence des différences de leur comportement par rapport à des cellules planctoniques. Par exemple, des auteurs ont observé pour les cellules immobilisées : un taux de croissance plus faible (Brocklehurst et al., 1997 ; Meldrum et al., 2003), des activités métaboliques différentes (Stecchini et al., 1998) ou encore des limites de croissance modifiées (Koutsoumanis et Sofos, 2004).

Il a donc été envisagé de mettre au point une technique d'étude sur milieu solide par analyse d'image. Le principe est similaire à celui utilisé pour les études en milieu liquide, c'est-à-dire basé

sur la mesure d'un temps nécessaire à une cellule pour atteindre un niveau de population détectable. Les temps de détection sont déterminés par le suivi de la croissance de colonies en surface d'une gélose. Ces temps sont reliés aux temps de latence cellulaires puisqu'ils correspondent en théorie à un inoculum d'une cellule.

Les objectifs à atteindre dans le développement de cette nouvelle méthode étaient :

- De permettre l'acquisition d'un nombre important de données
- De travailler dans des conditions environnementales stables assurant une bonne reproductibilité des expériences
- De mettre au point une méthode automatisée d'acquisition et de traitement des données
- De développer une méthode au meilleur rapport coût/performance

## **II. Dispositif et logiciel d'acquisition d'images**

L'acquisition d'images des colonies a été effectuée à l'aide d'une caméra haute résolution PixelFly ( $1360 \times 1024$  pixels). De plus, afin de permettre l'acquisition d'un nombre important de données le choix s'est logiquement porté sur le suivi de plusieurs boîtes par études. La caméra a donc été montée sur une platine circulaire motorisée permettant le passage d'une boîte à une autre (Figure 4). La hauteur séparant les boîtes et la caméra peut être réglée en positionnant le dispositif le long d'une potence. Ainsi nous avons le choix de la résolution des images. Les boîtes sont éclairées par une source de lumière froide (éclairage « back light » à L.E.D.).

Le pilotage automatisé de la caméra a demandé la création d'un logiciel. Le logiciel a été développé en langage C++ (langage orienté objet) à partir d'une bibliothèque de fonctions fournie avec la caméra. La conception du logiciel, appelé lag\_imaging, a nécessité de nombreuses heures de développement. Au final, le logiciel permet l'automatisation des prises de vue avec la possibilité de choisir l'intervalle entre le début l'expérience et le début de l'acquisition de la première image et de fixer le pas de temps entre les mesures (Figure 5). Le logiciel permet en outre l'enregistrement des images de chacune des quatre boîtes dans des dossiers séparés. Le pilotage de la platine motorisée est réalisé de manière synchrone avec la caméra à l'aide du logiciel Matlab.

L'objectif étant d'obtenir une méthode reproductible, le dispositif a été placé dans une enceinte climatique permettant le contrôle de la température et de l'humidité relative afin d'éviter la déshydratation des boîtes au cours des expériences. La source de lumière des boîtes modifiant sensiblement la température à la surface de la gélose par rapport à la température de consigne de l'enceinte, celle-ci a été adaptée et choisie afin d'atteindre la valeur cible en surface de la gélose.

## RÉSULTATS & DISCUSSIONS - Chapitre B

Du point de vue du coût, ce dispositif se révèle plus cher à l'achat qu'un Bioscreen (enceinte climatique comprise). Cependant le coût des consommables pour ce dispositif (boîtes de Pétri) est nettement moindre que pour le Bioscreen (ampoules halogènes et plaques 100 puits).

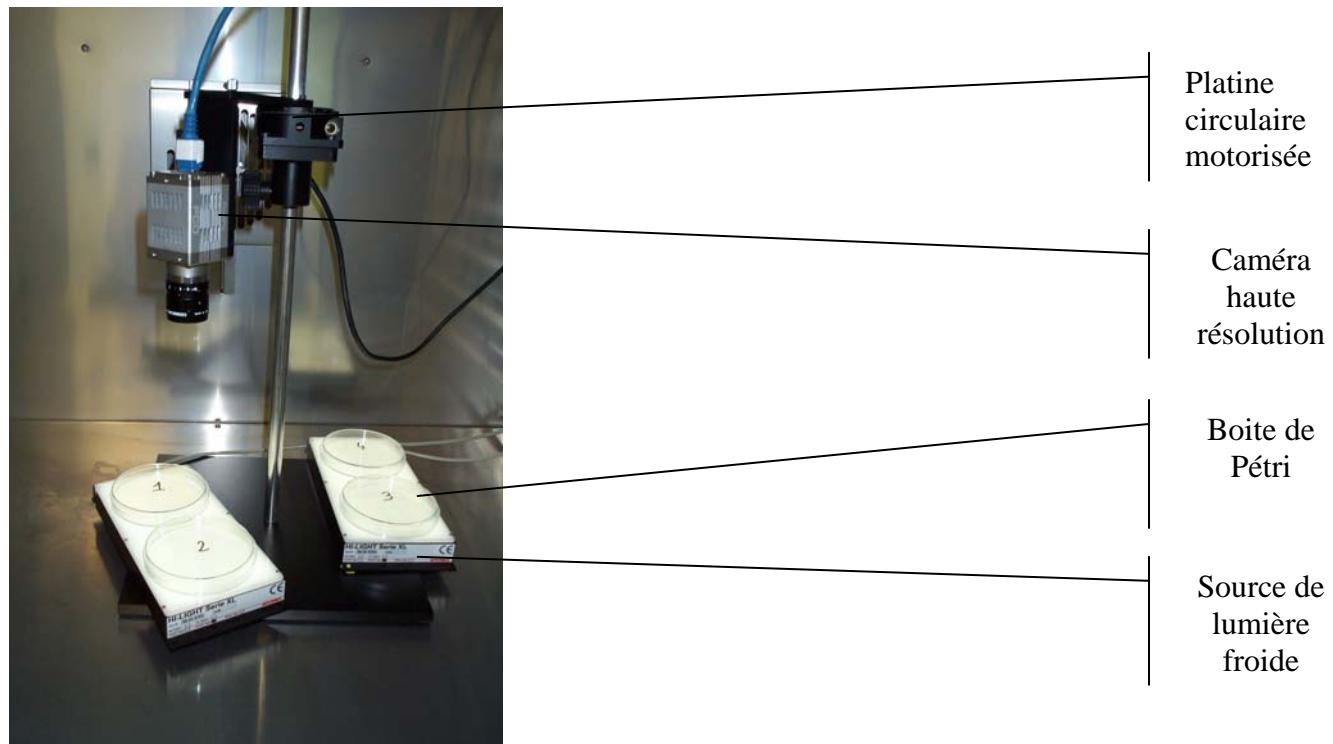


Figure 4. Dispositif d’acquisition d’images de la croissance de colonies en surface de quatre géloses dans une enceinte régulée en température et en hygrométrie.

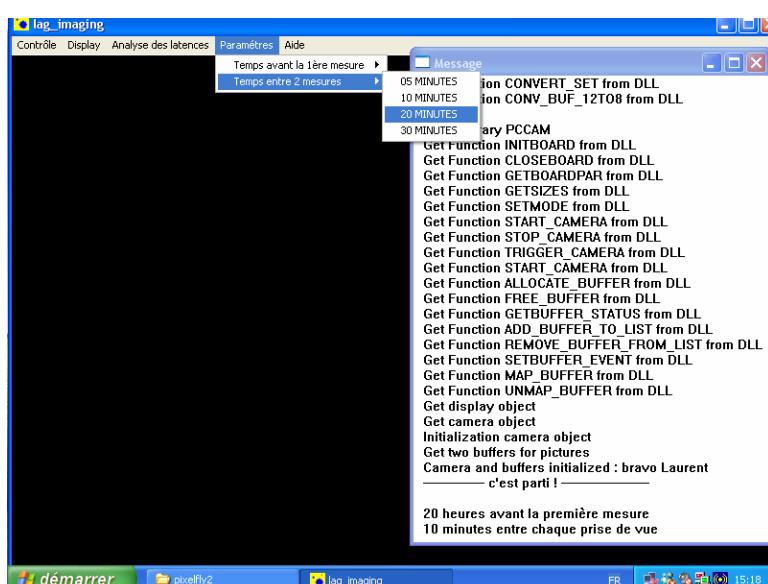


Figure 5. Logiciel de pilotage de la caméra CCD pour l’acquisition automatisée d’images.

### III. Méthode de détermination des temps de latence en milieu solide par analyse d'images

Article 2 :

Contexte : Différentes méthodes de détermination des temps de latence cellulaires sont actuellement utilisées. Pour l'instant aucune de ces méthodes ne permet l'acquisition de données en milieu solide en nombre suffisant pour caractériser les distributions.

Objectifs : Le premier objectif est de présenter une nouvelle méthode de détermination des temps de latence de cellules bactériennes immobilisées, le second de comparer les résultats avec la méthode par spectrophotométrie.

Méthodes et résultats : La méthode est basée sur l'analyse d'image de la croissance des colonies. Les distributions des temps de latence cellulaires sont obtenues à l'aide des distributions des temps nécessaires à la formation de colonies visibles. À l'aide de cette méthode, nous avons déterminé les distributions des temps de latence de cellules de *L. monocytogenes* préalablement soumises à deux combinaisons de stress représentatives de scénarios de contamination de la surface des fromages (S1 et S4). L'influence des colonies entre elles sur les temps de détection et la vitesse de croissance ont également été mises en évidence. Les résultats obtenus par cette méthode ont été comparés aux distributions de temps de latence obtenus en milieu liquide par spectrophotométrie. Dans cet article, une méthode de détermination à partir des temps de détection sans connaissance du taux de croissance a également été proposée. Les moyennes et les écarts types des distributions des temps de latence cellulaires ne présentent pas de différences significatives entre le milieu solide et le milieu liquide. La distribution Extreme Value type II s'est révélée la meilleure distribution pour l'ajustement de toutes les distributions des temps de latence cellulaires.

Conclusion : Les résultats montrent que les performances de la nouvelle méthode sont équivalentes à celles de la méthode par spectrophotométrie. La comparaison entre milieux solides et liquides doit être étendue en modifiant d'autres facteurs environnementaux.



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Microbiological Methods xx (2005) xxx–xxx

Article 2

# Journal of Microbiological Methods

www.elsevier.com/locate/jmicmeth

## Automated image analysis of bacterial colony growth as a tool to study individual lag time distributions of immobilized cells

L. Guillier<sup>a,b</sup>, P. Pardon<sup>c</sup>, J.-C. Augustin<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général de Gaulle F-94704 Maisons-Alfort, France<sup>b</sup> Arilait Recherches, 42 avenue de Châteaudun, F-75314 Paris, France<sup>c</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, 7, avenue du Général de Gaulle F-94704 Maisons-Alfort, France

Received 7 April 2005; received in revised form 7 August 2005; accepted 16 August 2005

### Abstract

A method to determine the individual lag time (lag) distributions of immobilized bacteria was presented. The method was based on the image analysis of the bacterial colony growth. The lag distributions were retrieved from the distributions of the detection times ( $T_d$ ) required to form macroscopically visible colonies. Using this method, the lag distributions on agar for *Listeria monocytogenes* cells previously subjected to two situations reproducing conditions encountered during the contamination of cheese, were determined. The results were presented and compared with lag distributions obtained with an established method based on the time to detection of turbidity in broth. An original method to retrieve lag in broth and agar without any knowledge of the growth rate was also proposed. In order not to bias the distributions of lag on agar the impact of spatial separation between colonies on colony growth rates was quantified. Means and standard deviations of lag distributions for the two different stresses were found to be similar in broth and on agar. Extreme Value type II distributions fitted the best the different datasets of lag distributions.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Bacterial colonies; Lag time distributions; *Listeria monocytogenes*

### 1. Introduction

The lag phase, characterising the transient phase of bacterial growth curves before the exponential phase, is an essential parameter for the assessment of the behaviour of bacterial contaminations occurring in foods (see Swinnen et al., 2004 for a review). Contrary to the growth rate for which numerous models have been published to describe the effect of the growth environment (Ross and Dalgaard, 2004), the lag phase appears

more difficult to predict, particularly because additional factors such as injuries encountered by cells and the initial level of the population affect its duration (Baranyi and Pin, 2004; Swinnen et al., 2004).

Numerous studies have then been conducted recently to explore the effect of stresses and/or initial bacterial concentration on the lag time of bacteria (Stephens et al., 1997; Augustin et al., 2000a; McKellar and Knight, 2000; Pascual et al., 2001; Robinson et al., 2001; Smelt et al., 2002; Whiting and Bagi, 2002; Métris et al., 2003; Elfwing et al., 2004; Francois et al., 2005; Guillier et al., 2005). The study of the effect of the initial bacterial concentration requires the characterisation of individual lag time distributions (Baranyi, 1998, 2002; Katalik et al., 2005). Direct and indirect methods have been devel-

\* Corresponding author. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général de Gaulle F-94704 Maisons-Alfort, France.  
Tel.: +33 1 43 96 70 43.

E-mail address: jcaugustin@vet-alfort.fr (J.-C. Augustin).

oped to study the behaviour of individual cells and to collect large quantities of data necessary for the accurate characterisation of lag time distributions. Direct methods are based on a microscopic observation of immobilized (Wu et al., 2000) or attached cells (Elfwing et al., 2004). The most used method is an indirect method based on turbidity measurement of bacterial cultures (Stephens et al., 1997; McKellar and Knight, 2000; Robinson et al., 2001; Smelt et al., 2002; Métris et al., 2003; Francois et al., 2005; Guillier et al., 2005). This method is an indirect method as it estimates the lag time distributions by the distributions of detection times, which can be defined as the time required to observe an increase of the turbidity. Both of the methods (direct observation and turbidity) were carried out in liquid laboratory media (except Wu et al., 2000). Yet, in many foods bacteria are immobilized and constrained to form a colony (Wilson et al., 2002). Several studies have shown that bacteria constrained to grow as colonies exhibit a slower growth rate, a different metabolic activity or modified growth limits compared to planktonic cells (Brocklehurst et al., 1997; Stecchini et al., 1998; Wilson et al., 2002; Meldrum et al., 2003; Koutsoumanis et al., 2004).

In this work we introduce a new method of the estimation of individual lag times based on the measurement of bacterial colony surfaces by an image analysis procedure. The method was applied to exponentially growing and stressed cells of *Listeria monocytogenes* which is an important food-borne pathogen that has caused significant outbreaks associated with milk, cheese, vegetables and salads, and meat products (McLauchlin et al., 2004). Finally, this paper reports the individual lag time distributions obtained on agar by the new method and compares with those obtained in broth by the method based on turbidity measurement.

## 2. Microbial cultures and modelling

### 2.1. Strain

The strain used in this study was the *L. monocytogenes* 14 (serotype 4b, industrial environment origin) and was maintained at  $-25^{\circ}\text{C}$  in 50% glycerol. The strain 14 is a reference strain of the French program in predictive microbiology Sym'Previus.

### 2.2. Preparation of exponentially growing and stressed cells of *L. monocytogenes*

First a culture was incubated at  $30^{\circ}\text{C}$  for 24 h in tryptone soy broth (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK) supplemented with 0.6% yeast extract (AES

Laboratoire, Combourg, France)(TSBye). This culture was diluted as needed to obtain an initial suspension of approximately  $10^3 \text{ CFU ml}^{-1}$  in TSBye. That initial culture was further incubating in TSBye for 20 h at  $25^{\circ}\text{C}$  to obtain  $10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$  in the exponential growing phase.

*L. monocytogenes* cells were subjected to two different stresses. Both mimic a dairy processing scenario of contamination. The first stress scenario of contamination (S1) simulated the contamination by *L. monocytogenes* cells of the surface of a just formed curd, where the cells were exposed to low pH. Then the curds were placed in a saturated brine solution, where cells were exposed to high NaCl concentration and low pH. Finally the cells were maintained at low pH for several days. The second stress scenario (S2) is the same as the S1 stress but the cells were subjected to a disinfectant (chlorine) before arriving on the curd.

For the S1 stress, cultures in the exponential growth phase were exposed to three successive injuries. First, TSBye of the exponential cell culture was adjusted to pH 4.6 with lactic acid (Prolabo, Paris, France). This culture was stored at  $25^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Then cells were subjected to TSBye with  $250 \text{ g l}^{-1}$  of NaCl (Prolabo) adjusted to pH 4.6 for 1 h at  $15^{\circ}\text{C}$ . Finally, cells were placed in TSBye with  $25 \text{ g l}^{-1}$  of NaCl adjusted to pH 4.6 at  $15^{\circ}\text{C}$  for 71 h.

The S2 stress cultures in the stationary phase were exposed to four successive injuries. First chlorine was added to a stationary phase culture at 360 ppm. After 2 min at  $25^{\circ}\text{C}$ , the cells were recovered by dilution (1/100) in TSBye adjusted to pH 4.6 with lactic acid (Prolabo). This culture was stored at  $25^{\circ}\text{C}$  for 24 h. The last two injuries were the same as for S1 stress.

The individual lag time distributions of these cells (in the exponential growth phase, S1 and S2 stressed) were studied on agar and compared with the individual lag time distributions observed in broth.

### 2.3. Growth experiments on agar

The kinetics of the bacterial growth on agar was studied with an automatic image processing system measuring the surface of colonies. This system includes a circular motorised platform Optasigma (Photon Lines, Marly-le-Roi, France) allowing the simultaneous study of four plates and a digital camera PixelFly (Photon Lines). A C++ routine was self-developed to program and automate the movements of the platform and the image acquisition. Using a WASP2 spiral plater (AES), suspensions of exponentially growing or stressed *L. monocytogenes* cells were plated uniformly onto try-

tone soy agar (Oxoid) supplemented with yeast extract (AES)(TSAye). The total volume deposited was 50 µl for a number of cells per plate of approximately 20. The density of inoculation is discussed in Section 3.3. For each experiment, three plates of TSAye were reserved for stressed cells and a fourth was dedicated to *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase. The four plates were incubated at 30 or 20 °C; an 80% relative humidity was maintained to avoid dehydration of the agar during the experimental duration. The image acquisition of plates was performed every 10 min. Each experiment was replicated at least three times. The development of the method of colony surface measurement is presented below with some details.

#### 2.4. Turbidity growth experiments

In order to investigate the difference between the growth of immobilized and planktonic cells, turbidity growth curves were generated with an automatic Bioscreen C reader (Labsystem France SA, Les Ulis, France) reader. From *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase and stressed cells, serial dilutions were made in tryptone salt broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) (TS) in order to reach in the final dilution a maximum concentration of 1.4 cells ml<sup>-1</sup> in TSBye pre-warmed at 30 or 20 °C. Wells of two Bioscreen plates were inoculated with 300 µl of the suspensions to obtain a target value of 0.42 cells well<sup>-1</sup>. Assuming a Poisson distribution of the cells in the wells (Francois et al., 2003), the maximum concentration of 0.42 cells well<sup>-1</sup> corresponds to a maximum of 35% of wells showing growth with at least 80% of them containing only one cell. The plates were immediately placed in the Bioscreen C reader at the incubation temperature of 30 or 20 °C. The increase in turbidity was monitored at 600 nm (OD). Measurements were taken every 10 min and the plates were shaken at medium intensity for 30 s/min. For each stress experiment, 150 wells were kept for stressed cells, the 50 left over were dedicated to *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase. Each experiment was replicated at least three times.

At the same time, bacterial counts were performed on the same cultures and the maximum specific growth rates were estimated from growth kinetics obtained by fitting the logistic with delay growth model (Rosso et al., 1996) with the nlinfit subroutine of Matlab 6.5.1 software (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA):

$$\ln x(t) = \begin{cases} \ln x_0, & t \leq \text{lag} \\ \ln x_{\max} - \ln \left\{ 1 + \left( \frac{x_{\max}}{x_0} - 1 \right) \exp[-\mu_{\max} \cdot (t - \text{lag})] \right\}, & t > \text{lag} \end{cases} \quad (1)$$

where  $x(t)$  is the bacterial concentration (CFU ml<sup>-1</sup>) at the instant  $t$  (h),  $x_0$  is the initial bacterial concentration,  $x_{\max}$  is the maximum bacterial concentration, lag is the lag time (h), and  $\mu_{\max}$  is the maximum specific growth rate (h<sup>-1</sup>).

#### 2.5. Estimation of individual detection times and lag times

By assuming an exponential microbial growth at a constant maximum specific growth rate,  $\mu_i$ , after a lag period, the time,  $T_{d,i}$ , for a culture  $i$  issued from  $N_{0,i}$  initial cells to reach a certain detection level,  $N_{d,i}$ , is related to the lag time,  $\text{lag}_i$ , by the following equation if the culture is still in the exponential phase (Baranyi and Pin, 1999):

$$T_{d,i} = \text{lag}_i + \frac{\ln(N_{d,i}) - \ln(N_{0,i})}{\mu_i}. \quad (2)$$

This equation is largely used to study lag times of bacteria by turbidity (Robinson et al., 2001; Métris et al., 2003; Guillier et al., 2005). In this study, we applied Eq. (2) to determine the individual lag times of *L. monocytogenes* in broth and on agar.

### 3. Surface colony growth

#### 3.1. Colony surface measurement method

The images captured by the camera were transferred to a computer and saved in bitmap format with a size of 1360 \* 1024 pixels. A pixel size corresponded to 66.67 by 66.67 µm for the images of this study. Images were converted and rescaled for the recognition procedure in intensity images using the ind2gray and im2double subroutines of Matlab. The intensity of pixels ( $I_{x,y}$  where  $x$  and  $y$  are the coordinates of the pixels) were comprised between 0 and 1 (Fig. 1).

The first step of the object recognition was the estimation of the intensity threshold for separating colonies from background pixels. Due to the preparation process, the agar background is, as a rule, non-homogeneous, i.e., it suffers from local variations of thickness and therefore intensity. For this reason it was not possible to set a fixed threshold for the separation of background and object pixels. In order to determine the local background level and therefore to estimate a spatially adaptive threshold, we calculated the local background intensities ( $I_i^{\text{back}}$ ) of the regions ( $R_i$ ) on the first image of the series where we knew colonies

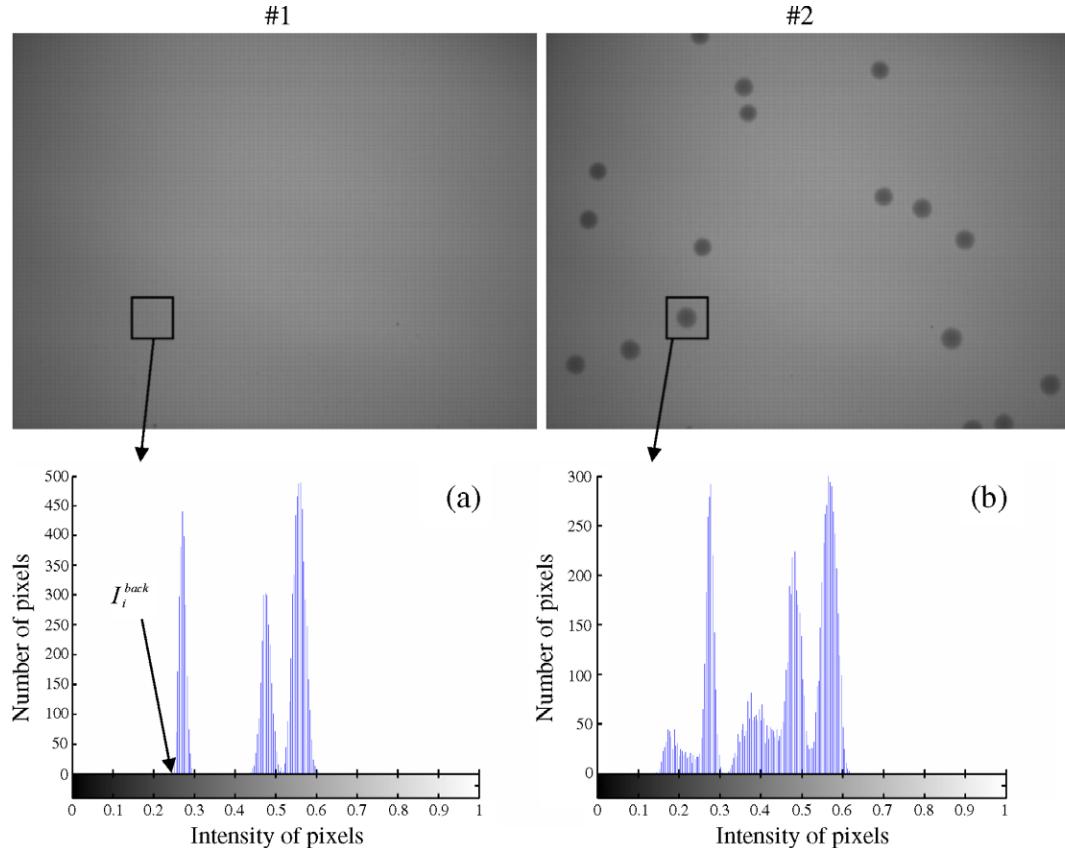


Fig. 1. Example of the determination of the spatially intensity threshold of a colony ( $I_i^{\text{back}}$ ). Photographs of an agar plate (TSAye at 20 °C) 1 (#1) and 60 (#2) h after inoculation of cells in the exponential growth phase. Histograms of the intensity of pixels of plate #1 and #2 of the region ( $R_i$ ).

were going to appear and grow. The local background intensities were the minimal intensities of pixels present in the  $R_i$  regions:  $I_i^{\text{back}} = \min(I_{xy})_{R_i}$  (Fig. 1).

Then for each  $R_i$  of each image, if  $I_{xy} < I_i^{\text{back}}$  then  $I_{xy}$ -values were assigned to 1 and to 0 if  $I_{xy} > I_i^{\text{back}}$ . We then obtained a binary image (Fig. 2a and b). Yet a colony is constituted of pixels with intensities inferior to  $I_i^{\text{back}}$  value but also of pixels above this threshold (Fig. 1). So we lost information by transforming the

image in binary image. To recover the lost pixels, we performed two morphological operations on binary images using bwmorph subroutine of Matlab. The first operation bridges previously unconnected pixels. The second operation performs morphological closing (dilation followed by erosion). The result of this procedure on a colony is shown in Fig. 2c. The surface of each colony was determined by quantifying the number of white pixels ( $I_i = 1$ ) for each image. Typical evolu-

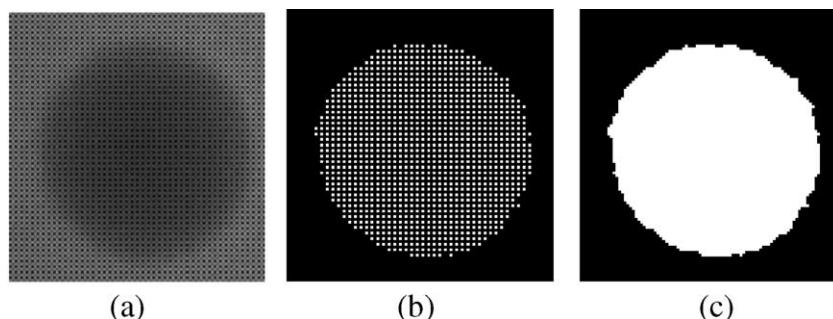


Fig. 2. Example of the recognition procedure of a colony surface by image analysis.

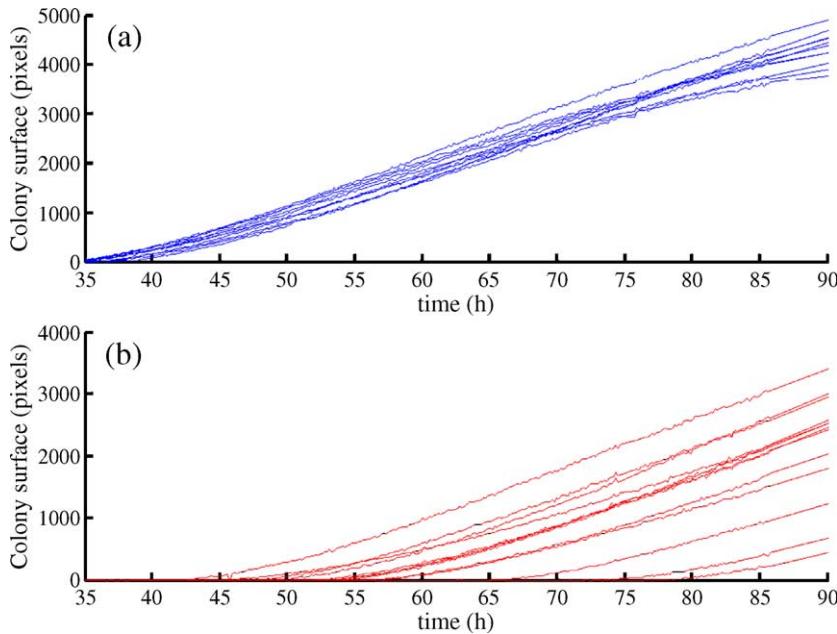


Fig. 3. Surface growth at 20 °C on TSAye of colonies issued from cells in the exponential growth phase (a) and from S2 stressed cells (b).

tions of the surface of *L. monocytogenes* colonies on TSAye are shown in Fig. 3.

### 3.2. Detection threshold and repeatability of the surface measurement method

To choose the surface threshold corresponding to the time of detection (2), we studied the repeatability of the method by analyzing a surface growth kinetics obtained with one colony issued from an exponentially growing

cell. Nine successive images were then acquired within an interval smaller than 1 s at different stages of the colony growth. The coefficient of variation of the nine surface measurements was used to quantify the precision of the method of the image acquisition method according to the surface of the colony. The coefficient of variation decreased rapidly from 60% to approximately 2% when the colony surface increased from 0 to 400 pixels and remained constant afterwards (Fig. 4). These results clearly suggest that the precision of the

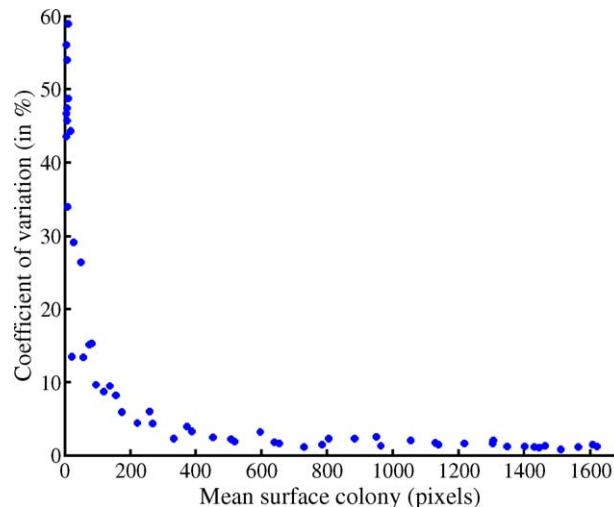


Fig. 4. Coefficient of variation of the repeated measurements of the surface of a *L. monocytogenes* colony growing on TSAye at 30 °C and 80% of relative humidity.

method of colony surface measurement is satisfying. A surface threshold of 200 pixels ( $0.89 \text{ mm}^2$ ) corresponding to early detection times was chosen to define the detection time because the precision seemed acceptable (5%) and the hypothesis of exponential growth is more probable than with larger surfaces.

### 3.3. Effect of propinquity on the growth rate of colonies

When colonies are too close to each other, mutual inhibitory effects were observed during the growth of the colonies resulting in decreasing growth rates (Fig. 5). It is important to account for these effects because they can lead to bias in detection times by making them longer. The inhibitory effect on each colony growth rate of neighbour colonies was then checked. To quantify this propinquity effect we introduced the parameter  $E_{S_d}^{T_d}$ , which is a function of the surfaces of neighbour colonies weighed by their proximity:

$$E_{S_d}^{T_d}(i) = \sum_j \frac{S_j^{T_d}}{d_{ij}} \quad (3)$$

where  $j$  is the number of colonies in a 150 pixel radius around the centre of the colony  $i$ .  $S_j$  is the surface of the  $j$ th colony at the detection time of  $T_d$  the colony  $i$ , and  $d_{ij}$  is the distance between the centres of the  $j$ th colony and the colony  $i$ .

Fig. 6 shows plots of the logarithm of the slope of the colony surface growth kinetics for colony size comprised between 100 and 500 pixels (surface growth rates) according to the  $E_{S_d}^{T_d}$ -values issued from plates

inoculated with more than 100 cells per plate and incubated at  $30^\circ\text{C}$ . A significant decrease of the surface growth rates was observed for  $\log_{10}(E_{S_d}^{T_d}+1)$ -values above approximately 1. This corresponds to a limit  $E_{S_d}^{T_d}$ -value of about 10 pixels. A similar result was observed at  $20^\circ\text{C}$  (data not shown). This decrease in surface growth rates, also reported by different authors (Thomas et al., 1997; Malakar et al., 2002, 2003), can be explained by the production and the diffusion of lactic acid in the solid medium (Malakar et al., 2002). For plated cells in the exponential growth phase, this effect was only observed when the number of colonies per plate is great and when colonies reached large size, i.e., when colonies attained the later stage of growth. The times of detection to reach colonies of 200 pixels were then not affected and only the final size of colonies was modified. Chapuis et al. (1995) also observed this phenomenon and they proposed a simple model describing the relationship between colony surfaces and the density of plates. On the other hand, with stressed cells, as the growth of some colonies was greatly delayed, the time of detection of these colonies could be biased by the previous growth of other colonies. By inoculating few cells per plate (less than 20), we avoided this phenomenon. In this manner, the distance between colonies was in most of the cases sufficient to obtain  $E_{S_d}^{T_d}$ -values below the threshold of 10 pixels.

### 3.4. Calibration of colony surfaces against cell density

Agar plugs containing colonies of various sizes were extracted to count the viable cells they included. Plugs

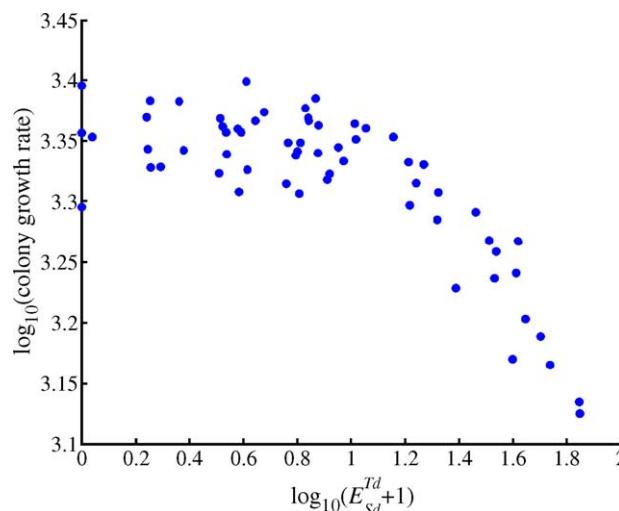


Fig. 5. Plot of the  $\log_{10}$  of the colony growth rate versus  $\log_{10}$  of the propinquity parameter ( $E_{S_d}^{T_d}$ ) for colonies issued from stressed cells on TSAye at  $30^\circ\text{C}$  and 80% of relative humidity.

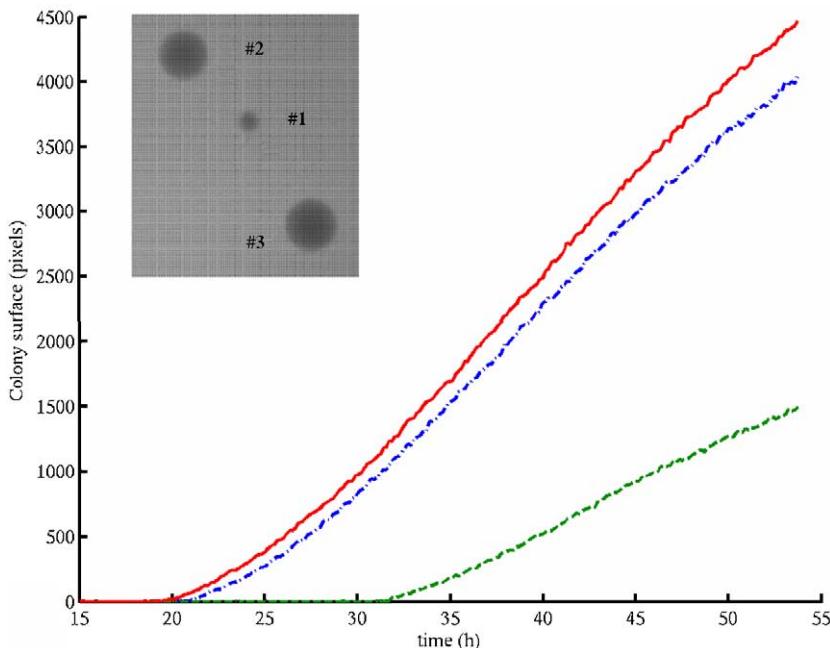


Fig. 6. Impact of neighbour colonies on the colony growth rate of *L. monocytogenes* on agar (TSAye) at 30 °C and 80% HR. Graphic: growth kinetics of the surface of 3 colonies. Solid line: colony #1. Dashed-dot line: colony #2. Dashed line: colony #3. Photograph: image of the 3 colonies at  $T_d$  of colony #1.

were dispersed in TS broth and homogenized in a Stomacher (AES). Suspensions obtained were plated on TSAye and incubated for 48 h at 37 °C before reading. A linear correlation was observed between the logarithm of viable counts and the logarithm of the colony surface for surfaces comprised between 250 and 30 000 pixels (Fig. 7). This observation is in agreement with the result of Harrison et al. (2000) who also observed a linear relationship between the logarithm of surface colony radius and the logarithm of *L. monocytogenes* cells per colony. However, it must be pointed out that the obtained linear relationship is only

valid for the solid growth medium used (TSAye). As colony density depends on viscosity and water activity (Stecchini et al., 2001), a new relationship would probably have to be generated with a modified medium (e.g., with added NaCl, acid or sucrose).

#### 4. Individual lag times

The application of colony growth analysis to individual lag times estimation of *L. monocytogenes* was established by analogy with the method based on turbidity growth curves.

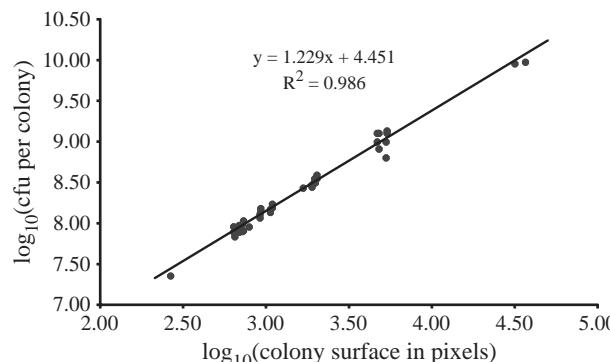


Fig. 7. Relationship between the  $\log_{10}$  of cfu number per colony and the  $\log_{10}$  of colony surface (pixels) for *L. monocytogenes* colonies growing on TSAye at 30 °C and 80% HR (●). Solid line: best fit of the linear regression proposed.

#### 4.1. Individual lag time estimation in broth

The individual lag times of *L. monocytogenes* cells in broth were estimated through the time,  $T_d$ , required for the microbial population to generate a 0.05 increase of the initial baseline value of OD. The  $T_d$  values obtained for each replicate were standardized and then grouped all together. The standardization procedure described in Guillier et al. (2005) was applied to correct the bias linked to the variation in the reproducibility of growth and injury conditions between replicates. The standardization comprised two steps. It consisted in a transformation of the  $T_d$  values by centering the mean of each dataset for the cell in the exponential growth phase, followed by a transformation using the 5th percentile of the distribution of  $T_d$  of the stressed cells. The means and standard deviations of standardized  $T_d$  ( $T_{ds}$ ) distributions for exponential and stressed cells in broth medium are shown in Table 1. By using Eq. (2) with  $N_{0,i}=1$  *L. monocytogenes* well $^{-1}$ ,  $N_{d,i}=1.77\ 10^7$  cells well $^{-1}$  (Guillier et al., 2005), and  $\mu_i=\mu_{max}=0.90\ h^{-1}$  or  $0.42\ h^{-1}$  where  $\mu_{max}$  is the maximum specific growth rate obtained by viable counts in broth medium at 30 or 20 °C, respectively, we obtained for cells in the exponential growth phase a mean individual lag time of  $-0.04\ h$  with a standard deviation of  $0.21\ h$  at 30 °C and a mean of  $-0.24\ h$  with a standard deviation of  $1.24\ h$  at 20 °C. It implies that almost all cells exhibited a smaller lag time than the generation time (0.77 and 1.65 h at 30 and 20 °C, respectively). This observation is in agreement with the results of Augustin et al. (2000b) and Whiting and Bagi (2002) who observed that the lag time of *L. monocytogenes* cultures in exponential phase was null in different re-growth conditions. We could then reasonably assume that the lag time of exponentially growing cells is null in broth and that, for these cells,  $T_{d,i} \approx \frac{\ln(N_{d,i}) - \ln(N_{0,i})}{\mu_i}$ . The distribution

of individual lag times for stressed cells,  $lag_{s,i}$ , can then be deduced by subtracting the mean  $T_d$ -value of exponentially growing cells,  $\bar{T}_{de}$ , from the  $T_d$ -values obtained with stressed cells,  $T_{ds,i}$ :

$$lag_{s,i} = T_{ds,i} - \bar{T}_{de} \quad (4)$$

The means of individual lag times for stressed cells calculated with Eq. (2) were 4.00 h and 16.02 h for S1 and S2 stresses, respectively. Results obtained with Eq. (4) are close to these ones since we obtained a mean value of 4.04 h for S1 stressed cells at 30 °C and a mean value of 16.26 h for S2 stressed cells at 20 °C (Table 1). Using Eq. (4) is then a simpler procedure, which allows the estimation of lag-distributions without any knowledge of the growth rate and of the bacterial concentration at the detection time. The distributions of individual lag times of S1 and S2 stressed cells in broth are shown in Fig. 8. Various parametric distributions were checked to describe the observed distributions using Regress+ (version 2.5.1; Dr Michael P. McLaughlin [[http://www.causaScientia.org/software/Regress\\_plus.html](http://www.causaScientia.org/software/Regress_plus.html)]). Using the Log-likelihood criterion to select the best fitting theoretical distributions, Extreme Value type II (EVII) distributions were chosen to describe the observed lag distributions in broth (Fig. 8 and Table 2). The cumulative density function (cdf) of EVII is:  $\exp(-((y-a)/b)^{-c})$ .

#### 4.2. Individual lag time estimation on agar

As with the turbidity in broth, we can assume that the time required for a colony to reach a surface threshold is proportional to the lag time of the cell initiating the colony according to the Eq. (2). To use this equation we must choose a colony surface threshold and estimate the number of cells present in colonies at this detection level.

Table 1

Means and standard deviations of standardized ( $T_{ds}$ ) detection times and individual lag times (lag) of *L. monocytogenes* in different physiological states and growth environments

Physiological states	Growth conditions	No. of values	$T_{ds}$		lag (Eq. (2))		lag (Eq. (4))	
			Mean (h)	Standard deviation (h)	Mean (h)	Standard deviation (h)	Mean (h)	Standard deviation (h)
S1 stressed	TSBye 30 °C	544	18.50	0.21	-0.04	0.21	-	-
	TSAYe 30 °C	215	18.92	0.60	0.29	0.60	-	-
	TSBye 20 °C	54	39.50	1.24	-0.24	1.24	-	-
	TSAYe 20 °C	125	40.61	1.21	0.70	1.21	-	-
	TSBye 30 °C	188	22.54	3.23	4.00	3.23	4.04	3.23
	TSAYe 30 °C	87	22.77	2.63	4.14	2.63	3.85	2.63
S2 stressed	TSBye 20 °C	108	55.76	13.50	16.02	13.50	16.26	13.50
	TSAYe 20 °C	85	55.97	11.83	16.06	11.83	15.36	11.83

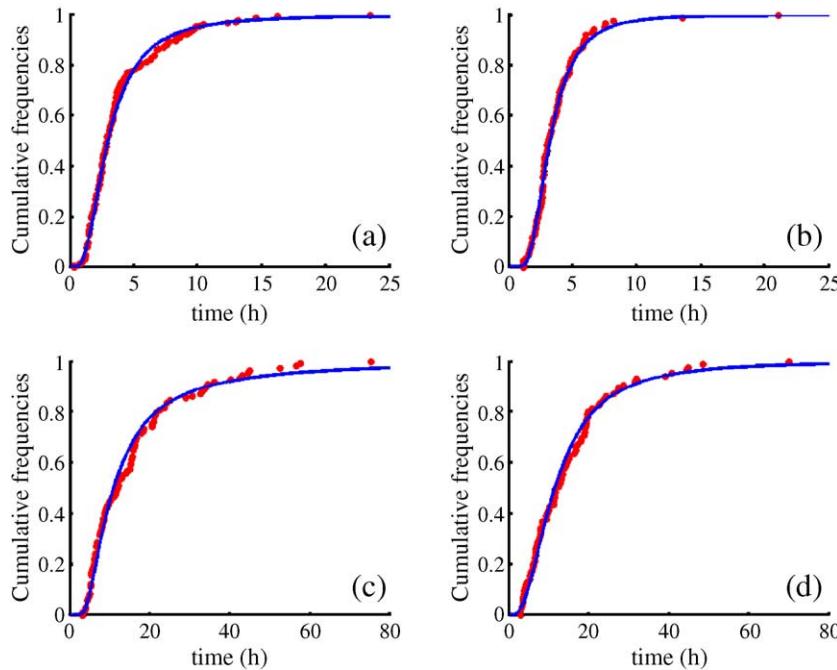


Fig. 8. Observed and fitted distributions of the individual lag times (in hours) of *L. monocytogenes* cells of S1 stressed cells at 30 °C in TSBye (a) and on TSAye (b) and of S2 stressed cells at 20 °C in TSBye (c) and on TSAye (d). Continuous curve: fitted Extreme value Type II distribution (cdf of EVII :  $\exp(-((y-a)/b)^{-c})$ ). Circles: observed cumulative frequencies of lag.

As in broth experiments,  $T_d$  values obtained for each replicate were standardized and then grouped all together. The means and standard deviations of  $T_{ds}$  distributions for exponential and stressed cells obtained on agar medium are shown in Table 1. To use Eq. (2), we assumed that the growth rate was the same as in broth and thus that  $\mu_i = \mu_{\max} = 0.90$  or  $0.42 \text{ h}^{-1}$  and that the relationship between the  $\log_{10}$  of viable counts and the  $\log_{10}$  of the colony surface was still valid at 200 pixels. So with  $N_{0,i} = 1 \text{ L. monocytogenes colony}^{-1}$  and  $N_{d,i} = 1.90 \cdot 10^7 \text{ cells colony}^{-1}$  at 200 pixels, we obtained with cells in the exponential growth phase a mean individual lag time of 0.29 h with a standard deviation of 0.60 h in TSAye at 30 °C and a mean of 0.70 h with a standard deviation of 1.21 h in TSAye at

20 °C. It implies that almost all these cells exhibited a lag time smaller than the generation times (0.77 and 1.65 h at 30 and 20 °C, respectively). These results are consistent with the observations performed in broth and we can also assume that the lag time of cells in the exponential growth phase is null on agar. So we also used Eq. (4) for the determination of individual lag times of *L. monocytogenes* cells growing on agar. Similar means and standard deviations of individual lag times were obtained using Eq. (2) and Eq. (4) for stressed cells (Table 1).

The distributions of individual lag times obtained on TSAye for S1 and S2 stressed cells are shown in Fig. 8. Various parametric distributions were checked to describe the observed distribution using Regress+. Using

Table 2

Estimated optimum parameters and their confidence intervals at 95% for Extreme Value type II (EVII) distributions fitted to lag distributions of stressed cells

Physiological states	Parameters of EVII*		
	a	b	c
S1 stressed			
-TSBye	−1.35 (−3.39, −0.30)	3.87 (2.73, 5.90)	2.77 (2.02, 4.22)
S2 stressed	−2.34 (−10.40, −0.18)	5.13 (2.83, 13.24)	4.33 (2.49, 11.39)
-TSBye			
-TSAye	−0.13 (−4.34, 2.27)	8.87 (5.79, 13.53)	1.65 (1.18, 2.54)
-TSAye	−7.34 (−23.42, −1.67)	16.60 (10.38, 32.29)	2.76 (1.80, 5.53)

\* cdf of EVII :  $\exp(-((y-a)/b)^{-c})$ .

the Log-likelihood criterion to select the best fitting theoretical distributions, EVII distributions were chosen to describe the observed lag distributions on agar (Fig. 8 and Table 2).

#### 4.3. Comparison of individual lag time distributions obtained in broth and on agar

A small number of studies have sought to examine the historical impact of stress on individual lag times and they concerned either planktonic cells (Stephens et al., 1997; Smelt et al., 2002; Guillier et al., 2005) or attached cells (Elfwing et al., 2004). Here, we have presented a new method to determine the individual lag times of immobilized cells and have checked that our results were not biased by the mutual inhibitory effects between colonies.

The means and standard deviations of S1 and S2 stressed cells on agar are very close to the means and standard deviations obtained in broth (Table 1). The standard deviations were slightly smaller in agar but it could be explained by the fact that the datasets were smaller.

The EVII distribution proved to be suitable to fit all the obtained distributions (Fig. 8). The estimated parameters of the EVII distributions fitting the individual lag time distributions and their confidence intervals are presented in Table 2. From the observation of the confidence intervals of parameters, no clear difference between broth and agar conditions can be found.

This distribution was also observed for the individual lag times in TSB<sub>Y</sub>e at 30°C of *L. monocytogenes* cells previously stressed by HCl, NaOH and chlorine (Guillier et al., 2005). More generally this is in agreement with the results of Smelt et al. (2002), Métris et al. (2003), Francois et al. (2005) and Guillier et al. (2005) who observed right skewed distributions for stressed cells but not with the results of Dykes (1999). Indeed he investigated sublethal injury in *L. monocytogenes* cells and proposed an image analysis method of the size of colonies to measure the sublethal injury of stressed cells. He found that the distributions of the sizes of colonies from starved or heated cells were right skewed. From his results we should conclude that individual lag time distributions of the stressed cells are left skewed as they were the orthogonal projection of the distributions of sizes of colonies. This difference could be explained by the inter-colony effect on the colony growth rates as the densities on the plates were comprised between 100 and 200 colonies.

Several authors also studied the behaviour of immobilized cells compared to planktonic cells and differences were revealed. For example Brocklehurst et al. (1997) and Meldrum et al. (2003) showed for *Salmonella typhimurium* and *L. monocytogenes* that the growth rate follows the order: broth > immersed colonies > surface colonies. The growth rates observed in their studies were obtained by applying broth kinetics models to the whole kinetics of growth of the colonies. Yet, Malakar et al. (2002, 2003) demonstrated that mass transfer limitations can be significant in the development of colonies in solid systems and that the use of broth predictive models on the whole colony growth kinetics is not valid. So it is difficult to separate which part of the observed decrease of the growth rate is due to the cell immobilization or to the method used to estimate the growth rate. Nevertheless the decrease of the growth rate observed between immobilized and planktonic cells by Brocklehurst et al. (1997) and Meldrum et al. (2003), which could be an actual decrease rather than linked to a method bias, was larger as the growth conditions became less favourable. Koutsoumanis et al. (2004) also compared the behaviour of *L. monocytogenes* cells in broth and solid medium near the growth/no growth interface and revealed that the boundaries of growth in agar are narrower than in liquid.

In our study, no influence of the growth medium (broth, agar) on the lag time and the growth rate of *L. monocytogenes* was observed, perhaps because the results presented in this paper have been obtained in favourable growth conditions (high water activity, neutral pH). In these conditions, Stecchini et al. (2001) observed a thin surface water layer on an agar media that could explained the similarities of behaviour of the cells between broth and agar. In the future we will focus on determining the individual lag time distributions on agar in less favourable conditions especially by adding salt and/or organic acid to check potentially different behaviours in similar growth conditions between broth and agar.

#### Acknowledgements

This study is supported by a grant from the Ministères de la Recherche et de l'Agriculture (convention R02/04 programme Aliment-Qualité-Sécurité) and belongs to the French national program for predictive microbiology Sym'Previus. L. Guillier is a recipient of a Doctoral fellowship from Arlait-Recherches and the Association Nationale de la Recherche Technique. We gratefully acknowledge Mrs Pardon, who checked the manuscript for correct use of English.

## References

- Augustin, J.-C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V., 2000a. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1706–1710.
- Augustin, J.-C., Rosso, L., Carlier, V., 2000b. A model describing the effect of temperature history on lag time of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 169–181.
- Baranyi, J., 1998. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *J. Theor. Biol.* 192, 403–408.
- Baranyi, J., 2002. Stochastic modelling of bacterial lag phase. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 203–206.
- Baranyi, J., Pin, C., 1999. Estimating growth parameters by means of detection times. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 732–736.
- Baranyi, J., Pin, C., 2004. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.), *Modeling Microbial Responses in Food*. CRC Series in contemporary Food Science, Washington, D.C, pp. 286–299.
- Brocklehurst, T.F., Mitchell, G.A., Smith, A.C., 1997. A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiol.* 14, 303–311.
- Chapuis, C., Rosso, L., Flandrois, J.P., 1995. Relationship between colonial surface and density on agar plate. *J. Appl. Microbiol.* 79, 542–550.
- Dykes, G.A., 1999. Image analysis of colony size for investigating sublethal injury in *Listeria monocytogenes*. *J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.* 7, 223–231.
- Elfwing, A., LeMarc, Y., Baranyi, J., Ballagi, A., 2004. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 675–678.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2003. Modelling the individual lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 26–30.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2005. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 41–53.
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C., 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2940–2948.
- Harrison, W.A., Peters, A.C., Fielding, L.M., 2000. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* colonies under modified atmospheres at 4 and 8 degrees C using a model food system. *J. Appl. Microbiol.* 88, 38–43.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiol.* 21, 415–422.
- Kutalik, Z., Razaz, M., Baranyi, J., 2005. Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *J. Theor. Biol.* 232, 285–299.
- Malakar, P.K., Martens, D.E., van Breukelen, W., Boom, R.M., Zwietering, M.H., van't Riet, K., 2002. Modeling the interactions of *Lactobacillus curvatus* colonies in solid medium: consequences for food quality and safety. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3432–3441.
- Malakar, P.K., Barker, G.C., Zwietering, M.H., van't Riet, K., 2003. Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 263–272.
- McKellar, R.C., Knight, K.P., 2000. A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 171–180.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 15–33.
- Meldrum, R.J., Brockelhurst, T.F., Wilson, D.R., Wilson, P.D.G., 2003. The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10 °C. *Food Microbiol.* 20, 97–103.
- Métris, A., George, S.M., Peck, M.W., Baranyi, J., 2003. Distribution of turbidity detection times generated by single cell-generated bacterial populations. *J. Microbiol. Methods* 55, 821–827.
- Pascual, C., Robinson, T.P., Ocio, M.J., Aboaba, O.O., McKey, B.M., 2001. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 357–361.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., McKey, B.M., 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 163–173.
- Ross, T., Dalgaard, P., 2004. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.), *Modeling Microbial Responses in Food*. CRC Series in Contemporary Food Science, Washington, D.C, pp. 64–135.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J., Veit, P., 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8 °C: consequences for the shelf life of chilled products. *J. Food Prot.* 59, 944–949.
- Smelt, J.P.P.M., Otten, G.D., Bos, A.P., 2002. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 207–212.
- Stecchini, M.L., Del Torre, M., Sarais, I., Saro, O., Messina, M., Maltini, E., 1998. Influence of structural properties and kinetic constraints on *Bacillus cereus* growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1075–1078.
- Stecchini, M.L., Del Torre, M., Donda, S., Maltini, E., Pacor, S., 2001. Influence of agar content on the growth parameters of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 81–88.
- Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J., 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J. Appl. Microbiol.* 83, 445–455.
- Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 137–159.
- Thomas, L.V., Wimpenny, J.W.T., Barker, G.C., 1997. Spatial interactions between subsurface bacterial colonies in a model system: a territory model describing the inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nisin-producing lactic acid bacterium. *Microbiology* 143, 2575–2582.
- Whiting, R.C., Bagi, L.K., 2002. Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 291–295.
- Wilson, P.D.G., Brocklehurst, T.F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W.T., Van Impe, J.F., 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 275–289.
- Wu, Y., Griffith, M.W., McKellar, R.C., 2000. A comparison of the Bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of individual cells of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 468–472.



## IV. Principe d'acquisition des temps de latence cellulaires à partir des temps de détection : applications en milieux solides et liquides

La méthode de détermination des temps de latence cellulaires à partir des temps de détection est présentée dans l'article 2. Elle est basée sur l'utilisation des temps de détection (en milieux liquide ou solide) avec l'équation (4) de l'article 2 :

$$lag_{s,i} = T_{ds,i} - \overline{T}_{de}$$

où  $lag_{s,i}$  est le temps de latence de la cellule bactérienne stressée ayant initié la colonie ou la croissance dans le puits de la plaque Bioscreen,  $T_{ds,i}$  est le temps nécessaire à cette cellule pour donner une taille de colonie ou une densité optique détectable et  $\overline{T}_{de}$  représente la moyenne des temps de détection pour des cellules issues d'une culture en phase exponentielle. Nous avons représenté graphiquement le principe de cette méthode sur la Figure 6. Cette méthode s'applique aussi bien au temps de détection en milieu solide qu'en milieu liquide.

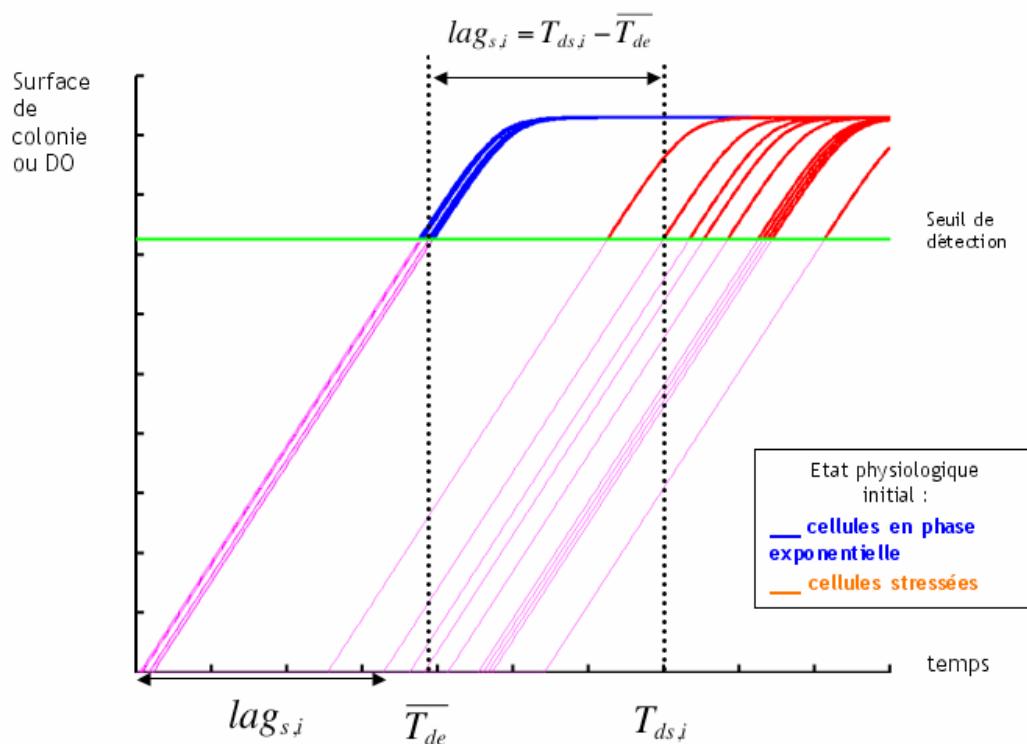


Figure 6. Principe de détermination des temps de latence cellulaires de cellules stressées en milieux solide et liquide à partir des temps de détection.

En plus des résultats de l'article, concernant l'estimation des temps de latence à partir des temps de détection et du taux de croissance (Eq. 2 de l'article 2 :  $T_{d,i} = lag_i + \frac{\ln(N_{d,i}) - \ln(N_{0,i})}{\mu_i}$ ), nous avons étendu le calcul pour les cellules en phase exponentielle en milieu liquide dans toutes les conditions d'accueil. Les résultats obtenus pour ces cellules confirment que les temps de latence

sont quasiment nuls quelles que soient ces conditions (Tableau 11). Ils justifient donc parfaitement l'utilisation de l'Eq. 4 de l'article 2. D'une part parce que les temps de latence des cellules de *L. monocytogenes* issues d'une culture en phase exponentielle à 25°C ne sont pas différents de zéro, et d'autre part parce que cette méthode ne nécessite pas la connaissance du taux de croissance. En effet, l'estimation du taux de croissance par densité optique peut entraîner une mauvaise estimation des temps de latence. Par exemple, François et al. (2005c) ont été amenés à recalculer les temps de latence cellulaires publiés dans un premier article François et al. (2005a).

Tableau 11. Moyenne des temps des latence cellulaires pour des cellules issues d'une culture en phase exponentielle dans différentes conditions d'accueil.

T [°C]	pH [-]	a <sub>w</sub> [-]	Taux de croissance observé [h <sup>-1</sup> ]	Moyenne des temps de détection [h]	Moyenne calculée des $\tau_i$ [h]*	Temps génération [h]
30	Fraser 1/2	Fraser 1/2	0,78	21,92	0,44	0,89
30	7	0,997	0,90	18,50	-0,04	0,77
30	7	0,97	0,58	30,82	2,14	1,19
30	5,5	0,997	0,71	22,45	-0,91	0,97
30	5,5	0,97	0,46	36,01	-0,27	1,51
25	7	0,997	0,67	26,70	1,79	1,03
20	7	0,997	0,44	39,50	1,57	1,58
20	7	0,97	0,29	56,46	-1,09	2,39
20	6	0,98	0,33	45,04	-5,53	2,10
20	5,5	0,97	0,25	63,95	-2,81	2,77
15	7	0,997	0,23	70,20	-3,94	3,08
15	7	0,97	0,18	96,84	4,81	3,82
15	6	0,98	0,21	81,70	1,31	3,34
12	7	0,997	0,16	103,89	0,76	4,28
12	5,5	0,97	0,12	150,01	7,26	5,93

$$* \overline{\tau_i} = \overline{T_{d,i}} - \frac{\ln(N_{d,i}) - \ln(N_{0,i})}{\mu_i}$$

avec  $N_{d,i}$  nombre de cellules au temps de détection, égal à

$1.77 \times 10^7$  cellules par puits ;  $N_{0,i}$  nombre de cellule à t=0 égal à 1 et  $\mu_i$  le taux de croissance observé.

## Chapitre C : Influence du stress sur les distributions des temps de latence cellulaires

Cette partie présente l'ensemble des résultats obtenus pour répondre au premier grand objectif de notre étude : déterminer l'impact des stress et donc de l'état physiologique sur la forme des distributions, la moyenne et la dispersion des temps de latence cellulaires. Les distributions de temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* ont été déterminées en milieu TSBye à 30°C à  $a_w$  0.997 et pH 7 pour 22 états physiologiques correspondant à 22 protocoles de stress différents.

### I. Stress standardisés

#### I.1. Article 3

Résumé : L'effet de neuf stress couramment rencontrés dans les industries agro-alimentaires sur les distributions de temps de détection ( $T_d$ ) de *L. monocytogenes* a été déterminé. Les neuf stress ont été standardisés sur une perte de cultivabilité de  $1.5 \log_{10} \text{ufc ml}^{-1}$  sur milieu non sélectif. Il a été établi que la principale source de la variance des  $T_d$  pour les cellules stressées est la variance des latences individuelles. Les distributions démontrent qu'il existe une réponse différente des cellules en terme de temps de latence en fonction du stress qu'elles ont subi. Les stress appliqués entraînent des changements de la forme, de la moyenne et de la variance des distributions. Les distributions de  $T_d$  ont ensuite été ajustées par différentes distributions. En se basant sur le maximum de vraisemblance en tant que critère de la qualité de l'ajustement, les distributions de  $T_d$  des cellules stressées suivent 6 distributions différentes : deux distributions bimodales (stress froid et BAC), la distribution Extreme Value type II (stress HCl, NaOH, acide lactique et hypochlorite), la distribution gamma (stress nutritionnel), la distribution exponentielle (stress NaCl) et la distribution Weibull (stress chaud). La variance et la moyenne des  $T_d$  ont permis de classer l'impact des neuf stress sur les temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes*. La classification des stress par rapport à leur impact sur la variance est la suivante (impact croissant) : HCl, acide lactique, froid, NaOH, nutritionnel, NaCl, hypochlorite, chaud et BAC. La classification par rapport à la moyenne est (impact croissant) : HCl, froid, acide lactique, hypochlorite, NaOH, NaCl, nutritionnel, BAC, chaud. Ces résultats suggèrent que la variabilité des latences induites par les stress est importante à prendre en compte pour la modélisation des latences.



## Influence of Stress on Individual Lag Time Distributions of *Listeria monocytogenes*

L. Guillier,<sup>1,2\*</sup> P. Pardon,<sup>1</sup> and J.-C. Augustin<sup>1</sup>

*Unité Mixte de Recherche ENVA-INRA RISQUAL, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort, France,<sup>1</sup> and Arilait Recherches, 42 avenue de Châteaudun, F-75314 Paris, France<sup>2</sup>*

Received 8 October 2004/Accepted 4 January 2005

The effects of nine common food industry stresses on the times to the turbidity ( $T_d$ ) distribution of *Listeria monocytogenes* were determined. It was established that the main source of the variability of  $T_d$  for stressed cells was the variability of individual lag times. The distributions of  $T_d$  revealed that there was a noticeable difference in response to the stresses encountered by the *L. monocytogenes* cells. The applied stresses led to significant changes of the shape, the mean, and the variance of the distributions. The variance of  $T_d$  of wells inoculated with single cells issued from a culture in the exponential growth phase was multiplied by at least 6 and up to 355 for wells inoculated with stressed cells. These results suggest stress-induced variability may be important in determining the reliability of predictive microbiological models.

*Listeria monocytogenes* has been recognized as an important food-borne pathogen that causes listeriosis. Outbreaks of listeriosis have been associated with milk, cheese, vegetables and salads, and meat products. The organism is particularly problematic for the food industry because it is widespread in the environment (17) and because of its ability to grow within a wide range of temperatures (−1.5 to 45°C), pH values (4.39 to 9.4), and osmotic pressures (NaCl concentrations up to 10%).

So, extensive research was carried out on predictive models describing the behavior of this pathogen in foods. Today, the models describing the environment effect on growth rate of *L. monocytogenes* are sufficiently accurate to be used by manufacturers, regulators, and scientists to assess microbial risks associated with the consumption of foods or to evaluate the relevance of risk management options (1, 2). On the other hand, the models describing the lag time must be improved to make the prediction more reliable (22, 29).

Some secondary models have been published to describe the influence of the environment on the bacterial lag time (5, 14, 41). Many reviews and discussions concerning their applicability have been published (28, 32, 35, 38). But the prediction of the lag time in foods still seems difficult to obtain and it is necessary to improve predictions (20, 37). As natural contaminations of foods occur with very few cells which are occasionally stressed by the food processing and the industry environment, it is essential to improve models by taking into account injuries encountered by the cells before they contaminate the foods and by using a stochastic approach dealing with the variability of the individual behavior of microbial cells. Models have been developed to take the effect of injuries on the bacterial lag times into account (11, 12, 39). Similarly, the individual response was also tackled by some authors such as

Baranyi (6), who showed the relationship between the individual lag time distributions and the lag time of the bacterial population. Recently, some individual lag time distributions have been characterized (23, 33). The variability of individual lag times seems to be wider as microorganisms are injured (4, 33, 34, 39) or as growth conditions are unfavorable (23, 24, 27).

The aim of this study was to investigate and to compare the impacts of nine stresses usually met in the food industry on the distributions of individual lag times of *L. monocytogenes*. For this, the distributions of times to the turbidity ( $T_d$ ) of microplate wells inoculated with single *L. monocytogenes* cells previously subjected to stress were characterized in optimal growth conditions.

### MATERIALS AND METHODS

**Strains and culture conditions.** *L. monocytogenes* 14 (serotype 4b, industrial environment origin) was maintained at −25°C in 50% glycerol. The strain 14 is a reference strain of the French program in predictive microbiology Sym'Previus. Prior to each experiment, a culture was incubated at 30°C for 24 h in tryptone soy broth (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, United Kingdom) supplemented with 0.6% yeast extract (AES Laboratoire, Combourg, France) (TSBye). The first bacterial culture was diluted as needed to obtain an initial bacterial suspension of approximately 10<sup>3</sup> cells ml<sup>−1</sup> in TSBye. That initial bacterial concentration was further incubated in TSBye for 20 h at 25°C to obtain 10<sup>8</sup> cells ml<sup>−1</sup> in the exponential growth phase.

**Stress experiments.** Nine different stresses were applied on cultures in the exponential growth phase. First, before each stress, once TSBye had been eliminated by centrifugation (5,000 × g, 10 min, 4°C), *L. monocytogenes* cells were washed in 0.85% of NaCl (Prolabo, Paris, France) (diluent) at 25°C, pH 7, and centrifuged again (5,000 × g, 10 min, 4°C). Centrifugation did not have any influence on the individual lag time distribution of *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase (data not shown); this stage did not modify the physiological state of the cells. Secondly, the supernatant was eliminated and cells were recovered in the following conditions: (i) for mineral acid stress, in diluent at 25°C adjusted to pH 3 with HCl (Prolabo) for 34 min; (ii) for organic acid stress, in diluent at 25°C adjusted to pH 4.6 with lactic acid (Prolabo) for 48 h; (iii) for alkali stress, in diluent at 25°C adjusted to pH 12 with NaOH (Prolabo) for 22 min; (iv) for the first disinfectant stress, in diluent at 25°C supplemented with 4 mg liter<sup>−1</sup> of benzalkonium chloride (BAC) (Fluka, Buchs, Switzerland) for 13 min; (v) for the second one, in diluent at 25°C supplemented with chlorine at 2.4 ppm for 1.5 min; (vi) for cold stress, in diluent dispatched in 1-ml aliquots directly placed at −25°C for 48 h; (vii) for heat stress, in diluent then diluted (1:100) in physiologic water at 55°C for 3 min; (viii) for osmotic stress, in pH 7

\* Corresponding author. Mailing address: Unité Mixte de Recherche ENVA-INRA RISQUAL, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort, France. Phone: 33 0 143 967043. Fax: 33 0 143 967121. E-mail: lguillier@vet-alfort.fr.

salt solution at 25% (wt/vol) at 25°C for 25 h; and (ix) for starvation stress, a second washing was realized in diluent to ensure the complete elimination of nutrient and the cells were recovered in diluent at 30°C for 24 h. The time of exposure to each stress was the necessary time to obtain a  $1.5 \log_{10}$  CFU ml $^{-1}$  loss by enumeration on tryptone soy agar (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, United Kingdom) supplemented with yeast extract at 0.6 g liter $^{-1}$  (AES Laboratoire) (TSAye). The loss of  $1.5 \log_{10}$  CFU ml $^{-1}$  was chosen because of the shape of the inactivation curve observed for the starvation stress. For this stress, a more significant loss would have been more difficult to achieve. This loss of cultivability also presented the advantage of being significantly higher than the error of the viable count enumeration method.

**Bioscreen growth experiments.** Turbidity growth curves were generated with an automatic Bioscreen C (Labsystem France SA, Les Ulis, France) reader. From *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase and stressed cells, serial dilutions were made in tryptone salt (Oxoid) broth in order to reach in the final dilution a maximum concentration of 1.4 cells ml $^{-1}$  in TSBye preheated at 30°C. Wells of two Bioscreen plates were inoculated with 300  $\mu$ l of this suspension to obtain a target value of 0.42 cells well $^{-1}$ , increasing the probability of having one cell in wells showing growth. Assuming a Poisson distribution of the cells in the wells (18), the maximum concentration of 0.42 cells well $^{-1}$  corresponds to a maximum of 35% of wells showing growth and allowed us to say that less than 20% of these wells contained more than one cell. Then the plates were placed in the Bioscreen C reader at the incubation temperature of 30°C. The increase in turbidity was monitored at 600 nm (optical density [OD]). Measurements were taken every 10 min, and the plates were shaken at the medium intensity for 30 s/min. For each stress experiment, 150 wells were kept for stressed cells, and the 50 left over were dedicated to *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase. Each experiment was replicated at least three times.

**Relation between turbidity growth curves and individual lag times.** The individual lag times of *L. monocytogenes* cells were estimated through the time of detection ( $T_d$ ), which is the time required for the microbial population to generate a 0.05 increase of the initial baseline value of OD ( $OD_0$ ). This optical density corresponds to a cell density estimated by a viable count of approximately  $1.8 \times 10^7$  *L. monocytogenes* cells well $^{-1}$ .

Assuming an exponential bacterial growth at a constant specific growth rate ( $\mu$ ) until the detection time,  $T_d$  is related to the lag time of the culture ( $lag$ ) by the following formula proposed by Baranyi and Pin (7):

$$T_d = lag + \frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu} \quad (1)$$

where  $N_d$  is the bacterial number at  $T_d$  and  $N_0$  the number of cells initiating growth in the considered well.

**Components of the variance of detection times.** In order to estimate the part of the variability of  $T_d$  explained by the variability of  $lag$ , we tried to estimate the components of the variance of  $T_d$ . From equation 1, we can write

$$\begin{aligned} Var(T_d) &= Var(lag) + Var\left(\frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu}\right) \\ &\quad + 2 \cdot Covar\left(lag, \frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu}\right) + \varepsilon \end{aligned} \quad (2)$$

where  $Covar\left(lag, \frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu}\right)$  is the covariance term and  $\varepsilon$  is an error term corresponding to the reading inaccuracy of the Bioscreen C reader. The Bioscreen C reading inaccuracy was assumed negligible.

When the initial number of cell  $N_0$  is high, we can assume that  $lag$  and  $N_0$  are independent (6), and then the term of covariance is negligible as  $N_d$ ,  $\mu$ , and  $lag$  are independent. In this case, equation 2 can be written

$$Var(T_d) \approx Var(lag) + Var\left(\frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu}\right) \quad (3)$$

Moreover we have

$$lag = \frac{K}{\mu} \quad (4)$$

where  $K$  is a constant quantifying the "physiological state" of the initial population (42); and then we have

$$Var(lag) = K^2 \cdot Var\left(\frac{1}{\mu}\right) \quad (5)$$

From an experiment carried out with a high inoculum of cells in the exponential

growth phase ( $3.3 \times 10^4$  cells well $^{-1}$  instead of 0.42), we estimated from viable count and OD curves (3) a maximum specific growth rate,  $\mu$ , of 0.90 h $^{-1}$  and a lag time,  $lag$ , of 0.32 h.  $K$  was found to be equal to 0.29. As  $K$  is greatly smaller than 1,

$$Var(lag) \ll Var\left(\frac{1}{\mu}\right) \quad (6)$$

Equation 3 becomes

$$Var(T_d) \approx Var\left(\frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu}\right) \quad (7)$$

The Taylor's series approximation allows us to write for two independent variables  $A$  and  $B$

$$Var(AB) \approx \bar{A}^2 Var(B) + \bar{B}^2 Var(A) \quad (8)$$

Therefore we have for a high initial number of cells

$$Var(T_d) \approx \left(\frac{1}{\bar{\mu}}\right)^2 [Var(\ln(N_d)) + Var(\ln(N_0))] + \overline{(\ln(N_d) - \ln(N_0))^2} Var\left(\frac{1}{\mu}\right) \quad (9)$$

It was checked experimentally that  $Var(T_d) = 0.007$ .  $N_d$  was found to correspond by viable count to a concentration of  $1.77 \times 10^7$  CFU well $^{-1}$ . Yet, it was not possible to identify precisely which part of the observed  $T_d$  is explained by the terms of equation 9. Indeed we had estimations of  $N_0$ ,  $N_d$ , and  $\mu$  from viable counts but no sufficiently reliable information on their variance. Nevertheless, we were able to estimate the maximum possible value of  $Var\left(\frac{1}{\mu}\right)$  and  $Var(\ln(N_d))$  from the experimental result.  $Var\left(\frac{1}{\mu}\right)$  is maximum if  $Var(\ln(N_d)) = Var(\ln(N_0)) = 0$ , so

$$Var\left(\frac{1}{\mu}\right) \leq \frac{0.007}{\ln(N_d) - \ln(N_0)^2} \approx 1.77 \cdot 10^{-4} \quad (10)$$

and  $Var(\ln(N_d))$  is maximum when  $Var(\ln(N_0)) = Var\left(\frac{1}{\mu}\right) = 0$ , so

$$Var(\ln(N_d)) \leq 0.007 \cdot \mu^2 \approx 0.005 \quad (11)$$

As the covariance term in equation 2 is negative, we have

$$\begin{aligned} Var(T_d) &\leq Var(lag) + \left(\frac{1}{\bar{\mu}}\right)^2 [Var(\ln(N_d)) + Var(\ln(N_0))] \\ &\quad + \overline{(\ln(N_d) - \ln(N_0))^2} Var\left(\frac{1}{\mu}\right) \end{aligned} \quad (12)$$

For experiments with single cells,  $N_0$  was assumed to follow a Poisson distribution with an average of 0.42 cells well $^{-1}$ . For the estimation of  $Var(\ln(N_0))$ , we used the positive values of the random samples generated by this distribution (10,000 iterations). It was found that  $Var(\ln(N_0)) \approx 0.0934$ .  $Var(\ln(N_d))$  and  $Var\left(\frac{1}{\mu}\right)$  were assumed to be independent of the inoculum's size and the initial physiological state. So, from the values previously obtained it was possible to estimate the minimum part of  $Var(T_d)$  explained by  $Var(lag)$  for experiments with single cells.

With equation 12 and our results we have

$$Var(lag) \geq Var(T_d) - 0.185 \quad (13)$$

**Standardization of the datasets.** As we aimed at characterizing the statistical distribution of  $T_d$  values, the datasets of replicates needed to be cumulated and their standardization was necessary. The standardization was carried out in two steps in order to correct the sources of variability between experiments (VarBE). VarBE has two sources of variability: the variability between experiments due to the differences in the conditions of growth VarBE<sub>1</sub> and the variability between experiments due to the reproducibility variability in the preparation of the stressed cells VarBE<sub>2</sub>. VarBE was estimated through the variance of means of  $T_d$  in replicates.

**Standardization to correct VarBE<sub>1</sub>.** For wells inoculated with stressed cells, the mean and the variance of  $T_d$  values were very dependent on extreme values in a data set. So, the impact of growth conditions was corrected by using  $T_d$  values of the wells inoculated with cells in the exponential growth phase, in-

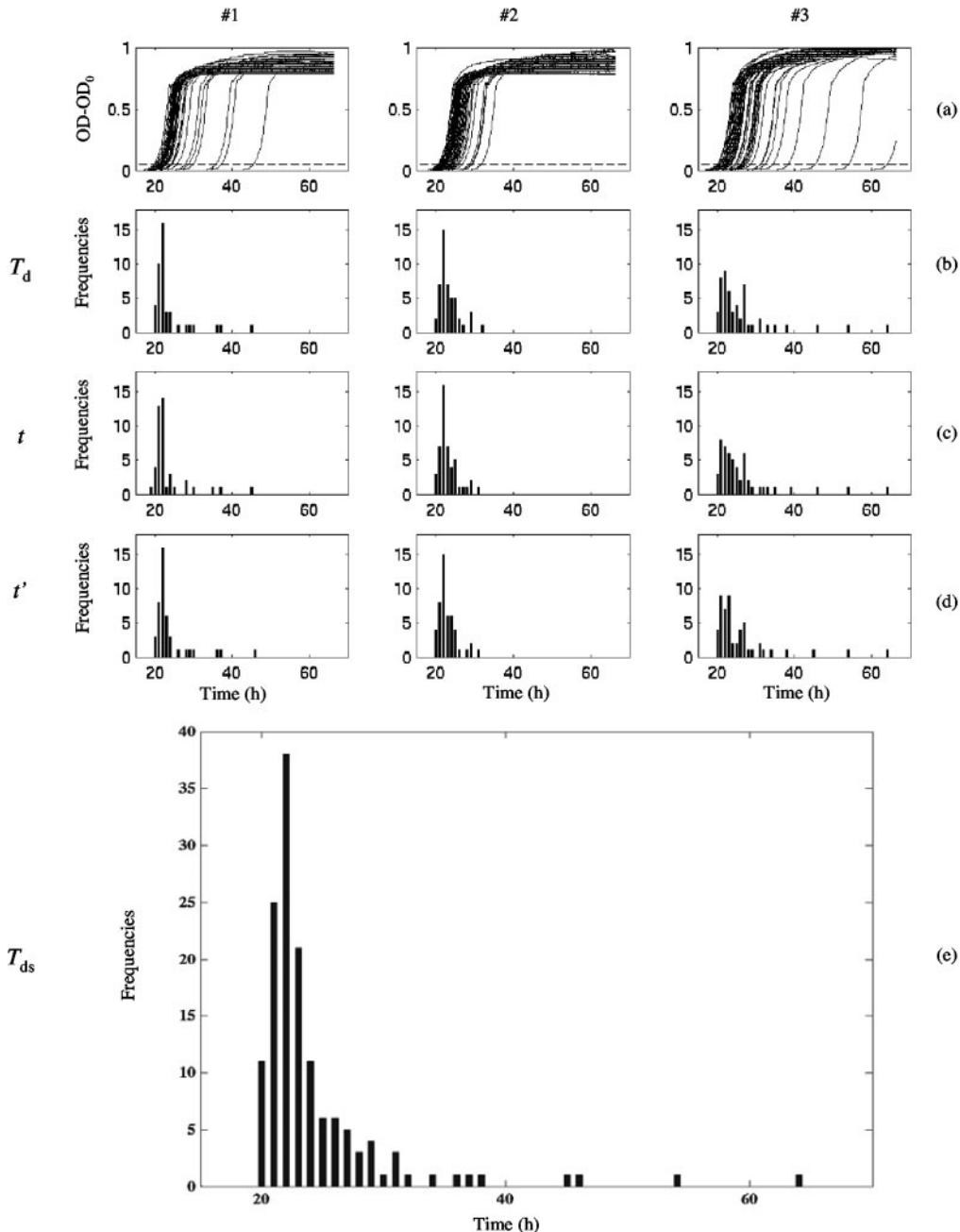


FIG. 1. Standardization steps of detection time values for the three datasets (#1, #2, and #3) of *L. monocytogenes* cells stressed by chlorine. (a) Optical density growth curves at 600 nm (OD-OD<sub>0</sub>) in TSBY at 30°C of the wells showing growth. Dashed line: limit of detection (OD<sub>0</sub> + 0.05). (b) Histogram of observed detection times ( $T_d$ ) issued from OD growth curves. (c) Histogram of transformed detection times after the first step of standardization ( $t$ ). (d) Histogram of transformed detection times after the second step of standardization ( $t'$ ). (e) Histogram of the cumulated values of  $t'$  of the three datasets ( $T_{ds}$ ).

cluded in the same plate. It consisted of a transformation of the  $T_d$  values by centering the mean of each data set for the cell in the exponential growth phase.

$$t_{ij} = T_{d,ij} - (T_{ex,\cdot j} - T_{ex,\dots}) \quad (14)$$

where  $t_{ij}$  is the standardized value of  $T_{d,ij}$ , the  $i$ th value of  $T_d$  for the  $j$ th experiment;  $T_{ex,\cdot j}$  is the mean of  $T_d$  values of the wells inoculated with cells in the exponential growth phase of the  $j$ th experiment; and  $T_{ex,\dots}$  is the mean of  $T_{ex,\cdot}$ .

**Standardization to correct VarBE<sub>2</sub>.** A second step was proposed for the standardization of  $T_d$  values for wells inoculated with stressed cells. This step

aimed at correcting the heterogeneity between experiments of the preparation of the stressed cells. This step was carried out by using the 5th percentile of the distribution of  $t_{ij}$  values. Indeed, the 5th percentile was preferred to the mean, which is too much dependent on extreme values, particularly when datasets are small.

$$t'_{ij} = t_{ij} - (t_{5j} - t_5) \quad (15)$$

where  $t'_{ij}$  is the standardized value of  $t_{ij}$  (equation 14),  $t_{5j}$  is the 5th percentile of  $t_{ij}$  values of the  $j$ th experiment, and  $t_5$  is the mean of  $t_{5j}$ .

An example of the standardization process is shown in Fig. 1.

TABLE 1. Means and variances of observed ( $T_d$ ) and standardized ( $T_{ds}$ ) detection times of single cells of *L. monocytogenes* in different physiological states

Physiological state	No. of values	$T_d$		$T_{ds}$			Var(lag)/Var( $T_{ds}$ ) (%) <sup>a</sup>
		Mean (h)	Var( $T_d$ ) (h <sup>2</sup> )	Mean (h)	Var( $T_{ds}$ ) (h <sup>2</sup> )	Var(lag) (h <sup>2</sup> )	
Exponential growth phase	544	18.41	0.385	18.50	0.208	0.023	11.1
HCl	92	20.43	1.219	20.45	1.211	1.026	84.7
Cold	109	21.16	12.385	21.13	12.412	12.227	98.5
Lactic acid	108	23.91	7.372	22.74	7.320	7.135	97.5
Chlorine	143	24.38	36.173	24.30	36.001	35.816	99.5
NaOH	137	25.50	13.244	25.52	13.110	12.925	98.6
NaCl	108	26.05	36.149	26.23	34.762	34.577	99.5
Starvation	84	26.37	28.083	26.84	27.112	26.927	99.3
BAC	170	30.06	75.805	30.51	73.916	73.731	99.7
Heat	89	33.59	39.132	34.48	38.103	37.918	99.5

<sup>a</sup> Minimum percentage of the variance explained by individual lag time variability as Var(lag)  $\geq$  Var( $T_d$ ) - 0.185 h<sup>2</sup>.

**Fitting data.** The standardized detection times ( $T_{ds}$ ),  $t$  for cells in the exponential growth phase and  $t'$  for stressed cells, were fitted to various parametric distributions using Regress+ (version 2.5.1 by Michael P. McLaughlin; [http://www.causaScientia.org/software/Regress\\_plus.html](http://www.causaScientia.org/software/Regress_plus.html)) or the nlinfit subroutine of MATLAB software (version 6.5.1; The Math Works Inc., Natick, MA). The cumulative distribution functions were issued from Regress+. The log-likelihood criterion was chosen to select the theoretical distribution functions fitting the best observed  $T_{ds}$  distributions. Quantile-quantile plots were also edited to check visually the goodness of fit of  $T_{ds}$  distributions.

## RESULTS

**Detection time distribution for *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase.** Taking into account the components of the variance of  $T_d$  allowed us to say that only 11% of the observed variability is explained by the lag time variability (Table 1). An extreme value type I distribution (or extreme value distribution with an upper bound) was fitted to the 544 values of  $T_{ds}$  obtained from 37 datasets (Fig. 2).

**Influence of the stresses on detection time distributions.** Using the standardization method for  $T_d$  values of stressed cells makes it possible to take into account the variance between experiments and to group datasets. Table 1 depicts the means and variances of  $T_d$  before and after standardization. The results of the standardization support the conclusion that the observed variability was mainly explained by individual lag time variability. No effect of the physiological state of the cells was noticed on the growth rate. The distributions of detection times revealed the importance of the increase of lag time for stressed *L. monocytogenes* cells. By using the mean of  $T_{ds}$  to compare the impacts of the nine stresses, the following classification was obtained (ascending impact): HCl, cold, lactic acid, chlorine, NaOH, NaCl, starvation, BAC, and heat. Undoubtedly BAC and heat stresses had the greatest impact on the lag time duration in our experimental conditions. The mean of  $T_{ds}$  was multiplied by 1.65 for BAC stress and by 1.87 for heat stress in comparison with the mean of  $T_{ds}$  values for cells in the exponential growth phase. On the other hand, acid and cold stresses didn't seem to have the same influence and the mean was multiplied by a factor of 1.1.

The distributions of detection times revealed the importance of the increase of cellular variability for stressed *L. monocytogenes* cells. Variance was also used to compare the impacts of the nine stresses applied. By using this parameter, the following classification was obtained (ascending impact): HCl, lactic

acid, cold, NaOH, starvation, NaCl, chlorine, heat, and BAC. For example, the variance of  $T_{ds}$  for *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase was multiplied by 355 compared to wells inoculated with BAC-stressed cells. The mineral acid stress, which had the smaller impact on the mean of detection times, generated a multiplication of the variance by 6.

Figure 3 shows that the cumulative distribution of  $T_{ds}$  values turns into heterogeneous shapes. Theoretical distributions have been fitted to  $T_{ds}$  values. Six different theoretical distributions were found (Table 2) for the nine stresses. Figure 4 clearly reveals that they fit well the  $T_{ds}$  distributions. Extreme value type II distribution was fitted for acids, alkali, and chlorine stresses, a gamma distribution for starvation stress, and a Weibull distribution for heat-stressed cells. For cold and BAC stresses, bimodal distributions were found to be suitable to fit  $T_{ds}$ . There is no a priori reason to choose a bimodal distribution for cold-stressed *L. monocytogenes* cells, but the presence of a few (10%) cells with very long detection times (Fig. 3 and Fig. 4) suggests that a mixture of two distributions might be acceptable.

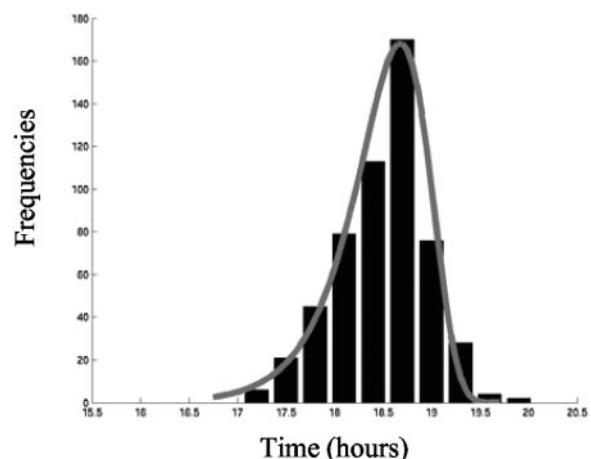


FIG. 2. Observed and fitted density distributions of the standardized detection times  $T_{ds}$  (in hours) of wells inoculated with *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase. Continuous curve: fitted extreme value type I distribution (cumulative density function and parameters in Table 2). Histogram: observed frequencies of  $T_{ds}$ .

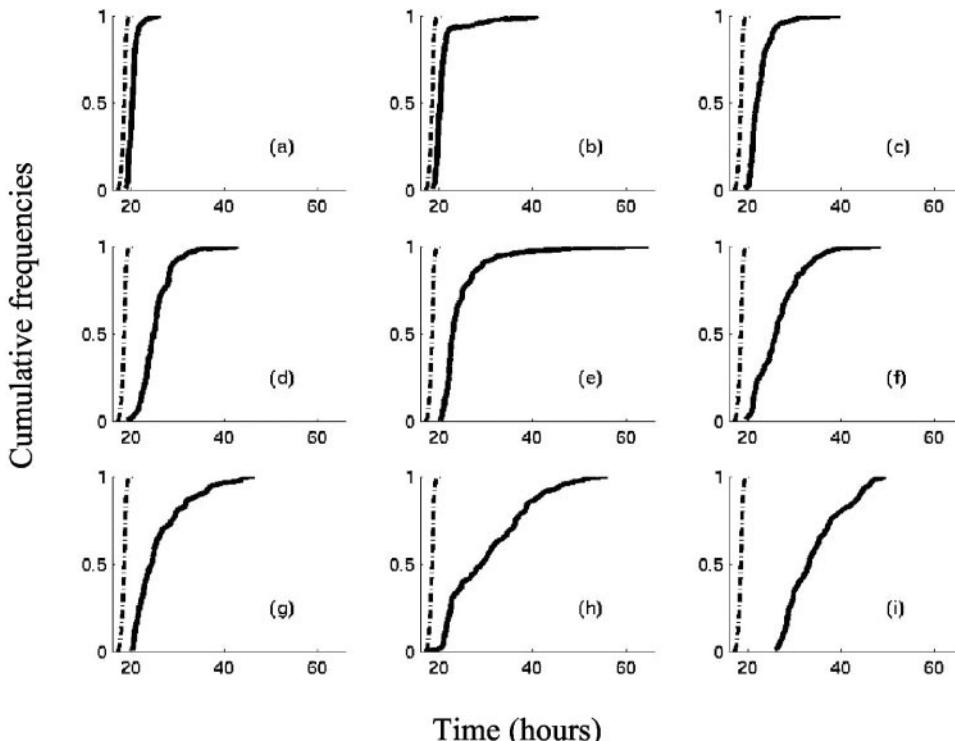


FIG. 3. Observed cumulative distributions of the standardized detection times of *L. monocytogenes* in TSBye at 30°C. Dashed line: cumulative distribution of  $T_{ds}$  (in hours) for wells inoculated with cells in the exponential growth phase. Continuous curves: cumulative distributions of observed  $T_{ds}$  for wells inoculated with cells previously stressed by (a) HCl, (b) cold, (c) lactic acid, (d) NaOH, (e) chlorine, (f) starvation, (g) NaCl, (h) BAC, and (i) heat.

## DISCUSSION

The aim of this study was to compare the impacts of nine different stresses on the individual lag times of *L. monocytogenes*. A small number of previous studies have sought to examine this phenomenon of the historical impact of stress on individual lag times; furthermore, they have essentially concerned one stress (4, 33, 34). By using a similar physiological parameter, the loss of cultivability, for each stress, we succeeded in classifying the impacts of nine different stresses on the individual lag time distributions.

After observation of the sources of variability of detection times (Table 2), it can be advanced that the method of turbidity detection times produced by single cells is suitable to characterize lag time distributions of stressed cells. With a maximum of 35% of positive wells on the microplates, it can be asserted that the probability of having more than one cell in the wells did not have a deep impact on the distributions (Table 2). The observed variability cannot be explained by the presence of more than two cells in the same well. Indeed by choosing a maximum of 35% of positive wells, this results in an 80% probability of having a single cell. Other authors used an inoculation level resulting in a 70% probability of having a single cell, for Robinson et al. (27), and a 60% probability, for Métris et al. (23).

The presence of cells in the exponential growth phase on the same microplates with stressed cells allowed us to correct the variability between experiments due to the differences in the conditions of growth. For the same loss of cultivability on

TSAYe, the mean of  $T_{ds}$  was multiplied by a factor between 1.1 and 1.87. Heat and BAC stresses induced the greatest increase of the mean of  $T_{ds}$  (Fig. 5). After observation of the variances of  $T_{ds}$  (Table 1), the nine stresses can be classified in four groups. The first includes HCl stress, which has the weakest impact on the total variance of  $T_{ds}$ . The second group is composed of lactic acid, NaOH, and cold stresses; their variance of  $T_{ds}$  is approximately 30 times more important than the variance of  $T_{ds}$  for cells in the exponential growth phase. Starvation, NaCl, and chlorine stresses form the third group. The factor of multiplication of the variance of  $T_{ds}$  for cells in the exponential growth phase is 140 for this group. The last group is composed of heat and BAC stresses. For this last group the variance of  $T_{ds}$  is multiplied by 180 and 355, respectively, in comparison to the variance of  $T_{ds}$  for cells in the exponential growth phase.

With about 100 standardized data issued from at least three replicates, we obtained suitable distributions. Regarding the variability of lag time presented here, it can be noticed that 100 values are often enough to precisely characterize a distribution, but when the variability becomes high, more than 100 values should be obtained. That was the case with BAC stress and its high variance of detection time values (Table 1).

With cells subjected to nine different stresses and cells in the exponential growth phase, we obtained seven different shapes of distribution of detection times. The distributions fitted were strongly adjusted to data (Fig. 4).

In our study, the distribution of detection times for inocu-

TABLE 2. Theoretical distributions fitted to standardized detection time values of *L. monocytogenes*<sup>a</sup>

Physiological state	Distribution	Cumulative density function	Parameters
Exponential growth phase	Extreme value type I	$1 - \exp(-\exp((y - a)/b))$	$a = 18.678$ (18.674, 18.682) $b = 0.372$ (0.367, 0.376)
HCl	Extreme value type II	$\exp(-((y - a)/b)^{-c})$	$a = 14.02$ (-49.2, 17.80) $b = 5.95$ (2.13, 60.70) $c = 8.74$ (3.38, 100)
Cold	Mixture of normal and Laplace	$p \cdot \Phi((y - a)/b) + (1 - p) \cdot \text{stdLaplaceCDF}(y - c)/d$	$a = 20.26$ (20.11, 20.40) $b = 0.74$ (0.64, 0.85) $c = 30.39$ (26.06, 35.18) $d = 4.52$ (1.69, 7.76) $p = 0.92$ (0.87, 0.97)
Lactic acid	Extreme value type II	$\exp(-((y - a)/b)^{-c})$	$a = 15.13$ (8.61, 18.30) $b = 6.42$ (3.11, 13.10) $c = 4.80$ (2.49, 9.71)
Chlorine	Extreme value type II	$\exp(-((y - a)/b)^{-c})$	$a = 18.02$ (16.41, 19.06) $b = 3.80$ (2.64, 5.59) $c = 2.15$ (1.52, 3.10)
NaOH	Extreme value type II	$\exp(-((y - a)/b)^{-c})$	$a = -29.54$ (-252.61, 106.88) $b = 53.47$ (12.80, 276.65) $c = 21.03$ (4.72, 100.00)
NaCl	Exponential	$1 - \exp((a - y)/b)$	$a = 20.31$ (20.31, 20.31) $b = 5.95$ (4.87, 7.09)
Starvation	Gamma	$\Gamma(c, (y - a)/b)$	$a = 19.49$ (18.96, 19.66) $b = 3.98$ (2.65, 5.60) $c = 1.93$ (1.21, 3.33)
BAC	Mixture of 2 normal	$p \cdot \Phi((y - a)/b) + (1 - p) \cdot \Phi((y - c)/d)$	$a = 21.89$ (21.16, 22.15) $b = 0.78$ (0.56, 1.04) $c = 33.99$ (32.49, 35.60) $d = 7.75$ (6.61, 8.78) $p = 0.29$ (0.19, 0.39)
Heat	Weibull	$1 - \exp(-((y - a)/b)^a)$	$a = 25.86$ (25.63, 25.91) $b = 9.45$ (8.02, 10.03) $c = 1.41$ (1.13, 1.76)

<sup>a</sup> For the cumulative density function,  $\Phi(x)$  is the standard cumulative normal distribution,  $\text{stdLaplaceCDF}(z)$  is the standard cumulative Laplace distribution, and  $\Gamma(w, x)$  is the incomplete gamma function. For the parameters, the 95% confidence limits are in parentheses.

lated single cells in the exponential growth phase is skewed on the left. That is not in agreement with the results of Wu et al. (40), who fitted a normal distribution to individual lag times of cells in the exponential growth phase. However, their 40 values are insufficient to properly characterize a distribution. Smelt et al. (33) also used cells in the exponential growth phase (*Lactobacillus plantarum*), and their detection time values followed, as our results, a left-skewed extreme value distribution. However, as we focused on the sources of variances of detection times for cells in the exponential growth phase (Table 1), it is obvious that the variance of individual lag times is not the main source of variability and their distribution cannot be reached.

The gamma distribution that we obtained (Table 2) for starved *L. monocytogenes* cells confirmed the findings of Métris et al. (23) who also fitted a gamma distribution to *Listeria innocua* cells issued from a stationary-phase culture. These cells can be considered as undergoing a starvation stress and thus it should be considered that individual lag times for starved cells of the main strains of *Listeria* may be gamma distributed.

For the three stresses involving a modification of pH (both acid and alkali stresses), the same distribution was fitted on the standardized detection times: the extreme value type II distribution. More generally, for the nine stresses presented in our communication, right-skewed distributions were obtained like Smelt et al. and Stephens et al. (33, 34) obtained with heat-injured *Salmonella* and *L. plantarum*.

Contrary to the findings of Métris et al. (23) who found a good linear correlation relationship ( $r^2 = 0.94$ ) between the means and the standard deviations of the detection time values by studying the effect of environmental growth conditions, the linear correlation between the means and the standard deviations was weak ( $r^2 = 0.68$ ) in our experiments (Fig. 5). The coefficient of variation of detection times for Métris et al. (23) rose from 5 to 10% as the growth conditions became less favorable. Treatments, which generated bacterial stress, appeared to have more influence on the variability of individual lag times than the growth conditions. Indeed, the coefficient of

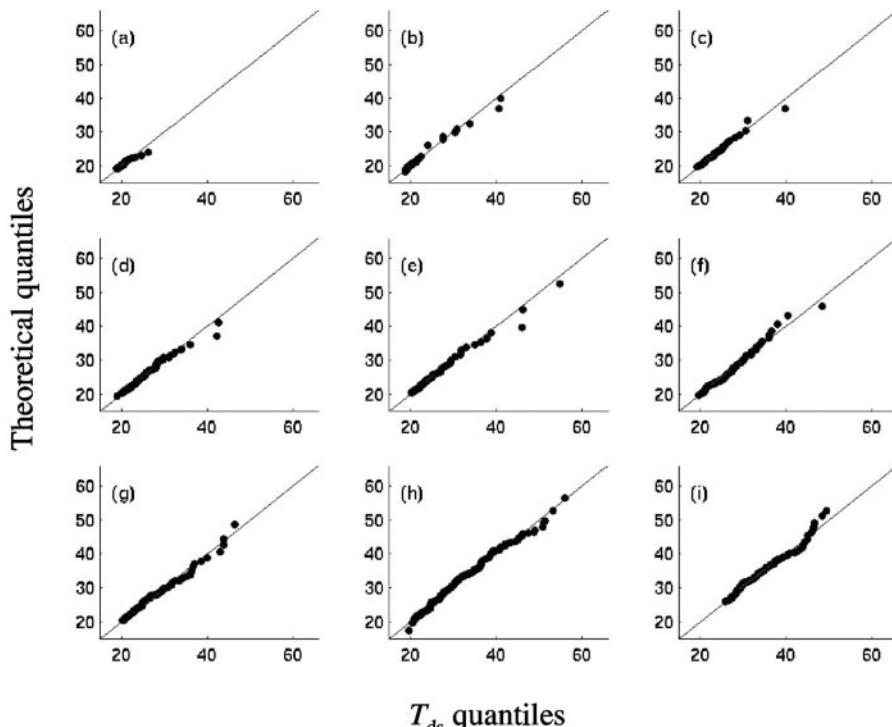


FIG. 4. Quantile-quantile plots of the sample quantiles of the standardized detection times ( $T_{ds}$ ) versus theoretical quantiles from the fitted distributions for *L. monocytogenes* cells stressed by (a) HCl, (b) cold, (c) lactic acid, (d) NaOH, (e) chlorine, (f) starvation, (g) NaCl, (h) BAC, and (i) heat.

variation of detection times in our study was between 5 and 28% for stressed cells.

The variability of lag times presented in this study confirms the findings of other fields of microbiology. Indeed, marked heterogeneity occurs between individual cells within a clonal population. Such heterogeneity has already been revealed in almost any phenotype which is determinable at the single cell

level, e.g., in the intracellular pH (13, 25, 31) or cell morphology (15, 16, 30, 36).

Because there are so many factors having an influence on the individual lag behavior (35), accurate physiological explanations of lag time heterogeneity are very difficult to obtain. An important general working hypothesis, formulated by Robinson et al. (26), states that lag is determined by two (hypo-

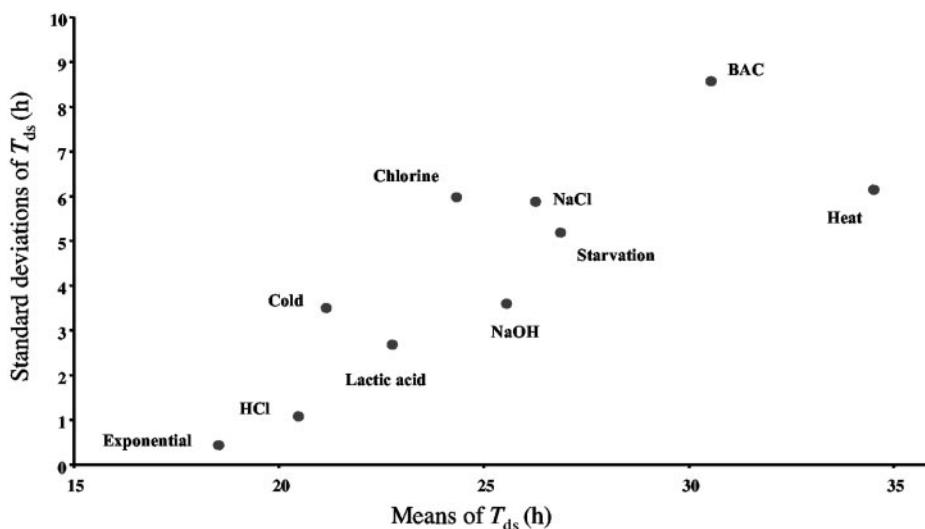


FIG. 5. Standard deviations versus mean values of the standardized detection time ( $T_{ds}$ ) distributions of *L. monocytogenes* cells for all the studied stresses.

theoretical) quantities. The first quantity is the amount of work the cell has to perform to recover a physiological state that allows the cell to multiply. For example, Hornbaek et al. (19) observed a trimodal intracellular pH cell distribution for *Bacillus licheniformis*. The capacity to multiply being correlated to intracellular pH, they revealed that the subpopulation of cells exhibiting lower intracellular pH had significantly longer lag phases than populations of cells having higher intracellular pH. The second quantity is the rate at which the cell can perform that work. The rate may be identified in case of stress with metabolic processes of repair systems (21). These processes vary with the nature of the stress and involve the synthesis of ATP, RNA, and DNA (10). As these mechanisms of repair were present in low abundance, Booth (9) proposed that their concentration in the cells would follow stochastic processes leading to their Poissonian distribution. Such an imbalance in the cells could generate a different rate for cells having the same work to do to recover the capacity of growth.

This research sought to evaluate and classify the impacts of stresses on individual lag time distribution of *L. monocytogenes*. The results of this study give information on the consequences of food processing on *L. monocytogenes* lag time. As we have shown, lag time distribution is dependent on the stress undergone by the cell. It results in an increased variability of lag times and in their particular distribution. Increased understanding of the individual behaviors after stress and the factors that affect them will contribute to the development of improved predictive models. These results reinforce the need to move about a stochastic approach of bacterial growth, especially when predictive microbiology is used for assessing the exposure to microbiological hazards (8). In the future we will focus on the study of the individual lag time variability by applying successive stresses corresponding to food processing events in order to optimize the evaluation of processing methods with respect to bacteriological safety and the quality of the food.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Ministères de la Recherche et de l'Agriculture (convention R02/04 programme Aliment-Qualité-Sécurité) and belongs to the French national program for predictive microbiology Sym'Previus.

L. Guillier is a recipient of a doctoral fellowship from Arilait-Recherches and the Association Nationale de la Recherche Technique.

#### REFERENCES

- Anonymous.** 2003. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. [Online.] <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>.
- Anonymous.** 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, MRA series 4 & 5. [Online.] [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra\\_listeria/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_listeria/en/).
- Augustin, J. C., L. Rosso, and V. Carlier.** 1999. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods* **38**:137–146.
- Augustin, J. C., A. B. Delattre, L. Rosso, and V. Carlier.** 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1706–1710.
- Augustin, J. C., and V. Carlier.** 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **56**:29–51.
- Baranyi, J.** 1998. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *J. Theor. Biol.* **192**:403–408.
- Baranyi, J., and C. Pin.** 1999. Estimating growth parameters by means of detection times. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:732–736.
- Baranyi, J., and C. Pin.** 2004. Modeling the history effect on microbial growth and survival: deterministic and stochastic approaches, p. 285–302. In R. C. McKellar and X. Lu (ed.), *Modeling microbial responses in food*. CRC series in contemporary food science. CRC, Washington, D.C.
- Booth, I. R.** 2002. Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int. J. Food Microbiol.* **78**:19–30.
- Bozoglu, F., H. Alpas, and G. Kaledunç.** 2004. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**:243–247.
- Bréand, S., G. Fardel, J. P. Flandrois, L. Rosso, and R. Tomassone.** 1997. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. *Int. J. Food Microbiol.* **38**:157–167.
- Bréand, S., G. Fardel, J. P. Flandrois, L. Rosso, and R. Tomassone.** 1999. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **46**:251–261.
- Budde, B. B., and M. Jakobsen.** 2000. Real-time measurements of the interaction between single cells of *Listeria monocytogenes* and nisin on a solid surface. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3586–3591.
- Davey, K. R.** 1991. Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:253–257.
- Dykes, G. A.** 1999. Physical and metabolic causes of sub-lethal damage in *Listeria monocytogenes* after long-term chilled storage at 4 degrees C. *J. Appl. Microbiol.* **87**:915–922.
- El-Kest, S. E., and E. H. Marth.** 1992. Transmission electron microscopy of unfrozen and frozen/thawed cell of *Listeria monocytogenes* treated with lipase and lysozyme. *J. Food Prot.* **55**:687–696.
- Farber, J. M., and P. I. Pertenskins.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**:476–511.
- Francois, K., F. Devlieghere, A. R. Standaert, A. H. Geeraerd, J. F. Van Impe, and J. Debevere.** 2003. Modelling the individual lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**:26–30.
- Hornbaek, T., J. Dynesen, and M. Jakobsen.** 2002. Use of fluorescence ratio imaging microscopy and flow cytometry for estimation of cell vitality for *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**:261–265.
- McKellar, R. C.** 1997. A heterogenous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* **36**:179–186.
- McKellar, R. C., and X. Lu.** 2004. Primary models, p. 21–62. In R. C. McKellar and X. Lu (ed.), *Modeling microbial responses in food*. CRC series in contemporary food science. CRC, Washington, D.C.
- McMeekin, T.** 2004. An essay on the unrealized potential of predictive microbiology, p. 321–336. In R. C. McKellar and X. Lu (ed.), *Modeling microbial responses in food*. CRC series in contemporary food science. CRC, Washington, D.C.
- Métris, A., S. M. George, M. W. Peck, and J. Baranyi.** 2003. Distribution of turbidity detection times generated by single cell-generated bacterial populations. *J. Microbiol. Methods* **55**:821–827.
- Pascual, C., T. P. Robinson, M. J. Ocio, O. O. Aboaba, and B. M. McKey.** 2001. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**:357–361.
- Rechinger, K. B., and H. Siegumfeldt.** 2002. Rapid assessment of cell viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by measurement of intracellular pH in individual cells using fluorescence ratio imaging microscopy. *Int. J. Food Microbiol.* **75**:53–60.
- Robinson, T. P., M. J. Ocio, A. Kaloti, and B. M. McKey.** 1998. The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **44**:83–92.
- Robinson, T. P., M. J. Ocio, A. Kaloti, and B. M. McKey.** 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **70**:163–173.
- Ross, T., and T. A. McMeekin.** 1994. Predictive microbiology: review paper. *Int. J. Food Microbiol.* **23**:241–264.
- Ross, T., and P. Dalgaard.** 2004. Secondary models, p. 63–150. In R. C. McKellar and X. Lu (ed.), *Modeling microbial responses in food*. CRC series in contemporary food science. CRC, Washington, D.C.
- Rowan, N. J., and J. G. Anderson.** 1998. Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2065–2071.
- Siegumfeldt, H., K. B. Rechinger, and M. Jakobsen.** 1999. Use of fluorescence ratio imaging for intracellular pH determination of individual bacterial cells in mixed cultures. *Microbiology* **145**:1703–1709.
- Skinner, G. E., J. W. Larkin, and E. J. Rhodhamel.** 1994. Mathematical modelling of microbial growth: a review. *J. Food Safety* **14**:175–217.
- Smelt, J. P. P. M., G. D. Otten, and A. P. Bos.** 2002. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* **73**:207–212.
- Stephens, P. J., J. A. Joyson, K. W. Davies, R. Holbrook, H. M. Lappin-Scott, and T. J. Humphrey.** 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J. Appl. Microbiol.* **83**:445–455.

35. Swinnen, I. A. M., K. Bernaerts, E. J. J. Dens, A. H. Geeraerd, and J. F. Van Impe. 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **96**:137–159.
36. Tholozan, J. L., J. M. Cappelier, J. P. Tissier, G. Delattre, and M. Federighi. 1999. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1110–1116.
37. Walls, I., and V. N. Scott. 1997. Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **60**: 1142–1145.
38. Whiting, R. C. 1995. Microbial modelling in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**:467–494.
39. Whiting, R. C., and L. K. Bagi. 2002. Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **73**:291–295.
40. Wu, Y., M. W. Griffith, and R. C. McKellar. 2000. A comparison of the Bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of individual cells of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**:468–472.
41. Zwietering, M. H., J. T. De Koos, B. E. Hasenack, J. C. de Wit, and K. van't Riet. 1991. Modeling bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1094–1101.
42. Zwietering, M. H., H. G. A. M. Cuppers, J. C. de Wit, and K. van't Riet. 1994. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:195–203.



## I.2. Données complémentaires à l'article 3

Dans l'article 3 sont uniquement présentées les distributions de temps de détection. À l'aide de la méthode développée dans la partie B de détermination des temps de latence à partir des temps de détection, nous avons estimé les distributions cumulatives des temps de latence correspondantes aux neuf états physiologiques (Figure 7). Les résultats des temps de détection présentés dans la publication soulignent l'impact de l'état physiologique sur les latences. En utilisant les temps de latence cellulaires les résultats de la publication sont encore plus explicites. À titre d'exemple, on peut noter un rapport de 8 entre la moyenne des temps de latence cellulaires pour le stress HCl et pour le stress chaud, ces deux stress représentant les stress ayant respectivement le moins et le plus d'impact sur la moyenne des *lag*. De la même façon, si on s'intéresse au rapport des écarts types des stress HCl et BAC, égal à 8, on comprend tout l'intérêt de prendre en compte l'état physiologique pour la modélisation des latences individuelles.

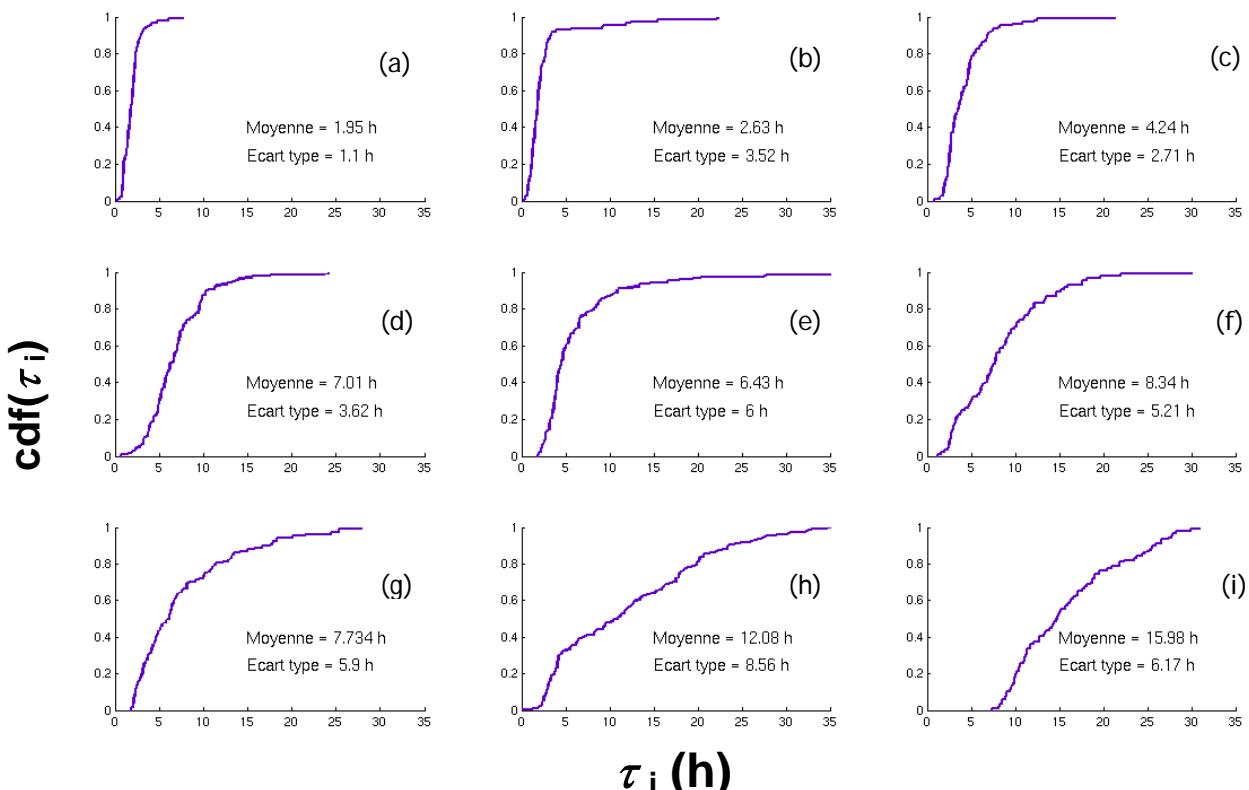


Figure 7. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires observés de *L. monocytogenes* dans du TSBye à 30°C pour des cellules ayant subi le stress (a) HCl, (b) froid, (c) acide lactique, (d) NaOH, (e) hypochlorite, (f) nutritionnel, (g) NaCl, (h) BAC, (i) chaud.

## II. Distributions des temps de latences cellulaires pour les autres stress

Pour les 13 autres états physiologiques, nous avons déterminé les distributions des temps de latence cellulaires par le même procédé (mesure de DO avec le Bioscreen C) et par la même méthode de standardisation des jeux de données de temps de détection. L'ensemble des résultats est reporté sur la Figure 8.

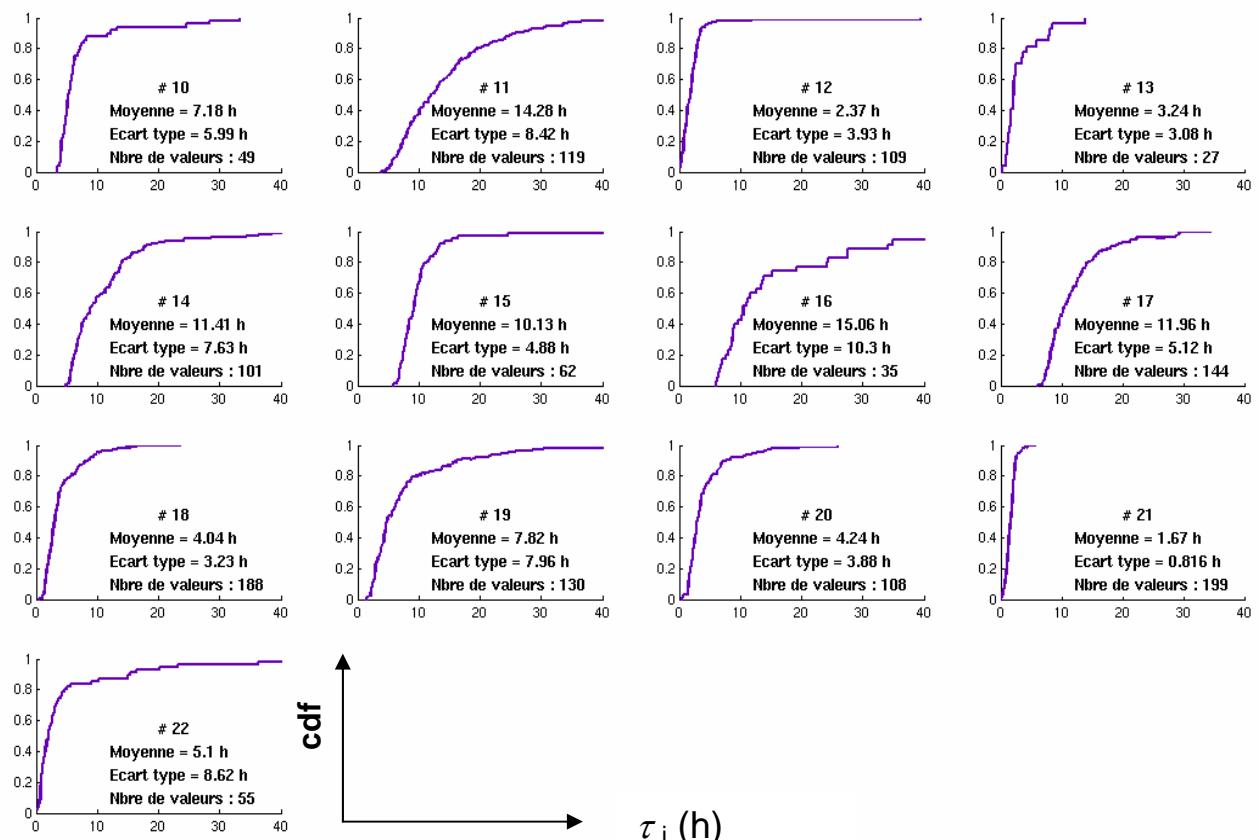


Figure 8. Distributions cumulatives des temps de latence cellulaires observés de *L. monocytogenes* dans du TSBY à 30°C pour les états physiologiques #9 à #22 (confère Tableau 10).

L'effet du temps d'exposition à un stress et de la température à laquelle ce dernier est réalisé joue sur les temps de latence cellulaires. Par exemple, l'effet du doublement du temps d'exposition des cellules de *L. monocytogenes* au stress NaCl (état physiologique #11) entraîne un quasi doublement de la moyenne des temps de latence cellulaires. En revanche, l'écart type n'augmente que de 40%. L'augmentation moyenne des temps de latence s'explique par les dommages plus importants subis par les cellules et donc un « travail » plus important à accomplir. Cet effet de l'allongement de la durée du stress sur les temps de latences cellulaires est cependant très peu perceptible pour les cellules exposées au stress froid pendant 1 an (état physiologique #13). Le

changement de la température d'application (de 25°C à 15°C) du stress NaCl entraîne d'une part une perte de viabilité moins importante (confère A.III.2.3), mais aussi des temps de latence individuelle plus courts et moins variables (Figure 8).

L'effet de l'intensité du stress joue également un rôle sur les temps de latence individuelle. Par exemple, les cellules exposées à pH 4.4 au lieu de 4.6 pour une température et une perte de viabilité équivalente (d'environ  $1.5 \log_{10} \text{ufc ml}^{-1}$ ) présentent des temps de latence plus longs et plus variables.

Par conséquent, si l'on veut modéliser l'impact d'un stress sur les distributions des latences individuelles des cellules survivantes, il faudrait tenir compte de l'intensité de ce stress, de son temps d'application et des paramètres environnementaux associés aux conditions stressantes.

L'analyse des quatre successions de stress suggère que les temps de latence des cellules exposées à deux stress successifs ne sont pas équivalents à la somme des effets de ces deux stress. Par exemple pour la succession du stress nutritionnel et du stress chaud (#14), la moyenne des temps de latence des cellules survivantes est comprise entre les deux moyennes des stress pris individuellement. Par contre pour la succession stress nutritionnel suivi du stress NaCl (#15), il semble qu'il existe un cumul des dommages puisque la moyenne des temps de latence cellulaires est plus élevée que ces deux stress pris individuellement.

La complexité des phénomènes physiologiques s'exprime également pour les successions acide lactique 8h - NaCl (#17) et NaCl – acide lactique 8h (#16). Pour ces deux successions, les stress subis sont équivalents mais appliqués dans un ordre inverse. La conséquence sur les temps de latence cellulaires est cependant très différente (Figure 8). On observe que l'écart type des temps de latence est deux fois plus grand pour l'état physiologique #16 que pour l'état physiologique #17.

Quatre des combinaisons de stress représentatives de scénarios de contamination lors de la fabrication du fromage ou du saumon fumé (S1, S3, S4 et S5) ont un impact modéré par rapport aux stress standardisés et à leurs associations. La combinaison S4 est celle qui a l'impact le plus fort sur les latences de toutes les combinaisons de stress industriels. Pourtant les trois dernières étapes du protocole de stress de cette combinaison sont communes à la combinaison S1. Cette observation souligne bien l'importance de prendre en compte toute l'histoire des cellules bactériennes et pas seulement le dernier environnement duquel elles sont issues.

En observant le lien entre perte de cultivabilité pendant les protocoles de stress et la distribution des temps de latence des cellules survivantes (Figure 9) il apparaît qu'il n'existe pas de lien entre ces deux variables.

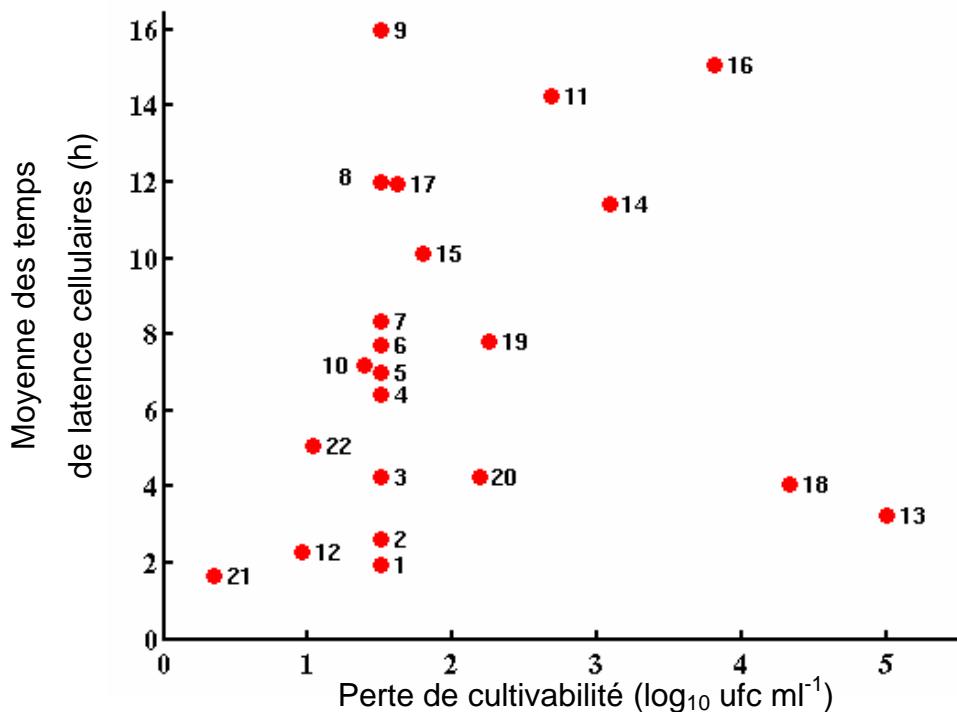


Figure 9. Moyenne des temps de latence cellulaires de cellules stressées en TSBY à 30°C en fonction des pertes de cultivabilité associées aux 22 stress (se reporter au Tableau 10 pour la correspondance entre les numéro et les états physiologiques).

L'étude de l'impact des 22 états physiologiques sur les temps de latence individuelle nous a donc permis de montrer qu'ils sont :

- dépendants de la durée d'application du stress
- dépendants de l'intensité de ce stress
- dépendants des autres paramètres environnementaux concomitants au stress
- dépendants de la totalité de l'histoire des cellules
- indépendants de la perte de cultivabilité

## **Chapitre D : Influence des conditions de re-croissance sur les distributions des temps de latence cellulaires et sur la proportion de cellules cultivables**

Pour trois des cinq combinaisons de stress industriels (S1, S4 et S5), nous avons évalué l'impact des conditions de croissance sur les distributions des temps de latences cellulaires. Le changement des conditions physico-chimiques du milieu d'accueil porte sur les paramètres écologiques classiques comme la température (30, 25, 20, 15 et 12°C), le pH (7, 6, 5.8 et 5.5) et l'activité de l'eau (0.997, 0.98, 0.977, 0.97). Pour les combinaisons S1 et S5 les distributions des temps de latence cellulaires ont été obtenues uniquement en milieu d'accueil liquide (TSBye). Pour la combinaison S4 les milieux liquide et solide ont été utilisés comme conditions d'accueil. En plus de l'objectif de compréhension de l'influence des paramètres environnementaux sur les distributions des temps de latence cellulaires est venue s'ajouter l'étude de la proportion de cellules cultivables en fonction de ces mêmes paramètres. En effet, au cours des expériences de détermination des temps de latence cellulaires pour des conditions plus défavorables que la condition d'accueil de référence (TSBye à 30°C, aw 0.997, pH 7), le nombre des cellules cultivables était systématiquement inférieur au nombre attendu.

Dans cette partie, sont donc présentés l'ensemble des résultats des distributions des temps de latence cellulaires mais aussi l'ensemble des proportions de cellules cultivables en fonction des conditions d'accueil testées (Tableau 10). En outre nous présentons une comparaison pour un état physiologique des temps de latence cellulaires déterminés dans des milieux liquide et solide avec des paramètres environnementaux équivalents.

### **I. Études en milieu liquide**

#### **I.1. Article 4**

Objectifs : Le but de cette publication est de montrer l'impact et l'importance des procédés de fabrication des fromages ou du saumon fumé sur les distributions des temps de latence cellulaires, et l'impact des conditions d'accueil sur ces distributions et sur la proportion de cellules cultivables.

Méthodes et résultats : Des cellules de *L. monocytogenes* ont été exposées à des conditions physico-chimiques et pendant des durées similaires aux procédés de fabrication des deux produits alimentaires. Les temps de latence ont été déterminés par turbidimétrie par la méthode décrite dans

les chapitres C (standardisation des jeux de données) et B (estimations des temps de latence cellulaires à partir des temps de détection). En regroupant les données des deux combinaisons de stress dans les différentes conditions d'accueil une relation linéaire a été observée entre l'écart type et la moyenne des temps de latence cellulaires. Aucune tentative de modélisation des distributions des temps de latence cellulaires n'est présentée dans cet article.

Dans cette publication, la méthode de détermination de la proportion de cellules cultivables est également décrite. Cette méthode est basée sur la proportion de puits turbides de microplaques. La concentration en cellules cultivables est reliée à cette proportion de puits. Nous avons observé que la proportion de cellules cultivables diminuait quand les conditions étaient moins favorables (baisse du pH et/ou de l'aw).

**Conclusion :** Ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte l'état physiologique des cellules dans l'analyse des risques de *L. monocytogenes* dans les aliments. Cette prise en compte de l'état physiologique peut passer par la reproduction des conditions environnementales lors de la contamination des produits alimentaires.

TITLE

**Influence of food processing and re-growth conditions on the individual cell lag times and growth probabilities of *Listeria monocytogenes***

AUTHORS

Laurent GUILLIER<sup>1,3</sup>, Hélène BERGIS<sup>2</sup>, Marie CORNU<sup>2</sup>, Jean-Christophe AUGUSTIN<sup>1</sup>

1 Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

2 Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, France

3 Arilait Recherches, Paris, France

RUNNING HEADLINE

Food processing impact on *lag*

CORRESPONDENCE TO

Jean-Christophe AUGUSTIN, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général de Gaulle F-94704 Maisons-Alfort, France. Tel: +33-1-4396-7043, fax: +33-1-4396-7121, e-mail: jcaugustin@vet-alfort.fr

## ABSTRACT

**Aims:** To evaluate the influence of food processing and re-growth conditions on the individual lag times and growth probabilities of *L. monocytogenes* cells.

**Methods and Results:** *L. monocytogenes* cells were subjected to successive stresses reproducing temperature, pH and inhibitor concentrations encountered during the processing of cheese and cold-smoked salmon. Individual lag times of these cells were estimated from the times to turbidity of wells inoculated with single cells in different re-growth conditions. A linear correlation was observed between the means and the standard deviations of individual lag times. The proportion of growing cells for each re-growth conditions was also determined using the proportion of microplate wells showing growth. The probability of growth decreased as re-growth conditions became less favourable.

**Conclusions:** These results emphasize the importance of taking into account the physiological state of the cells in the risk assessment of *L. monocytogenes* in food products.

**Significance and Impact of the Study:** Food processing have a great impact on the individual lag time distributions and on the growth probability of bacterial cells.

**Keywords:** bacterial stress, food processing, individual lag times, growth probabilities, stochastic modelling.

## INTRODUCTION

The individual-based approach of the behaviour of bacterial cells is increasingly applied in predictive microbiology. Indeed, the stochastic approach of the bacterial growth is essential as the contamination of food products with food borne pathogens, like *Listeria monocytogenes*, occurs with very few cells. Recently numerous works dealing with individual lag times have been published. In these studies, the collection of datasets of individual lag times were estimated either through indirect methods like optical density (OD) (Stephens *et al.*, 1997; Smelt *et al.*, 2002; Métris *et al.*, 2003; Francois *et al.*, 2005a and b; Guillier *et al.*, 2005a) and colony surface measurements (Guillier *et al.*, 2005b) or through direct observations of attached cells (Wu *et al.*, 2000; Elfwing *et al.*, 2004). Guillier *et al.* (2005a) and Elfwing *et al.* (2004) showed that the shape, the mean and the standard deviation of individual lag time distributions depend on the history of the cells. Thus, another stake in quantitative microbial risk assessment is to consider the physiological states of the cells that can contaminate food products.

Other studies have also revealed that the ability of *L. monocytogenes* to initiate growth is dependent on the physiological state of the cells and the size of the inoculum (Pascual *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 2001; McKellar *et al.*, 2002). Then, both the individual lag time distribution and the ability of growth within the cell population should be considered to quantify the risk level associated with the presence of *L. monocytogenes* in food products.

The objective of this study was to characterize the individual cell lag times of *L. monocytogenes* and to quantify the proportion of cells able to initiate growth in different re-growth conditions for cells previously subjected to two situations reproducing conditions encountered during the contamination of cheese and cold-smoked salmon.

## MATERIAL AND METHODS

### Bacterial strain and growth conditions

*Listeria monocytogenes* 14, a reference strain of the French program in predictive microbiology Sym'Previus, was used. Prior to each experiment, a culture was incubated at 30°C for 24 hours in tryptone soy a broth (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK) supplemented with 0.6 % yeast extract (AES Laboratoire, Combourg, France) (TSBye). The first bacterial culture was diluted as needed in TSBye, to obtain an initial bacterial suspension of approximately  $10^3$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . This diluted culture was further incubated in TSBye for 20 hours at 25°C to obtain cells in the exponential growth phase at a concentration of approximately  $10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$ .

### Stress experiments

The two successions of stresses were chosen from the scenarios of contamination by *L. monocytogenes* of both food products selected. One of the main sources of contamination in cheese is raw milk (Meyer-Broseta et al., 2002). Yet, as cheeses are mostly prepared with pasteurised milk, this source of contamination is generally under control. An other source of contamination of the cheese is the environment of the dairy plant (Rudolf & Scherer, 2001).

For cold-smoked salmon most of the contaminations usually occur during salting of the fillets (Rorvik et al., 1995; Autio et al., 1999; Fonnesbesch Vogel et al., 2001). So two successions of stress were applied to cells in the exponential phase to reproduce situations encountered during the contamination of cheese and cold-smoked salmon. The loss of cultivability during the stress protocol was quantify on non tryptone soy agar (AES) supplemented with 0.6 % yeast extract (AES) (TSAye).

For the cheese, the succession (S1) was representative of the first steps of cheese processing (acidification, salting, and moulding): *i*) TSBye of an exponential cell culture containing  $10^8$

cells  $\text{ml}^{-1}$  was adjusted to pH 4.6 with lactic acid (Prolabo, Paris, France) and stored at 25°C for 24 hours, *ii*) cells were then decimally diluted in TSBye with 250 g  $\text{l}^{-1}$  of NaCl (Prolabo) adjusted to pH 4.6 for 1 hour at 15°C, *iii*) and finally, cells were decimally diluted in TSBye adjusted to pH 4.6 at 15°C for 71 hours. The losses of cultivability were respectively of 0.23, 1.30 and 2.80  $\log_{10} \text{cfu ml}^{-1}$  for each step of the S1 succession. For the cold-smoked salmon, the succession (S2) was also representative of the first steps of salmon processing (salting, smoking, and freezing): *i*) first, TSBye of an exponential cell culture containing  $10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$  was decimally diluted in water containing 250 g  $\text{l}^{-1}$  of NaCl and stored at 2°C for 24 hours, *ii*) cells were then suspended by dilution (1/10) in a solution containing 200 ppm of phenol and 30 g  $\text{l}^{-1}$  of NaCl, and stored for 4 hours at 25°C, *iii*) finally, cells were decimally diluted in water with 30 g  $\text{l}^{-1}$  of NaCl and 15% of glycerol and placed at -18°C for 72 hours. The losses of cultivability were respectively of 0.61, 0.25 and 0.21  $\log_{10} \text{cfu ml}^{-1}$  for the three steps of the S2 succession.

### **Re-growth conditions**

The surviving cells were recovered in TSBye adjusted to different temperatures (30, 15 and 12°C), pH (7, 6 or 5.5 adjusted with lactic acid) and water activity (0.997, 0.98 or 0.97 adjusted with sodium chloride). The nine re-growth conditions used are listed in Table 1. The growth rate of *L. monocytogenes* was estimated from at least 8 viable count enumerations on TSAye for each of these conditions with a high initial inoculum.

### **Determination of individual lag times**

Individual lag time distributions were estimated from turbidity growth curves generated by an automated spectrophotometer, the Bioscreen C reader (Labsystem France SA, Les Ulis, France). Wells of two Bioscreen plates were inoculated with 300  $\mu\text{l}$  of the suspensions to obtain a target value of 0.42 cells  $\text{well}^{-1}$ . Assuming a Poisson distribution of the cells in the

wells (Francois et al., 2003), the maximum concentration of 0.42 cells well-1 corresponds to a maximum of 35% of wells showing growth with at least 80% of them containing only one cell. The increase in turbidity was monitored at 600 nm. Time intervals between measurements varied from 10 minutes at 30°C to 30 minutes at 12°C. For each experiment 150 wells were kept for stressed cells, the 50 left over were dedicated to *L. monocytogenes* cells issued from a culture in the exponential growth phase. The re-growth conditions for both types of cells were identical. Each experiment was replicated at least two times. Individual lag times were estimated from the time,  $T_d$ , required for the microbial population to generate a 0.05 increase of the initial baseline value of the OD. Using the standardization procedure, as described by Guillier et al. (2005a), the between-experiment variability was corrected and the  $T_d$  datasets were grouped. Then individual lag times of stressed cells,  $lag_i$ , were deduced from  $T_{d,i}$  using the mean of  $T_d$  values of wells inoculated with cells in the exponential growth phase ( $\overline{T_{de}}$ ), as described by Guillier et al. (2005b):  $lag_i = T_{d,i} - \overline{T_{de}}$ . This method is based on the assumption that the individual lag times in different re-growth conditions for cells issued from a culture in the exponential growth phase were not different of zero. We confirmed this assumption by estimating the mean of individual lag times for these cells with the method of Baranyi and Pin (1999). In their method, the detection times, the growth rate and the concentration of cells are required to estimate the lag time. Estimates of the means of individual lag times are provided in Table 1. Our results showed that the mean of individual lag times were not different from zero or smaller than generation time even when the cells are transferred from favourable to harsher conditions. These results justified the use of the method of Guillier et al. (2005b) which is only based on detection times.

### **Determination of the proportion of culturable cells**

Stressed *L. monocytogenes* cells were diluted in the same re-growth conditions used for the determination of individual lag times in order to reach a maximum concentration of 3 cells

$\text{ml}^{-1}$  in the final dilution. Replicate volumes of 200  $\mu\text{l}$  from each re-growth conditions were distributed into the wells of microwell plates. The micro-plates were then covered with Parafilm to avoid dehydration and stored in controlled temperature incubators for up to 8 weeks. Wells exhibiting turbidity were considered positive for growth. The concentration of cells in the re-growth condition  $j$  ( $c_j$ ) was calculated from the observed proportion of positive wells ( $P_j$ ), assuming a Poisson distribution of cells in the wells (Francois et al., 2003):

$$c_j = \ln\left(\frac{1}{1 - P_j}\right).$$

The results were expressed as the proportion,  $r_j$ , of cells able to initiate growth in the re-growth conditions  $j$ :  $r_j = \frac{c_j}{c_{30}}$  where  $c_{30}$  is the concentration of cells initiating growth in TSBye at 30°C. TSBye at 30°C was considered as the most favourable condition for the growth of stressed cells, thus the observed concentrations of growing cells in TSBye at 30°C were assumed to be the concentrations of viable cells. Experiments were at least carried out in three replicates.

## RESULTS

### Impact of the re-growth conditions on the individual lag time distributions

The characteristics of the observed distributions of individual lag times of stressed cells are shown in Table 2. For S1 and S2 stressed cells the mean of individual lag times became longer and the standard deviation increased, as temperature decreased for similar pH and  $a_w$  conditions (7 and 0.997 or 5.5 and 0.97). The same phenomenon for S1 stressed cells was observed at constant temperature (30 or 12°C) with lower pH and/or  $a_w$ . At the opposite, for S2 stressed cells, the standard deviations observed at 30°C pH 5.5 and at 30°C  $a_w$  0.97 were smaller than those observed at 30°C pH 7 and  $a_w$  0.997. However it should be noticed that the

datasets for these stresses were small and that the standard deviation and the mean are estimators that are sensitive to outliers.

Whatever the stresses applied, a linear correlation between the mean and the standard deviation was observed in the studied region of re-growth conditions (Fig. 1).

### **Impact of the re-growth conditions on the proportion of cells able to initiate growth**

The results presented in Table 3 and Fig. 2 of the proportions of cells able to initiate growth in different re-growth conditions suggest that the proportion of cells able to grow decreased with less favourable re-growth environments.

For S1 stressed cells at optimum pH and  $a_w$ , temperature seemed to only have a small impact on this proportion with no significant differences between proportions of growing cells obtained for the different temperatures studied (30, 15 and 12°C). For the two other environmental factors ( $a_w$  and pH), the impact on the ability to initiate growth became more important, with percentages of growing cells of 47% and 54% for  $a_w$  0.97 at 30°C and 15°C, and of 37% for pH 5.5 at 30°C. The effect of pH and  $a_w$  seemed to be cumulative as the percentages of cells able to grow were of 16% at pH 5.5 and  $a_w$  0.97 and of 15% at 30°C and 12°C, respectively. Results obtained for the S2 physiological state at 30°C (Fig. 2 and Table 3) were in agreement with those obtained for the S1 physiological state. Yet, the proportion of cells able to grow in the S2 physiological state at 12°C was lower than in the S1 physiological state.

In order to check whether the cells had definitively lost their ability to grow, some microwell plates were further incubated in most favourable conditions by increasing the temperature, adjusting the pH at a higher level and/or adding fresh TSBye to increase  $a_w$ . No additional positive wells were observed after the second incubation period.

## DISCUSSION

A clear objective of recent works on the individual lag times of *L. monocytogenes* is to provide information in order to make acceptable the risks assessments linked to the presence of *L. monocytogenes* in food products (Francois et al., 2005a; Guillier et al., 2005a). In the deterministic modelling approach of bacterial lag phase, the lag time is the same whatever the number of cells in the inoculum. At the opposite, the stochastic approach considers the distribution of individual lag times. Another improvement of the risk assessment can be achieved by taking into account the physiological state of the cells in the food processing and the food industry environment (Guillier et al., 2005a). Consequences of taking into account both the physiological state and the stochastic aspect of bacterial growth can be illustrated with the following examples. In the literature, the lag time in broth or milk at about 30°C for *L. monocytogenes* cells issued from a stationary phase culture was comprised with a deterministic approach between 1 h and 4 h (Buchanan et al., 1989; Pearson and Marth, 1990; Duh and Schaffner, 1993). In our study the lag times of cells previously exposed to conditions reproducing conditions of the cheese and the cold-smoked salmon processing were comprised between 0.42 and 23.6 h and between 0.1 and 44.8 h, respectively. Rosenow and Marth (1987) and Ahamad and Marth (1989) observed in milk and broth at 12°C a deterministic lag time comprised between 8 and 17 h with *L. monocytogenes* cells issued from a stationary phase culture. At 12°C in broth, individual lag times were comprised between 2.3 h and 65.3 h and between 21.9 h and 193.1 h, respectively for both S1 and S2 physiological states. In the same way, there is no doubt that the initial physiological state of the cells has a crucial impact on the mean of individual lag times. Indeed, Francois et al. (2005b) observed a mean of individual lag times of 0.64 h for unstressed *L. monocytogenes* cells with about 25% of cells with negative or zero individual lag times. In our study, for a similar re-growth condition (broth at 30°C aw 0.997 pH 7.1) the mean of individual lag times was 6 times higher for cells

exposed to cheese processing conditions, and eight times higher for cells exposed to cold-smoked salmon processing conditions.

There was also several attempts to quantify the effect of stress on individual lag times (Stephens et al., 1997; Smelt et al., 2002; Guillier et al., 2005a), however only one stress was applied to the cells. The originality of our study was that *L. monocytogenes* cells were sequentially exposed to three stress conditions which are realistic with the food processing of cheese and cold-smoked salmon. Successive or combined stresses are more representative of the environmental conditions encountered by the cells during the processing of food products. Yet successive stresses applied to bacterial cells did not have necessarily a higher impact than a single stress. Indeed, the means of individual lag times for S1 and S2 physiological states in TSBye at 30°C were lower than six out the nine single stresses of the study of Guillier et al. (2005a). Moreover, the distribution that fitted the best our different datasets was the Extreme Value type II distribution (data not shown). This distribution, characterised by a positive skewness, was also found to correctly fit several distributions of individual lag times in the study of Guillier et al. (2005a).

Yet the initial physiological state or the “work to be done” (Robinson et al., 1998) of individual cells is hard to predict as it depends on many factors (nature of the stress undergone, duration and intensity). Thus, stress experiments should be performed to estimate the initial physiological state of the cells. The different stresses applied to the cells can be imagined as we did from the scenarios of contamination of food products, especially through an Hazard Analysis Critical Control Point approach.

Another interesting finding of this study is that it seems that a linear relation can be found between the mean and the standard deviation of the individual lag time datasets whatever the initial physiological states of the cells and the growth conditions of this study (Fig. 1). It was also confirmed by the findings of Métris et al. (2003) who also observed a linear relationship

between means and standard deviations of individual detection times. However, the linear relation we observed between standard deviations and means of individual lag times have to be confirmed, especially in other harsher conditions.

The probability of growth is also of interest in the risk assessment for *L. monocytogenes*. The partial loss of cultivability of the *L. monocytogenes* cells within the growth domain of the micro-organism has already been observed when the growth conditions (pH and  $a_w$ ) became less favourable (Pascual *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 2001; McKellar *et al.*, 2002; Koutsoumanis *et al.*, 2005) or when cells were heat stressed (Pascual *et al.*, 2001). However, our results of probability of growth of *L. monocytogenes* are relatively high (superior to 0.1) compared to other studies (Pascual *et al.*, 2001; Koutsoumanis *et al.*, 2005) where the observed probabilities were sometimes below  $10^{-4}$ . This can certainly be explained by the harsher growth conditions they used. Consequently, our results should only be used in the growth domain we studied.

In the future we will focus on checking the relation between means and standard deviations of individual lag times of *L. monocytogenes* cells in other physiological states in different re-growth conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by a grant from the Ministères de la Recherche et de l'Agriculture (convention R02/04 programme Aliment-Qualité-Sécurité) and belongs to the French national program for predictive microbiology Sym'Previus. L. Guillier is a recipient of a Doctoral fellowship from Arilait-Recherches and the Association Nationale de la Recherche Technique. We gratefully acknowledge Carole Feurer who checked the manuscript for the correct use of English.

## REFERENCES

- Ahamad, N. and Marth, E.H. (1989) Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. *J Food Prot* **52**, 688-695.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjoberg, A.M., Aarnisalo, K., Bjorkroth, J., Mattila Sandholm, T. and Korkeala, H. (1999) Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* **65**, 150–155.
- Baranyi, J. and Pin, C. (1999) Estimating growth parameters by means of detection times. *Appl Environ Microbiol* **65**, 732-736.
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G. and Whiting, R.C. (1989) Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **52**, 844-851.
- Duh, Y.-H. and Schaffner, D.W. (1993) Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **56**, 205-210.
- Elfwing, A., LeMarc, Y., Baranyi, J. and Ballagi, A. (2004) Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Appl Environ Microbiol* **70**, 675-678.
- Fonnesbech Vogel, B., Huss, H.H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. and Gram, L. (2001) Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2586–2595.
- Francois K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. and Debevere, J. (2003) Modelling the individual lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Lett Appl Microbiol* **37**, 26-30.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. and Debevere J. (2005a) Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on

the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **73**, 203-206.

Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. and Debevere J. (2005b) Modelling the effect on environmental parameter (Temperature, pH & aw) on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Act Hort* **674**, 39-46.

Guillier, L., Pardon, P. and Augustin, J.-C. (2005a) Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2940-2948.

Guillier, L., Pardon, P. and Augustin, J.-C. (2005b) Automated image analysis of bacterial colony growth as a tool to study individual lag time distributions of immobilized cells. *J Microbiol Meth* in press.

Meyer-Broseta, S., Diot, A., Bastian, S., Rivière, J. and Cerf, O. (2002) Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Int J Food Microbiol* **80**, 1-15.

Koutsoumanis, P.K. and Sofos, J.N. (2005) Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **104**, 83-91.

McKellar, R.C., Lu., X. and Knight, K.P. (2002) Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **73**, 127-135.

Métris, A., George, S.M., Peck, M.W. and Baranyi, J. (2003) Distribution of turbidity detection times generated by single cell-generated bacterial populations. *J Microbiol Meth* **55**, 821-827.

Pascual, C., Robinson, T.P., Ocio, M.J., Aboaba, O.O. and MacKey, B.M. (2001) The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Lett Appl Microbiol* **33**, 357-361.

- Pearson, L.J. and Marth, E.H. (1990) Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of cocoa, carrageenan, and sugar in a milk medium incubated with and without agitation. *J Food Prot* **53**, 30-37.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A. and Mackey, B.M. (1998) The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **44**, 83-92.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A. and Mackey, B.M. (2001) The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **70**, 163-173.
- Rørvik, L.M., Caugant, D.A. and Yndestad, M. (1995) Contamination pattern of *L. monocytogenes* and other *Listeria spp.* In a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *Int J Food Microbiol* **14**, 111-118.
- Rosenow, E.M. and Marth, E.H. (1987) Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21, and 35°C. *J Food Prot* **50**, 452-459.
- Rudolf, M. and Scherer, S. (2001) High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J Food Microbiol* **63**, 91-98.
- Smelt, J.P.P.M., Otten, G.D. and Bos, A.P. (2002) Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *Int J Food Microbiol* **73**, 207-212.
- Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M. and Humphrey, T.J. (1997) The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J Appl Microbiol* **83**, 445-455.
- Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H. and Van Impe, J.F. (2004) Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *Int J Food Microbiol* **96**, 137-159.

Wu, Y., Griffith, M.W. and McKellar, R.C. (2000) A comparison of the Bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of individual cells of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **30**, 468-472.

**Table 1** Means of individual lag times in different re-growth conditions for *L. monocytogenes* cells issued from a culture in the exponential growth phase in TSBye at 25°C.

Re-growth conditions				Observed growth rate [h <sup>-1</sup> ]	Means of detection times [h]	Calculated means of $lag_i$ [h]*	Generation time [h]
T [°C]	pH [-]	a <sub>w</sub> [-]					
30	7.1	0,997	0,90		18,50	-0,04	0,77
30	7.1	0,97	0,58		30,82	2,14	1,19
30	5.5	0,997	0,71		22,45	-0,91	0,97
30	5.5	0,97	0,46		36,01	-0,27	1,51
15	7.1	0,997	0,23		70,20	-3,94	3,08
15	7.1	0,97	0,18		96,84	4,81	3,82
15	6	0,98	0,21		81,70	1,31	3,34
12	7.1	0,997	0,16		103,89	0,76	4,28
12	5.5	0,97	0,12		150,01	7,26	5,93

\*  $lag_i = \bar{T}_{de} - \frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu}$  where  $N_d$  is the number of cells at detection time, equal to  $1.77 \times 10^7$  cells per well ;  $N_0$  number of cells at  $t=0$  equal to 1 and  $\mu$  the observed growth rate.

**Table 2** Means and standard deviations of individual lag times ( $lag_i$ ) of *L. monocytogenes* cells as a function of physiological state, temperature, pH and aw.

Physiological state	Re-growth conditions			Number of values	Mean of $lag_i$ [h]		SD of $lag_i$ [h]	
	T [°C]	pH [-]	a <sub>w</sub> [-]		Mean	SD*	Mean	SD**
S1	30	7.1	0.997	188	4.04	0.56	3.23	0.63
	30	7.1	0.97	111	8.28	1.56	7.87	4.41
	30	5.5	0.997	41	7.10	0.93	4.22	1.06
	30	5.5	0.97	86	16.21	4.36	11.80	4.97
	15	7.1	0.997	110	15.48	1.47	13.09	1.27
	15	7.1	0.97	101	23.36	5.43	20.35	4.00
	15	6	0.98	115	23.95	5.92	19.55	6.12
	12	7.1	0.997	110	31.14	16.09	19.63	5.53
	12	5.5	0.97	104	65.12	11.99	30.97	4.00
S2	30	7.1	0.997	55	5.10	0.93	8.62	2.66
	30	7.1	0.97	32	5.69	1.00	5.43	1.09
	30	5.5	0.997	26	5.95	2.47	5.36	4.10
	12	7.1	0.997	32	59.97	12.77	45.39	12.83

\* Estimated standard deviation of the means of  $lag_i$  of the replicates

\*\* Estimated standard deviation of the standard deviations of  $lag_i$  of the replicates

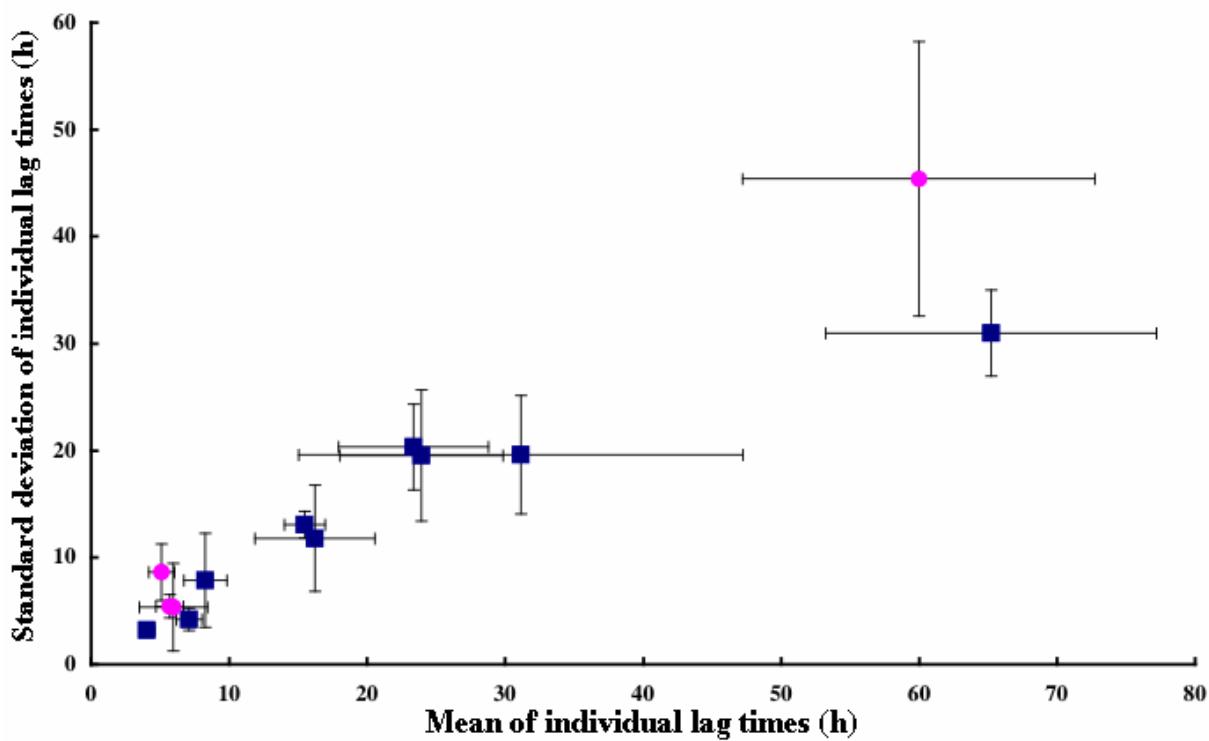
**Table 3** Proportion of *L. monocytogenes* cells able to initiate growth as a function of physiological state, temperature, pH and aw.

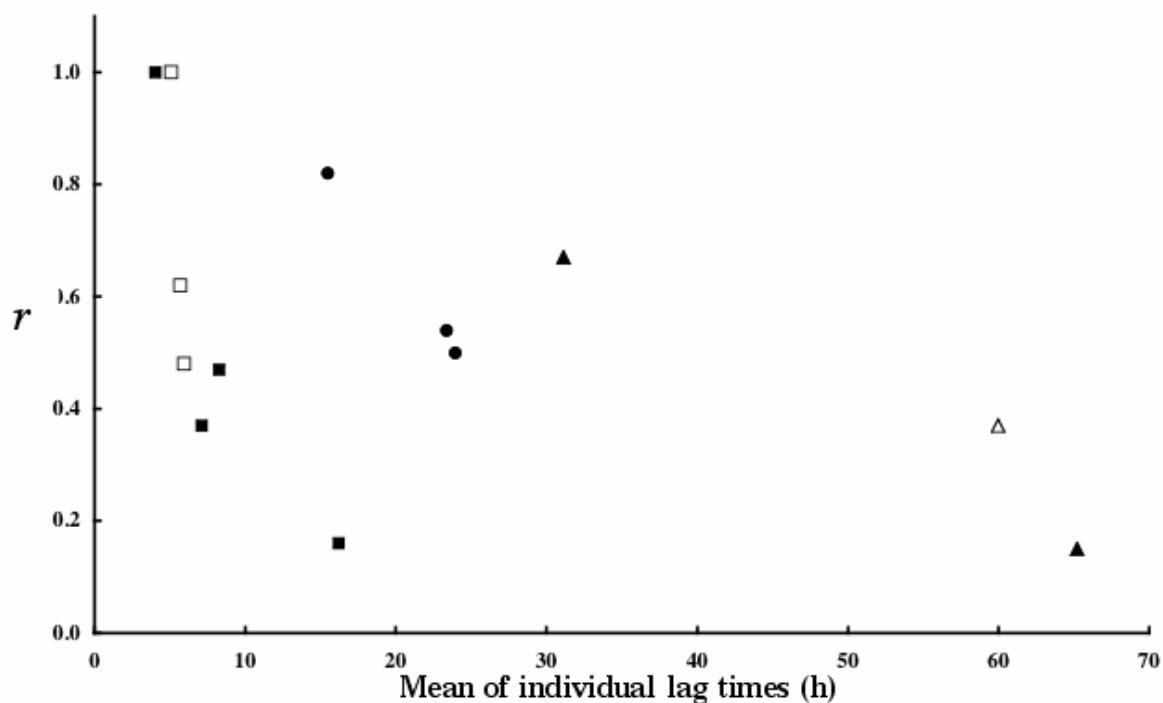
Physiological state	Re-growth conditions			Proportion of growing cells	
	T [°C]	pH [-]	a <sub>w</sub> [-]	Mean	SD
S1	30	7.1	0.997	1	-
	30	7.1	0.97	0.47	0.12
	30	5.5	0.997	0.37	0.12
	30	5.5	0.97	0.16	0.11
	15	7.1	0.997	0.82	0.04
	15	7.1	0.97	0.54	0.01
	15	6	0.98	0.50	0.14
	12	7.1	0.997	0.67	0.09
	12	5.5	0.97	0.15	0.07
S2	30	7.1	0.997	1	-
	30	7.1	0.97	0.62	0.04
	30	5.5	0.997	0.48	0.11
	12	7.1	0.997	0.37	0.08

## Figures

**Fig. 1** Standard deviations versus mean values of individual lag times of *L. monocytogenes* S1 (■) and S2 (●) stressed cells in different re-growth conditions (Table 2). Horizontal and vertical bars correspond to mean +/- SD of the replicates.

**Fig. 2** Proportion of cells able to initiate growth ( $r$ ) versus the mean of individual lag times of *L. monocytogenes* for the S1 physiological state in TSBye for different pH and aw conditions (Table 2) at 30°C (■), 15°C (●) and 12°C (▲); and for the S2 physiological state in TSBye at 30°C (□) and 12°C (△).





## I.2. Données complémentaires à l'article 4

L'ensemble des données n'a pas été présenté dans l'article 4. Par exemple, ne figurent pas les données concernant la combinaison S4 et les données de quelques conditions d'accueil des combinaisons S1 (données en Fraser 1/2) et S5. Cette absence s'explique par le fait que les données dans toutes les conditions d'accueil n'étaient pas complètes au moment de la soumission de l'article 4.

Sur les Figures 10, 11 et 12 nous présentons les jeux de données complets des temps de latence cellulaires pour les trois combinaisons de stress. Le regroupement des données nous apporte une confirmation de la relation linéaire entre la moyenne et l'écart type des temps de latence cellulaires (Figure 13).

En ce qui concerne la proportion de cellules cultivables, la totalité des résultats sont présentés dans le Tableau 12. La proportion de cellules cultivables paraît plus sensible au pH et à l'aw du milieu qu'à sa température. Il semble qu'il existe une relation entre la proportion de cellules cultivables et les moyennes des temps de latence cellulaires, mais les données présentées ne permettent pas d'envisager la modélisation. Mais comme les temps de latence cellulaires sont liés aux conditions d'accueil, il devrait être possible de relier la probabilité de croissance aux paramètres environnementaux. D'autres auteurs ont mis en évidence que la probabilité de croissance était dépendante de l'état physiologique et des conditions d'accueil (Pascual et al., 2001 ; Robinson et al., 2001 ; McKellar et al., 2002a ; Koutsoumanis et Sofos, 2005). Les probabilités de croissance observées dans leurs études sont beaucoup plus faibles, mais elles correspondent à des paramètres environnementaux plus défavorables que ceux de notre étude.

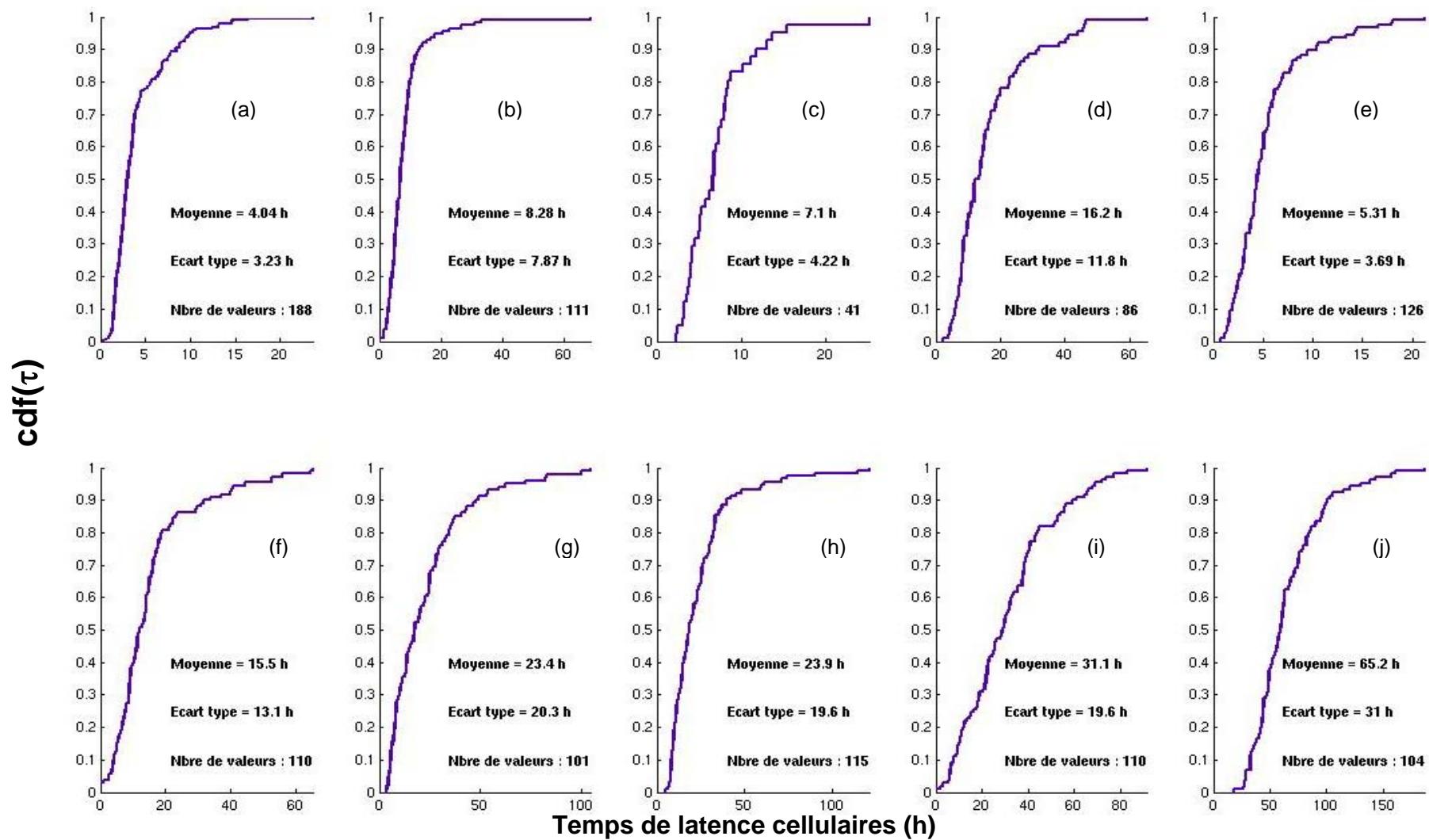


Figure 10. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence en TSBye de cellules *L. monocytogenes* 14 dans l'état physiologique S1 : (a) 30°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (b) 30°C pH 7.1  $a_w$  0.97, (c) 30°C pH 5.5  $a_w$  0.997, (d) 30°C pH 5.5  $a_w$  0.97, (e) 30°C Fraser 1/2, (f) 15°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (g) 15°C pH 7.1  $a_w$  0.97, (h) 15°C pH 6  $a_w$  0.98, (i) 12°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (j) 12°C pH 5.5  $a_w$  0.97.

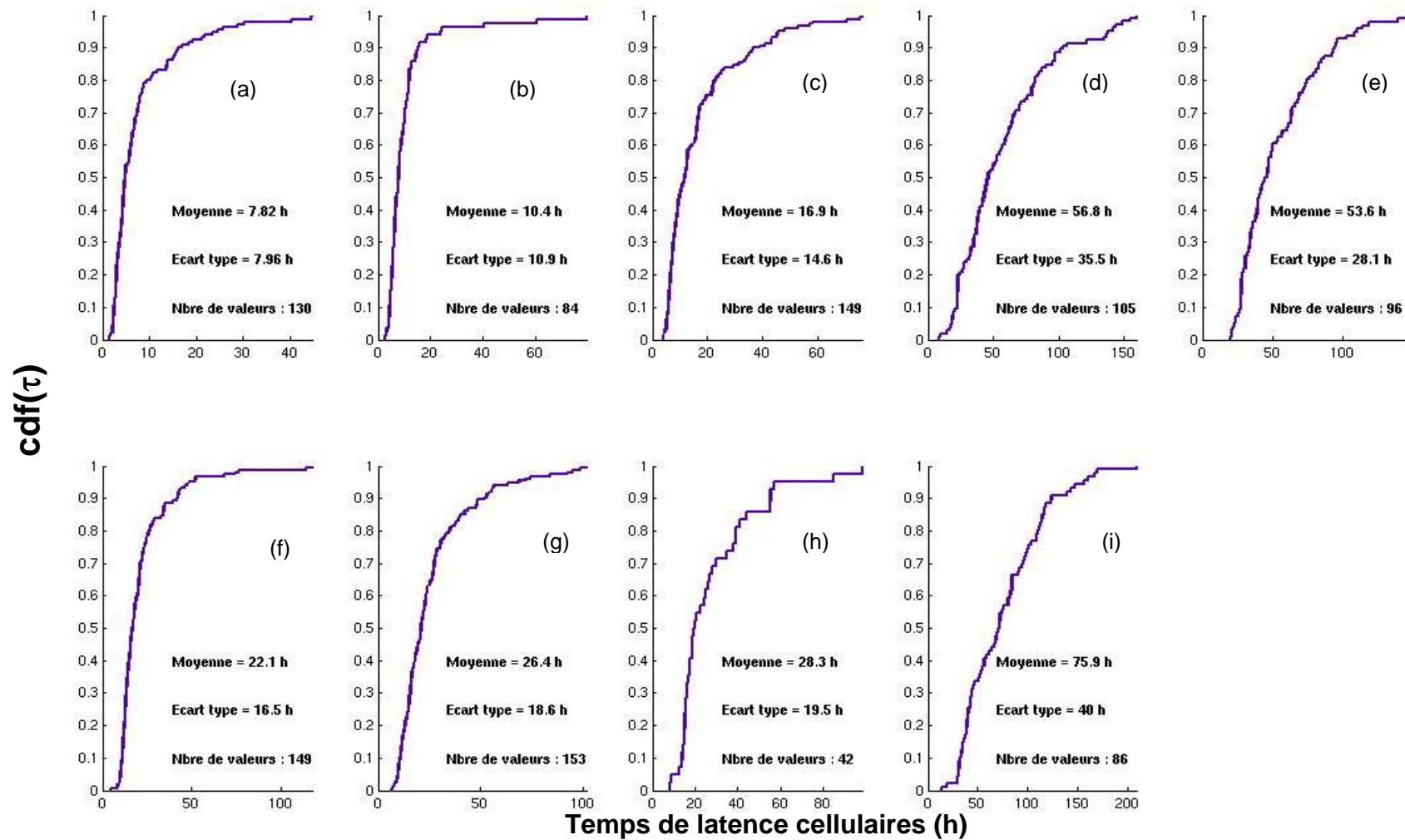


Figure 11. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence en TSBye de cellules *L. monocytogenes* 14 dans l'état physiologique S4 : (a) 30°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (b) 25°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (c) 20°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (d) 15°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (e) 12°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (f) 20°C pH 7.1  $a_w$  0.97, (g) 20°C pH 6  $a_w$  0.98, (h) 15°C pH 5.7  $a_w$  0.977, (i) 20°C pH 5.5  $a_w$  0.97.

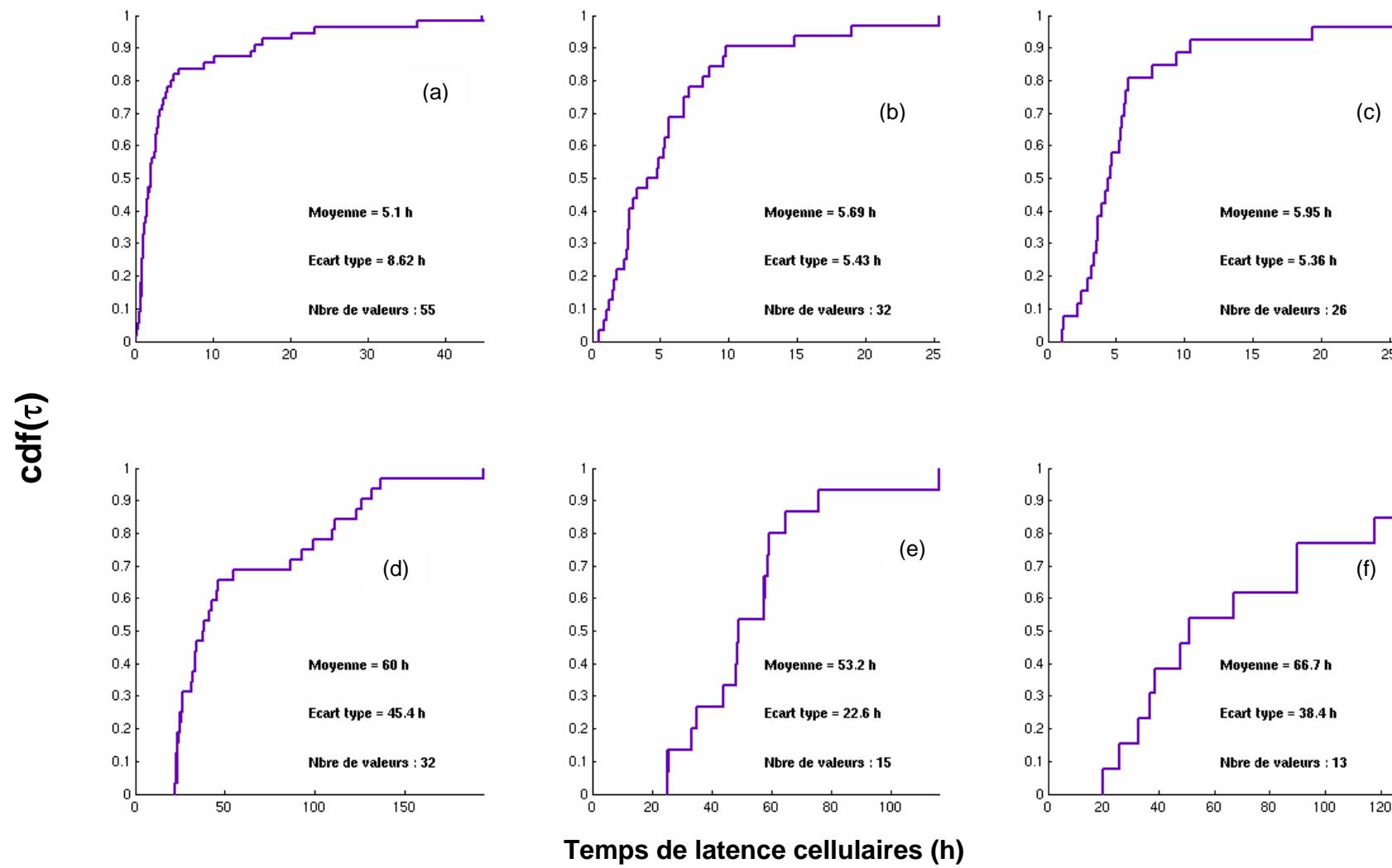


Figure 12. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence en TSBye de cellules *L. monocytogenes* 14 dans l'état physiologique S5 : (a) 30°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (b) 30°C pH 7.1  $a_w$  0.97, (c) 30°C pH 5.5  $a_w$  0.997, (d) 12°C pH 7.1  $a_w$  0.997, (e) 12°C pH 7.1  $a_w$  0.97, (c) 12°C pH 5.5  $a_w$  0.997.

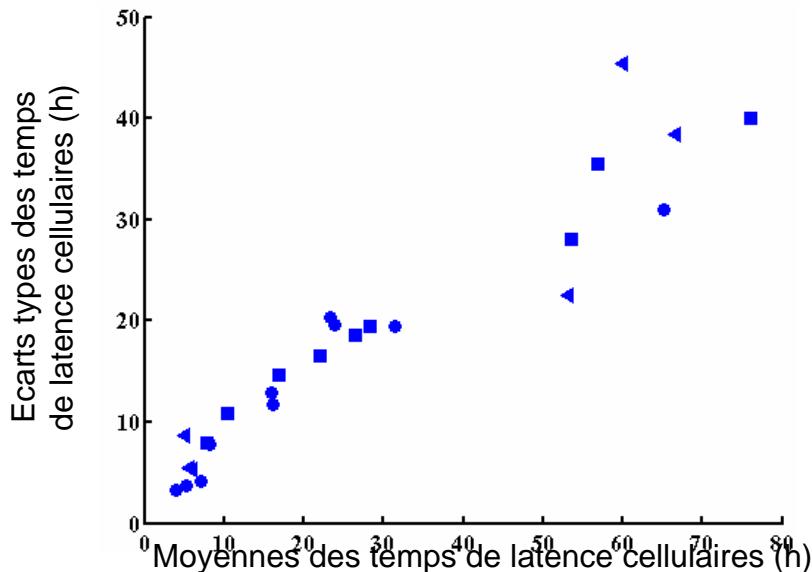


Figure 13. Relation entre les écarts types et les moyennes des distributions de latence cellulaires pour *L. monocytogenes* dans les états physiologiques S1 (●), S4 (■) et S5 (◀) dans différentes conditions d'accueil.

Tableau 12. Effet de l'état physiologique et des conditions de re-croissance sur la proportion de cellules cultivables de cellules de *L. monocytogenes* 14.

États physiologiques	Conditions de croissance			Moyenne des $\tau_i$ (h)	Proportion de cellules cultivables – Moyenne (Ecart type)
	T [°C]	pH [-]	$a_w$ [-]		
S1	30	7	0.997	4.04	1.00 (-)
	30	Fraser 1/2	Fraser 1/2	5.31	0.55 (0.02)
	30	7	0.97	8.28	0.47 (0.12)
	30	5.5	0.997	7.10	0.37 (0.12)
	30	5.5	0.97	16.21	0.16 (0.11)
	15	7	0.997	15.48	0.82 (0.04)
	15	7	0.97	23.36	0.54 (0.01)
	15	6	0.98	23.95	0.50 (0.14)
	12	7	0.997	31.14	0.67 (0.09)
	12	5.5	0.97	65.21	0.15 (0.07)
S4	30	7	0.997	7.82	1.00 (-)
	25	7	0.997	10.38	-
	20	7	0.997	16.89	1.00 (0.21)
	20	7	0.97	22.06	0.63 (0.27)
	20	6	0.98	26.40	0.57 (0.13)
	20	5.8	0.977	28.29	0.53 (0.19)
	20	5.5	0.97	75.94	0.36 (0.06)
	15	7	0.997	56.85	1.06 (0.11)
	12	7	0.997	53.59	0.72 (0.12)
	30	7	0.997	5.10	1.00 (-)
S5	30	7	0.97	5.69	0.62 (0.04)
	30	5.5	0.997	5.95	0.48 (0.11)
	12	7	0.997	59.97	0.37 (0.08)
	12	7	0.97	53.19	0.34
	12	5.5	0.997	66.72	0.44

## II. Études en milieu solide

Parallèlement à l'étude en TSBye, nous avons étudié pour une des combinaisons de stress (S4) les distributions des temps de latence cellulaires en milieu solide TSAye. Les quatre conditions testées sont précisées dans le Tableau 10. Ces conditions en TSAye sont identiques pour la température, le pH et l'activité de l'eau à quatre conditions testées en milieu liquide TSBye pour ce même état physiologique. Le but était de vérifier nos premières observations de la partie B, c'est-à-dire que pour des conditions de température, pH et aw identiques il n'y a pas de différence entre les milieux liquides et gélosés. La Figure 14 présente les distributions des temps de latence cellulaires en milieu solide.

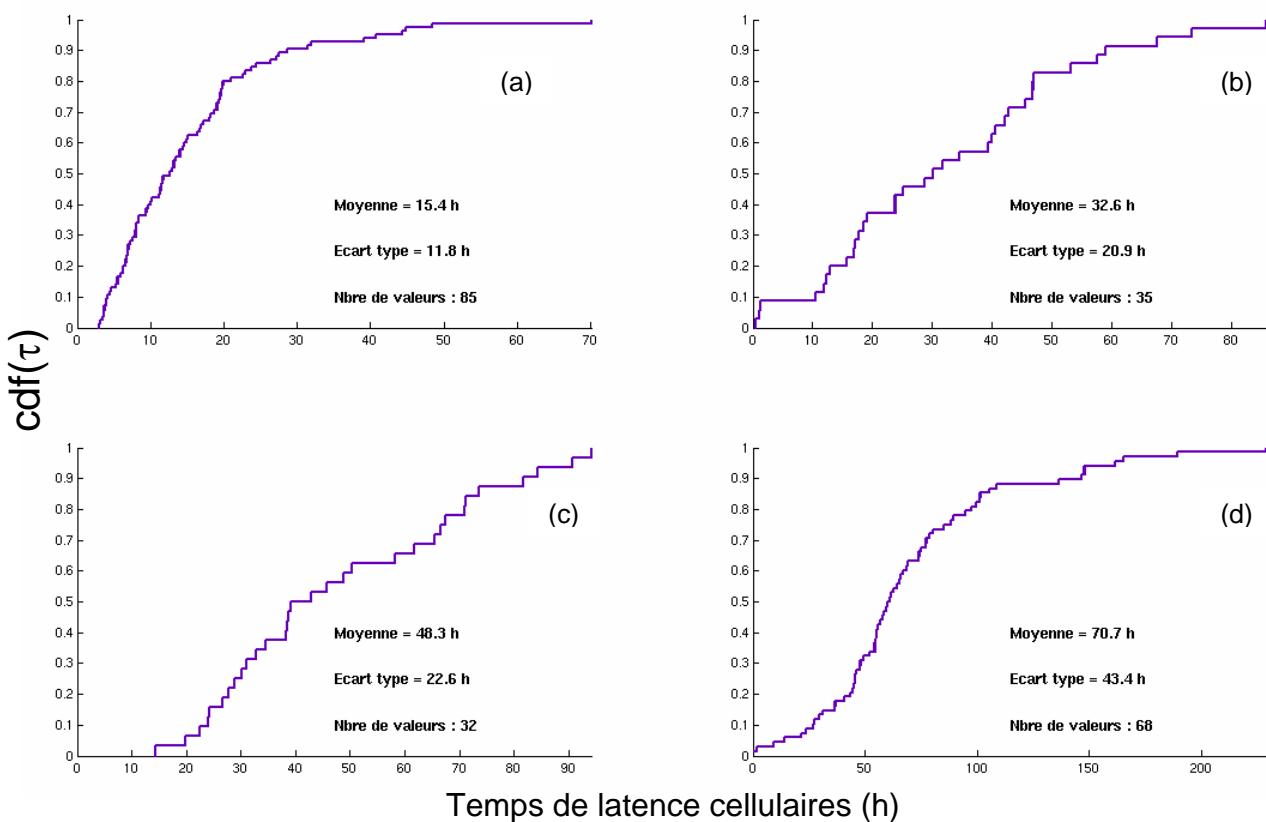


Figure 14. Distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires ( $\tau$ ) en TSAye de cellules *L. monocytogenes* 14 stressées par la combinaison S4. (a)  $20^\circ\text{C}$   $a_w$  0.997 pH 7.1, (b)  $15^\circ\text{C}$   $a_w$  0.997 pH 7.1, (c)  $20^\circ\text{C}$   $a_w$  0.97 pH 7.1 (d)  $20^\circ\text{C}$   $a_w$  0.97 pH 5.5.

En comparant les moyennes et les écarts types entre milieux solide et liquide sur la Figure 15, on ne peut conclure à une différence entre les distributions des temps de latence cellulaires entre milieux solides et liquides. Les deux points extrêmes sur la Figure 15 correspondent aux conditions les plus et les moins favorables (0.997 pH 7.1 et 0.97 pH 5.5). Ces deux points coïncident parfaitement avec la bissectrice entre les deux axes.

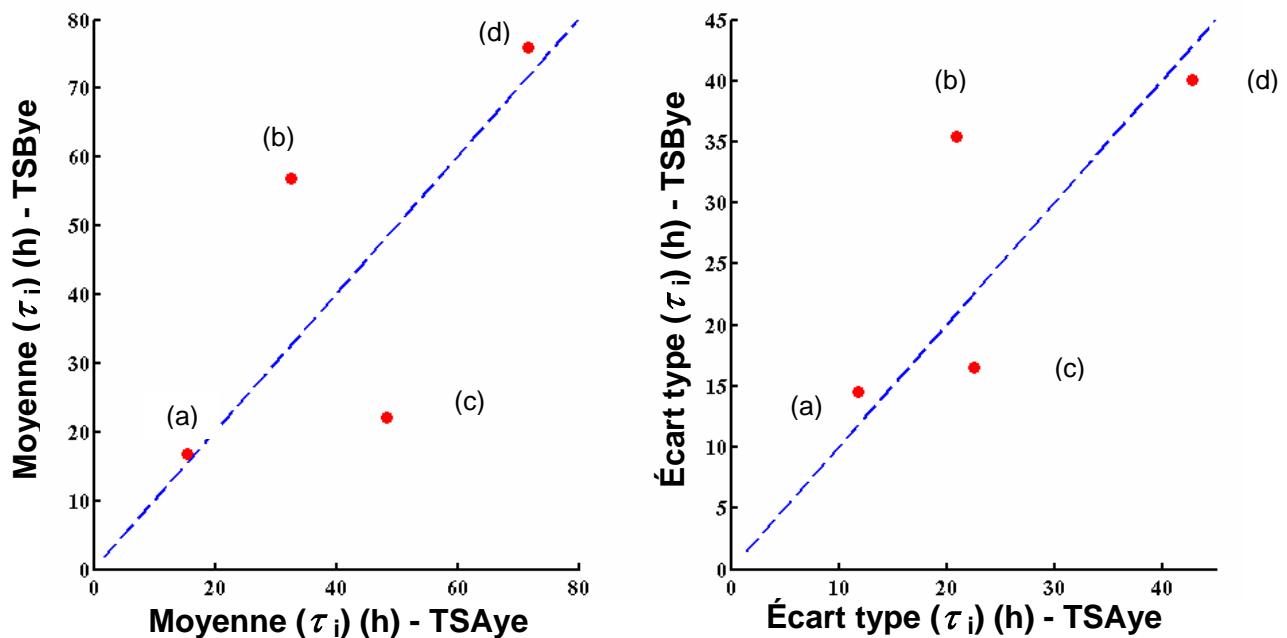


Figure 15. Comparaison des moyennes et des écarts types des distributions des temps de latence cellulaires pour les cellules stressées de *L. monocytogenes* 14 par la combinaison S4. Conditions environnementales : (a) 20°C  $a_w$  0.997 pH 7.1, (b) 15°C  $a_w$  0.997 pH 7.1, (c) 20°C  $a_w$  0.97 pH 7.1, (d) 20°C  $a_w$  0.97 pH 5.5. En pointillés : bissectrice entre les deux axes.

Quand les conditions de pH et d'activité de l'eau sont optimales, les moyennes des temps de détection sont identiques sur TSAye ou en TSBye pour les cellules en phase exponentielle :

- à 30°C : 18.9 et 18.5 heures
- à 20°C : 40.6 et 39.5 heures
- à 15°C : 70.1 et 70.2 heures

En revanche, pour des conditions de pH et aw non optimales les moyennes des temps de détection de ces mêmes cellules sont plus élevées sur TSAye que sur TSBye :

- à 20°C aw 0.97 : 124.8 et 56.5 heures
- à 20°C aw 0.97 pH 5.5 : 152.6 et 64.0 heures

Ces observations nous laissent à penser que le seuil de détection choisi sur TSAye se trouve dans la phase exponentielle de croissance, quand le pH et l'aw restent à leurs valeurs optimales, et dans la phase de freinage pour des conditions plus défavorables (Figure 16). Ceci ne remet cependant pas en cause le principe de détermination des temps de latence cellulaires à partir des temps de détection. En effet, si le freinage s'effectue de la même façon pour les cellules en phase exponentielle ou stressées, c'est-à-dire si ce freinage est indépendant de la latence, la relation reste applicable. Les hypothèses de freinage anticipé de la croissance en milieu solide sont confirmées

par une étude de Malakar et al. (2002). Les auteurs ont montré pour des colonies de *Lactobacillus plantarum*, que la croissance de ces colonies était similaire à une croissance en milieu liquide jusqu'à un certain seuil à partir duquel des phénomènes de limitation apparaissaient. Cette limitation du taux de croissance à partir d'une certaine taille de colonies s'explique par des phénomènes de diffusion des nutriments à l'intérieur de la colonie et de modification des conditions environnementales par les produits du métabolisme autour de la colonie. D'après nos résultats, ces phénomènes de limitation apparaîtraient plus tôt quand le pH et l' $a_w$  ne sont pas optimaux.

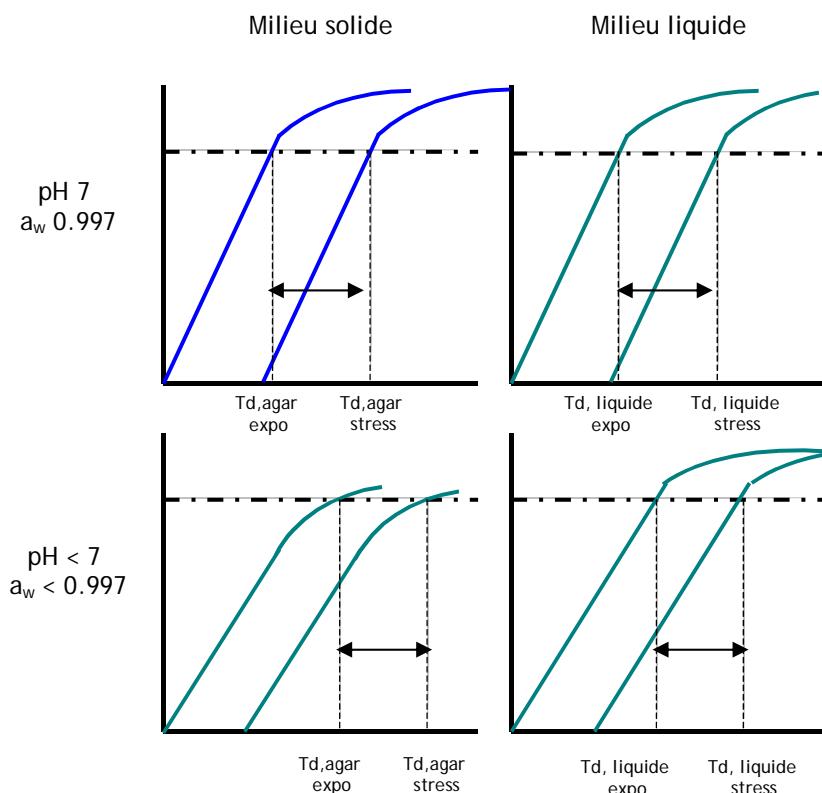


Figure 16. Principe de détermination des temps de latence cellulaires à partir des temps de détection en fonction de la nature du milieu et des conditions environnementales.

## **Chapitre E : Importance de l'effet souche sur les distributions des temps de latence cellulaires**

Il existe une variabilité biologique des paramètres de croissance chez *L. monocytogenes* (Bégot et al., 1997). L'étude de Delignette-Muller et Rosso (2000) a montré un fort impact de cette variabilité sur l'évaluation quantitative des risques pour *Bacillus cereus* dans le lait pasteurisé. Afin de caractériser l'importance de l'effet souche chez *L. monocytogenes* sur les distributions des temps de latence cellulaires nous avons choisi de vérifier la réponse de onze souches à un même stress. Les onze souches sont des souches isolées de l'environnement de sites industriels de fabrication, des aliments ou encore des souches de collection isolées chez des personnes atteintes de listériose.

### **I. Souches utilisées et conditions de conservation**

Parmi les onze souches de l'espèce *L. monocytogenes* étudiées, huit sont des souches isolées de l'environnement des industries agro-alimentaires ou des produits. Nous avons choisi des souches de différentes origines :

Les produits carnés, avec quatre souches isolées de l'environnement des ateliers de fabrication :

- la souche 14 (ou INRA 100), de sérotype 4b ;
- la souche 70 (ou INRA 101), de sérotype 4b ;
- la souche 29 (ou INRA 102), de sérotype 4b ;
- la souche 42 (ou INRA 103), de sérotype 1/2c.

Les produits laitiers avec :

- la souche V7, de sérotype 1/2a isolée de produits fromagers ;
- les souches UNIR 100 et 101, de sérotype 4b, isolées de fromages.

Les produits de la mer avec

- la souche ADQP101.

Trois souches ont été isolées de malades :

- la souche Scott A, de sérotype 4b
- la souche ATCC 19115 de sérotype 4b
- la souche CLIP 22573 de sérotype 4b

Toutes ces souches sont conservées sur cryobilles à -18°C.

## II. Stress appliqué et perte de cultivabilité.

Le choix du stress s'est porté sur un des stress standardisés sur la perte de cultivabilité : le stress NaCl (voir chapitre A.IV.1.2. pour le détail du protocole). Ce stress a été choisi car il n'est pas spécifique d'une catégorie de produits alimentaires. En effet, l'utilisation de concentrations élevées en NaCl est un procédé technologique courant pour les produits de la mer, les fromages et les produits carnés.

Les cinétiques d'inactivation n'ont pas été déterminées. Seules les pertes de cultivabilité ont été observées au terme des 24 h de stress pour chacune des souches. Ces données sont reportées dans le Tableau 13. Contrairement à Faleiro et al. (2003) qui ont observé une plus grande tolérance aux concentrations élevées en NaCl chez les souches isolées de fromage, il ne semble pas exister de lien entre l'origine des souches et leur résistance au protocole de stress. Nos résultats sont en revanche cohérents avec les travaux de Francis et O'Beirne (2005) qui ont montré pour 15 souches de *L. monocytogenes* que les différences en terme de perte de cultivabilité, après des traitements par la chaleur à 55°C ou un pH à 3.5, étaient significatives mais indépendantes de l'origine ou du sérotypage des souches.

Le coefficient de variation des pertes de cultivabilité est de 31%. L'ordre de grandeur de ce coefficient est cohérent avec le coefficient de variation de 22% que nous avons observé dans notre étude du taux de croissance optimal de *L. monocytogenes* dans les milieux de culture (Article 1).

Tableau 13. Pertes de cultivabilité observées en  $\log_{10}$  ufc ml<sup>-1</sup> pour les onze souches de *L. monocytogenes* pour le protocole de stress NaCl (Chapitre A).

Souche	Lm	INRA	INRA	INRA	ADQP	UNIR	UNIR	V7	Scott	CLIP	ATCC
	14	101	102	103	101	100	101		A	22573	19115
Moyenne	1.50	0.85	1.72	0.70	0.66	0.69	1.20	1.14	1.19	1.15	1.08
(Ecart type)	(0.12)	(0.16)	(0.30)	(0.18)	(0.12)	(0.15)	(0.14)	(0.07)	(0.01)	(0.09)	(0.15)

## III. Distributions des temps de latence cellulaires

Les distributions des temps de détections des onze souches ont été déterminées par la méthode spectro-photométrique décrite dans l'article 3. Nous avons ensuite employé la méthode décrite dans l'article 2 pour l'estimation des temps de latence à partir des temps de détection. L'ensemble des résultats est présenté sur la Figure 17. La souche Lm14 qui est utilisée dans cette étude pour caractériser l'impact de l'état physiologique et des conditions de croissance est la souche qui présente la moyenne et l'écart type des temps de latence cellulaires les plus longs.

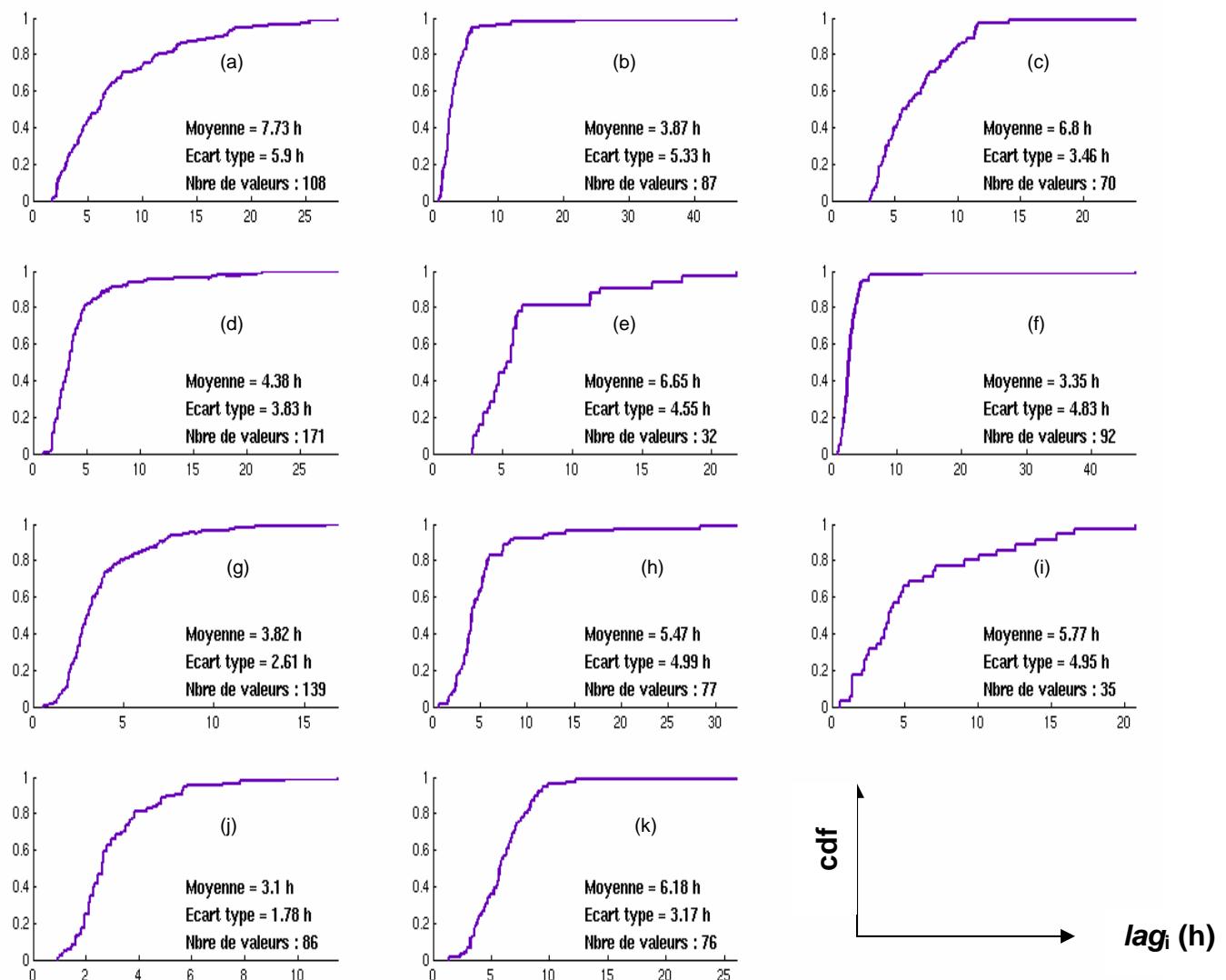


Figure 17. Distributions cumulatives des temps de latence cellulaires en milieu TSBye à 30°C, pH 7.1 et  $a_w$  0.997 après le stress NaCl des cellules de *L. monocytogenes* des souches : (a) Lm14, (b) ADQP101, (c) ATCC 19115, (d) Scott A, (e) INRA 101, (f) INRA 102, (g) INRA 103, (h) UNIR 100, (i) UNIR 101, (j) V7 et (k) CLIP 22573.

Comme nous l'avons observé pour les 22 états physiologiques différents de la souche Lm14, les moyennes des temps de latence cellulaires ne sont pas corrélées aux pertes de cultivabilité (Figure 18). Les coefficients de variation pour les moyennes et les écarts types des temps de latence cellulaires sont respectivement de 22 et 36%. Cette variabilité est du même ordre de grandeur que celle observée pour les pertes de cultivabilité.

Nous avons comparé les moyennes et les écarts types des moyennes des temps de latence cellulaires selon l'origine des souches. Nous avons obtenu des moyennes globales de 5.39 h (écart type de 2.14 h) pour les souches isolées dans l'environnement de produits carnés, de 4.78 h (écart type de 1.46 h) pour les souches isolées de fromage et de 5.78 h (écart type de 1.46 h) pour les

souches cliniques. Ces résultats nous laissent penser que les différences observées ne sont pas liées à l'origine des souches. Nos résultats sont contraires à ceux de Viallette et al. (2003) qui ont observé des différences de temps de latence entre des souches cliniques et des souches isolées d'aliments dans des conditions associant baisse du pH et de l'activité de l'eau. Les souches cliniques dans leur étude présentaient de meilleures capacités d'adaptation.

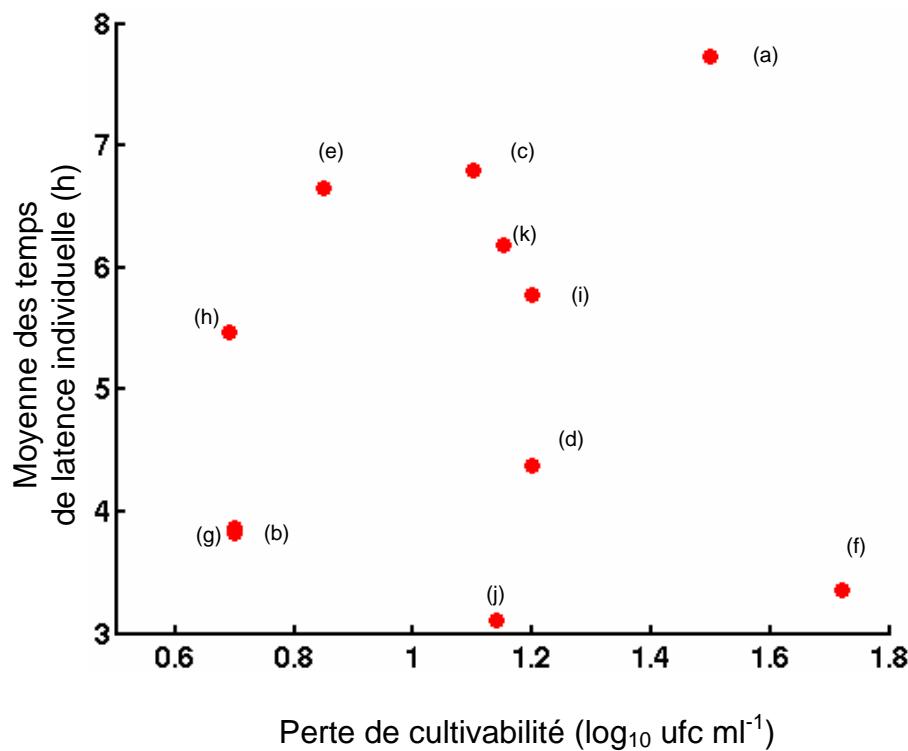


Figure 18. Moyenne des temps de latence cellulaires en milieu TSBY à 30°C, pH 7.1 et  $a_w$  0.997 après le stress NaCl en fonction de la perte de cultivabilité des onze souches de *L. monocytogenes*. (a) Lm14, (b) ADQP101, (c) ATCC 19115, (d) Scott A, (e) INRA 101, (f) INRA 102, (g) INRA 103, (h) UNIR 100, (i) UNIR 101, (j) V7 et (k) CLIP 22573.

# Chapitre F : Modélisation des temps de latence cellulaires en fonction de l'état physiologique et des conditions de re-croissance

## I. Introduction

Plusieurs approches de modélisation sur la relation entre le temps de latence déterministe et les temps de latence cellulaires ont été proposées (Baranyi, 1998, 2002 ; Katalik et al., 2005a ; McKellar et Lu., 2005). Jusqu'à très récemment, les données manquaient pour vérifier les hypothèses de distribution théorique ou du lien entre taille de l'inoculum et temps de latence. Mais depuis deux ans de nombreuses données sur les temps de latence cellulaires de *Listeria* ont été publiées (Métris et al., 2003 ; Elfwing et al., 2004 ; Francois et al., 2005a,b ; Katalik et al., 2005b) ou sont en cours de publication.

Comme nous avons pu l'évoquer dans les chapitres précédents, plusieurs distributions théoriques ont été ajustées aux distributions observées. Katalik et al. (2005a) ont montré que la distribution théorique la plus proche du modèle primaire de Baranyi et Roberts (1994) était la distribution gamma. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement par Elfwing et al. (2004) et Katalik et al. (2005b). Francois et al. (2005a, b) ont montré que les distributions exponentielle, gamma et Weibull ajustaient les distributions des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* dans différentes conditions d'accueil. Nous avons pu montrer (Article 3) que les distributions des temps de latence cellulaires dépendaient de l'état physiologique des cellules. Avec les distributions des temps de latence cellulaires dans 22 états physiologiques et pour différentes conditions d'accueil, nous avons l'opportunité de vérifier si une distribution théorique peut convenablement décrire des distributions des temps de latence correspondant à plusieurs états physiologiques et dans différentes conditions d'accueil. Cette détermination de la meilleure distribution théorique constitue le premier des objectifs de notre étape de modélisation des distributions des temps de latence cellulaires.

Nous avons pu observer dans le chapitre D que la moyenne des temps de latence cellulaires était proportionnelle à l'écart type pour les trois états physiologiques S1, S4 et S5 dans différentes conditions d'accueil. Les données de Francois et al. (2005b) des distributions des temps de latence cellulaires dans différentes conditions d'accueil pour un même état physiologique, semblent confirmer ces résultats. Ratkowsky (2004) a récemment rappelé que cette relation de proportionnalité est d'ailleurs inhérente à plusieurs distributions théoriques. Par exemple, pour les distributions gamma et Weibull, la variance est proportionnelle au carré de la moyenne. Notre

deuxième objectif a donc été de proposer un modèle reliant la moyenne et l'écart type des temps de latence cellulaires.

Kutalik et al. (2005a) ont montré qu'il était impossible de retrouver la forme de la distribution théorique à partir d'une courbe de croissance d'un inoculum fort. En revanche, ces auteurs ont montré que connaissant la forme de la distribution des temps de latence cellulaires il était possible de retrouver ses paramètres à partir de cette courbe de croissance. Ces auteurs ont ainsi déterminé les distributions des temps de latences cellulaires pour trois courbes de croissance avec un inoculum fort, mais ils n'ont pas pu vérifier la validité de leur méthode car ils ne disposaient pas des distributions des temps de latence cellulaires correspondantes. De plus, ces auteurs n'ont pas détaillé la méthode employée pour l'estimation des paramètres.

Dans notre étude, nous disposons des deux informations, c'est-à-dire des distributions des temps de latence cellulaires et des temps de latence estimés pour des inoculums forts ( $>10^3$  cellules dans le volume total de l'échantillon) de ces mêmes cellules pour deux états physiologiques (S1 et S4) dans respectivement 10 et 8 conditions. Il serait avantageux de pouvoir estimer les temps de latence cellulaires à partir du temps de latence de l'approche déterministe d'une courbe de croissance avec un inoculum fort. En effet nous avons montré que les moyennes des temps de latence cellulaires étaient difficilement prévisibles. Pour un nouvel état physiologique, il faut donc déterminer les distributions de latence cellulaires dans au moins une condition pour pouvoir estimer le temps de latence dans d'autres conditions. La détermination du temps de latence avec un inoculum fort est plus simple à réaliser que la détermination des temps de latence cellulaires par une des deux méthodes (spectrophotométrie ou analyse d'image). Nous proposons, à partir de nos données, d'étudier la relation entre le temps de latence déterminé avec un inoculum fort de cellules dans un état physiologique particulier et les temps de latence de ces mêmes cellules.

## II. Données utilisées

Les données suivantes ont été utilisées pour la construction du modèle :

- Les distributions des temps de latence cellulaires pour 22 états physiologiques en milieux liquides à 30°C, pH 7 et  $a_w$  0.997 (pour la souche Lm 14) (Chapitre C).
- Les distributions des temps de latence cellulaires pour les cinq combinaisons de stress représentatives de scénarios de contamination des produits dans les différentes conditions d'accueil (température, pH et activité de l'eau) (Chapitre D).
- Les distributions des temps de latence des 11 souches stressées en milieux liquides à 30°C, pH 7 et  $a_w$  0.997 (Chapitre E).

Au total nous disposons de 5117 valeurs de temps de latence cellulaires regroupées en 54 jeux de données.

### **III. Modélisation des temps de latence cellulaires et du temps de latence populationnel**

Dans cette partie, nous présentons les points essentiels obtenus dans l'étape de modélisation. Les différents points ci-dessous sont développés plus en détail dans l'article 5.

#### **III.1. Quelle distribution théorique pour les temps de latence cellulaires ?**

Dans un premier temps, notre effort s'est porté sur le choix d'une distribution décrivant le mieux l'ensemble des jeux de données. La caractéristique commune à tous nos jeux de données est qu'ils présentent une queue de distribution pour les valeurs supérieures à la moyenne. Cette observation est concordante avec les distributions des temps de latence cellulaires d'autres études (Métris et al., 2003 ; Elfwing et al., 2004 ; Francois et al., 2005a,b ; Katalik et al., 2005b). Nous avons choisi la distribution statistique parmi celles déjà utilisées pour décrire les temps de latence cellulaires dans la littérature. En utilisant le critère de Wallace-Boulton-Schwartz (BIC), nous avons trouvé que la distribution décrivant le mieux l'ensemble des jeux de données était la distribution des valeurs extrêmes avec un paramètre de forme fixé à une valeur de 5 (ou distribution EVIIb). La qualité de l'ajustement de cette distribution aux différents jeux de données est présentée sur les Figures 19-1,2,3 et 4. Quand bien même la distribution EVIIb n'est pas la meilleure distribution pour chacun des jeux de données (cf. Tableau 2 de l'article 5), la qualité générale d'ajustement est satisfaisante. Pour les autres étapes de la modélisation, nous avons utilisé les distributions EVIIb ajustées aux observations. Par exemple, pour l'étude de la relation entre l'écart type et les moyennes des temps de latence cellulaires nous avons utilisé les moyennes et les écarts types estimés à partir des deux paramètres des distributions EVIIb.

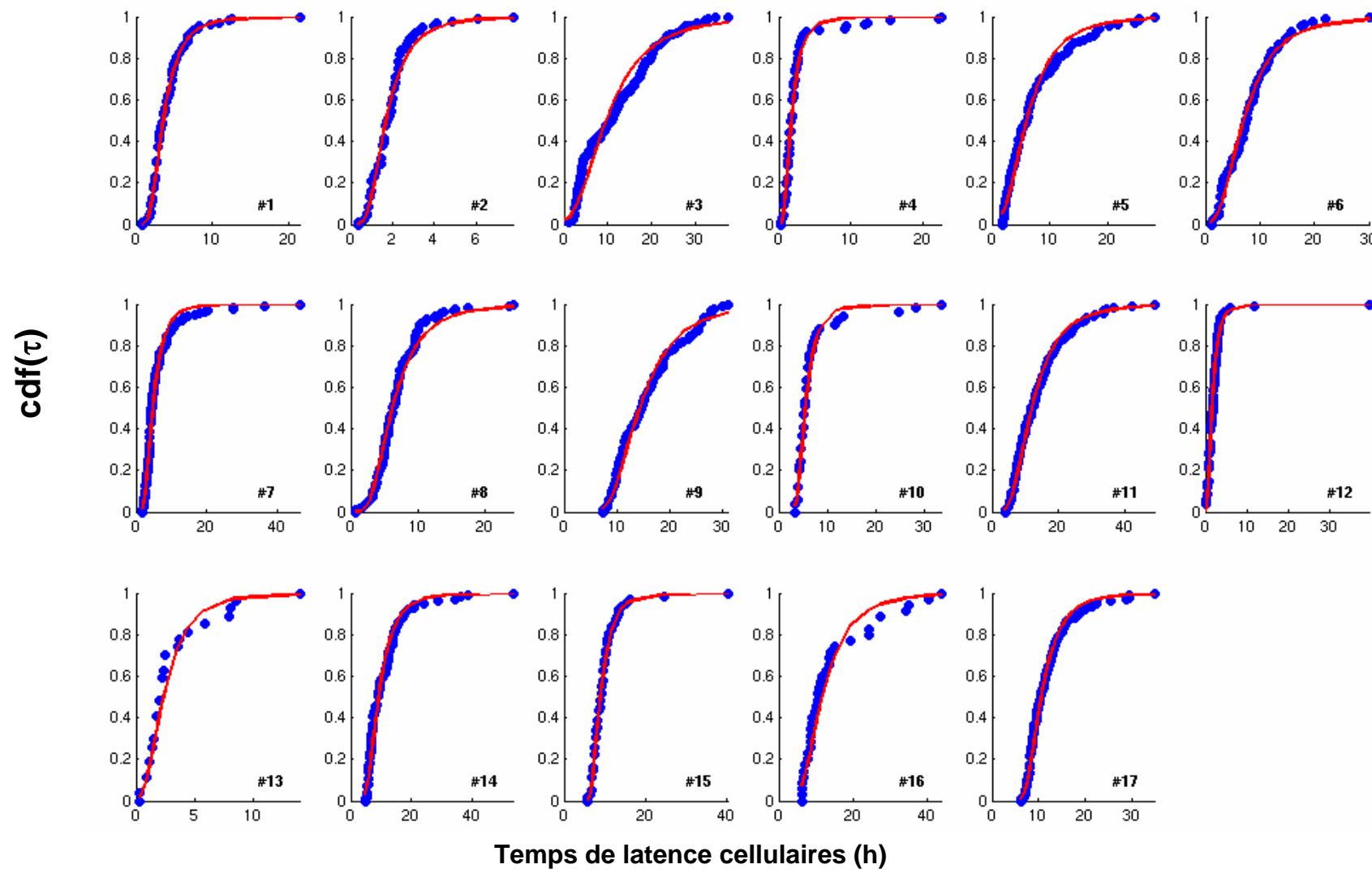


Figure 19-1. Distributions observées (●) des temps de latence en TSBye à 30°C, pH 7 et  $a_w$  0.997 de cellules de *L. monocytogenes* 14 pour divers états physiologiques (#1 à #17, cf. Tableau 10 pour la correspondance) et distributions des valeurs extrêmes (avec le paramètre de forme fixé à 5) ajustées aux observations (—).

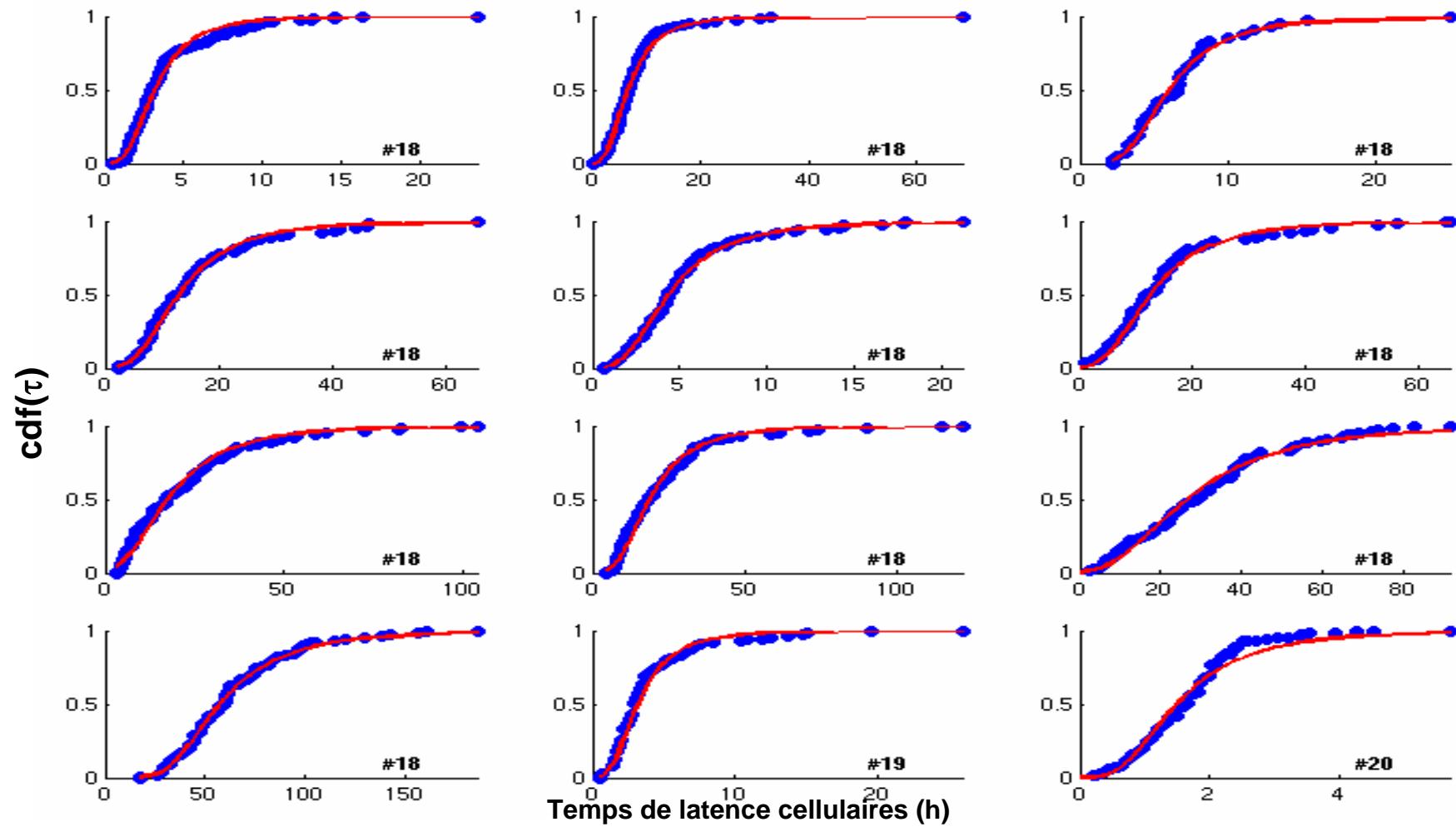


Figure 19-2. Distributions observées (●) des temps de latence de cellules de *L. monocytogenes* 14 pour les états physiologiques #18, #19 et #20 (cf. Tableau 10 pour la correspondance) pour diverses conditions de re-croissance en TSBye et distributions des valeurs extrêmes (avec le paramètre de forme fixé à 5) ajustées aux observations (—).

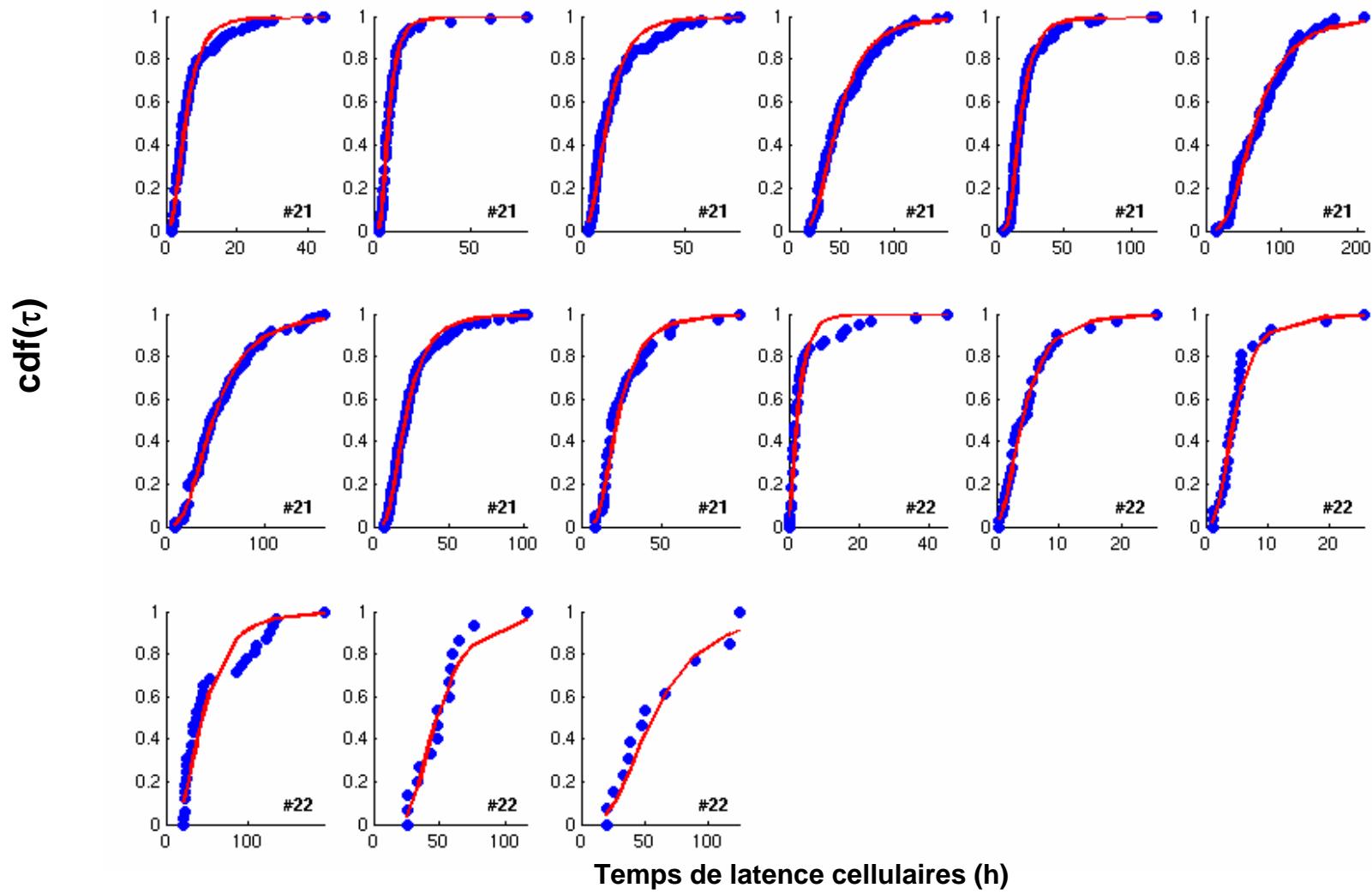


Figure 19-3. Distributions observées (●) des temps de latence de cellules de *L. monocytogenes* 14 pour les états physiologiques #21 et #22 (cf. Tableau 10 pour la correspondance) pour diverses conditions de re-croissance en TSBye et distributions des valeurs extrêmes (avec le paramètre de forme fixé à 5) ajustées aux observations (—).

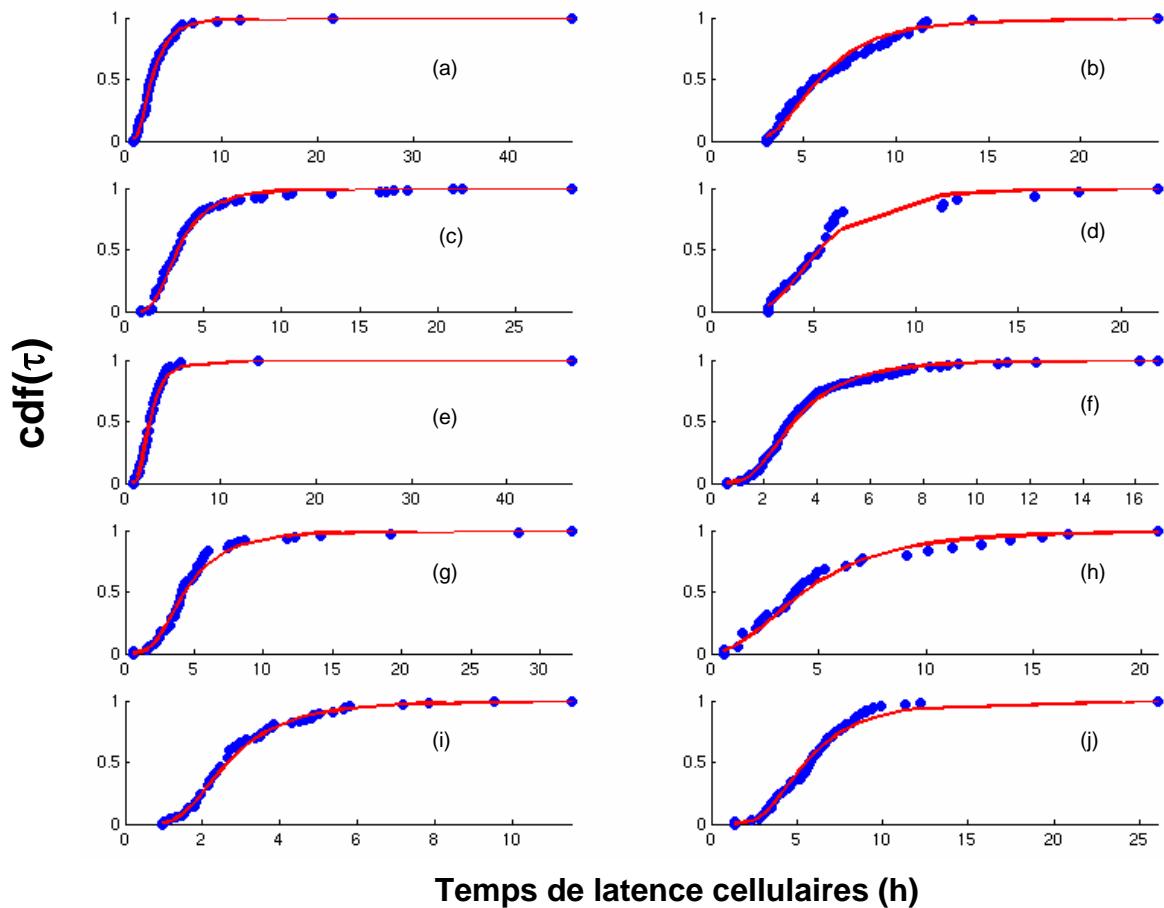


Figure 19-4. Distributions observées (●) des temps de latence en TSBye à 30°C, pH 7 et  $a_w$  0.997 de cellules de 10 souches de *L. monocytogenes* après le stress NaCl et distributions des valeurs extrêmes (avec le paramètre de forme fixé à 5) ajustées aux observations (—). Liste des souches : (a) ADQP101, (b) ATCC 19115, (c) Scott A, (d) INRA 101, (e) INRA 102, (f) INRA 103, (g) UNIR 100, (h) UNIR 101, (i) V7 et (j) CLIP 22573.

### III.2. Relation entre les moyennes et les écarts types des distributions des temps de latence cellulaires

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la relation entre les moyennes et les écarts types des temps de latence cellulaires. En effet, nous avons pu observer qu'il existait une relation de proportionnalité entre ces deux paramètres dans diverses conditions d'accueil variables (Chapitre D). Nous avons observé cette relation pour les trois états physiologiques pour lesquels nous disposions de plusieurs conditions d'accueil (Figure article 5). Cette relation de proportionnalité nous a permis de vérifier que « le travail à accomplir » pour une cellule dans un état physiologique donné (produit  $\mu_{\max}^*$   $\tau_l$ ) n'était pas significativement influencé par les conditions d'accueil. Nous avons observé que la proportionnalité entre le logarithme de la moyenne et le logarithme de l'écart type restait vraie pour l'ensemble des jeux de données (tous états physiologiques et souches confondus). Nous avons donc proposé un modèle global reliant ces deux paramètres.

### III.3. Relation entre la moyenne des temps de latence cellulaires et le temps de latence populationnel

Enfin comme la moyenne des temps de latence cellulaires est difficilement prévisible (Figure 9) nous avons proposé un modèle reliant le temps de latence déterministe aux temps de latence cellulaires. Ainsi les paramètres de la distribution des temps de latence de cellules peuvent être retrouvés à partir d'une cinétique de croissance obtenue avec un inoculum fort de ces cellules pour un état physiologique donné. En outre, nous avons pu vérifier la relation proposée par Katalik et al. (2005a) permettant d'estimer le temps de latence populationnel à partir des temps de latence cellulaires.

Ces différents points sont développés dans l'article suivant.

**Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions**

Laurent GUILLIER<sup>1,2</sup>, Jean-Christophe AUGUSTIN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UPSP Microbiologie des Aliments Sécurité Qualité, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort, France

<sup>2</sup> Arilait Recherches, 42 avenue de Châteaudun, F-75314 Paris, France

\*Corresponding author:

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle F-94704 Maisons-Alfort, France. Tel: +33-1-4396-7043, fax: +33-1-4396-7121

E-mail address: jcaugustin@vet-alfort.fr

## Abstract

The individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* were characterized for 54 combinations of 22 initial physiological states, 18 growth conditions, and 11 strains. The individual cell lag times were deduced from the times for cultures issued from individual cells to reach an optical density threshold. The extreme value type II distribution with a shape parameter set to five was shown effective to describe the 54 observed distributions. The theoretical distributions of individual lag times were thus predictable from the observed means and standard deviations of cell lag times. More interestingly, relationships were proposed to predict the mean and the standard deviation of individual cell lag times from population lag times observed with high initial concentration experiments. The observed relations are consistent with the constancy of  $k$ , the product of the maximum specific growth rate by the lag time at the cell level, with the growth conditions for a given physiological state. The proposed models allow the prediction of individual cell lag time distributions of *L. monocytogenes* in different growth conditions. We also observed that, whatever the stress encountered and the strains used, the coefficient of variation of the distributions of  $k$  was quite constant.

These results could be used to describe the variability of the behaviour of few cells of *L. monocytogenes* contaminating foods and stressed in the environment of food industry or by food processing.

**Keywords:** predictive microbiology, *Listeria monocytogenes*, individual cell lag time, stochastic modelling.

## 1. Introduction

Recently, predictive microbiology is focussing on the behaviour of *Listeria monocytogenes* at the cell level. Indeed, the stochastic approach of the bacterial growth is essential as the contamination of foods with this pathogen occurs with very few cells (Kozak et al., 1996; Uyttendaele et al., 1999; Rørvik, 2000). Numerous studies have been published on the individual cell lag time distributions of *Listeria* either through indirect methods like optical density (Métris et al., 2003; Francois et al., 2005a, 2005b; Guillier et al., 2005a) and colony surface measurements (Guillier et al., 2005b) or through direct observations of immobilized or attached cells (Wu et al., 2000; Elfwing et al., 2004; Katalik et al., 2005b). As *L. monocytogenes* cells are likely to be stressed in the environment of food industry and during food processing, it is essential to improve predictive models by taking into account injuries encountered by the cells before they contaminate the foods. Some models have been developed to describe the effect of injuries on the bacterial lag times (Bréand et al., 1999; Whiting and Bagi, 2002) but they describe the evolution of the lag time at the population level. Elfwing et al. (2004), Guillier et al. (2005a), and Katalik et al. (2005b) carried out experiments at the single cell level with *Listeria* cells previously exposed to sublethal injuries in a single re-growth environment. These studies showed that the individual cell lag times of *L. monocytogenes* depend on the stresses encountered and that the variability of the cell lag times was largely increased when cells were injured.

The first objective of the present work was to study the individual cell lag time distributions of *L. monocytogenes* in different physiological states and for different growth conditions and to evaluate the intra-specific variability of these distributions. The second objective was to consider the modelling of the individual cell lag time distributions as a function of the physiological state of the cells and the growth conditions.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial strains

11 strains of *Listeria monocytogenes* were used in this study. They were maintained at -25°C in 50% glycerol. 7 of these strains are reference strains of the French program in predictive microbiology, Sym'Previus: strain LM14 (serotype 4b, industrial environment origin), INRA 101 and INRA 102 (serotype 4b, environment of meat industry origin), INRA 103 (serotype 1/2c, environment of meat industry origin), UNIR 100 and UNIR 101 (serotype 4b, dairy products origin), ADQP101 (seafood products origin). We also used the strain V7 (serotype 1/2a, cheese origin) and three serotype 4b clinical isolates: Scott A, CLIP 22573, and ATCC 19115.

### 2.2. Preparation of exponentially growing cells of *L. monocytogenes*

Prior to each experiment, a culture was incubated at 30°C for 24 h in tryptone soy broth (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK) supplemented with 0.6 % yeast extract (AES Laboratoire, Combourg, France) (TSBye). The first bacterial culture was diluted as needed in TSBye, to obtain an initial bacterial suspension of approximately  $10^3$  cfu ml<sup>-1</sup>. This diluted culture was further incubated in TSBye for 20 h at 25°C to obtain cells in the exponential growth phase at a concentration of approximately  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>.

### 2.3. Stress experiments

#### 2.3.1. Individual stresses

The protocols of 9 stresses applied to *L. monocytogenes* LM14 cells in the exponential growth phase suspended in 8.5 g l<sup>-1</sup> NaCl (Prolabo, Paris, France) water were described in Guillier et al. (2005a). They involved lactic acid (Prolabo) stress (pH 4.6 at 25°C for 48 h), HCl (Prolabo) stress (pH 3 at 25°C for 34 min), benzalkonium chloride (BAC) (Fluka, Buchs,

Switzerland) stress ( $4 \text{ mg l}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$  for 13 min), cold stress ( $-25^\circ\text{C}$  for 48 h), NaCl (Prolabo) stress ( $250 \text{ g l}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$  for 25 h), starvation stress ( $8.5 \text{ mg l}^{-1}$  NaCl water for 24 h at  $30^\circ\text{C}$ ), chlorine stress ( $2.4 \text{ mg l}^{-1}$  for 1.5 min at  $25^\circ\text{C}$ ), NaOH (Prolabo) stress (pH 12 at  $25^\circ\text{C}$  for 22 min) and heat stress ( $55^\circ\text{C}$  for 3 min). These 9 stresses led to a  $1.5 \log_{10} \text{ cfu ml}^{-1}$  loss of cultivability by enumeration on tryptone soy agar (Oxoid) supplemented with 0.6% yeast extract (AES) (TSAye). The NaCl stress protocol was also applied to the 10 other strains of *L. monocytogenes*.

Next, we investigated the influence of the change in pH and duration of the lactic acid stress (pH 4.4 for 24 h instead of 4.6 for 48 h). Then, we checked the impact of the modification of the temperature ( $15^\circ\text{C}$  instead of  $25^\circ\text{C}$  for 25 h) and of the duration (48 h instead of 25 h at  $25^\circ\text{C}$ ) for the NaCl stress protocol. We also carried out an extended cold stress (one year at  $-25^\circ\text{C}$  instead of 48 h).

### **2.3.2. Combinations of individual stresses**

Successive individual stresses were applied to cells in the exponential growth phase of *L. monocytogenes* LM14 suspended in  $8.5 \text{ g l}^{-1}$  NaCl water: 24 h starvation stress followed by the NaCl stress at  $25^\circ\text{C}$  for 25 h, 24 h starvation stress followed by the heat stress. We also checked the influence of the order of application of two stresses. We used the NaCl stress at  $25^\circ\text{C}$  for 25 h followed or preceded by a pH 4.6 lactic acid stress applied for 8 h.

### **2.3.3. Stresses representative of food processing**

Five different stresses were applied on *L. monocytogenes* LM14 cells suspended in TSBye. Four stresses concerned the dairy processing (S1, S2, S3, and S4) and one mimicked the contamination of cold-smoked salmon (S5). S1 and S2 stresses have been previously described by Guillier et al. (2005b). In short terms, the S1 scenario simulated the

contamination by exponentially growing *L. monocytogenes* cells of the surface of a just formed curd placed afterwards in a saturated brine solution: pH 4.6 lactic acid stress for 24 h then 250 g l<sup>-1</sup> NaCl stress for 1 h and finally pH 4.6 lactic acid stress for 71 h. The S2 scenario is the same as the S1 stress but cells in the stationary growth phase (incubated 24 h at 25°C instead of 20 h) were subjected to chlorine (360 g ml<sup>-1</sup> for 2 min) before simulating the contamination of the curd.

The S3 scenario of contamination simulated the contamination of the surface of a curd by cells present in the brine. This scenario comprised two steps: *i*) cells in the exponential growth phase were placed in a water solution with 250 g l<sup>-1</sup> of NaCl at pH 7 and stored at 15°C for 24 h, *ii*) then cells were subjected to TSBye with 250 g l<sup>-1</sup> of NaCl adjusted to pH 4.6 with lactic acid for 72 h at 15°C.

The S4 scenario of contamination simulated conditions encountered by cells initially present in milk and then located in the centre of a curd. In this case, the transition from pH 7 to 4.6 was more progressive, *i*) TSBye of the exponential culture was adjusted to pH 6 with lactic acid and stored at 25°C for 30 min, *ii*) then TSBye was adjusted to pH 5 with lactic acid and stored 1 h at 25°C, *iii*) next the pH was progressively decrease to pH 4.4 with lactic acid in 22.5 h at 25°C, *iv*) finally the cells were maintained at pH 4.4 for 96 h at 15°C.

The S5 combination simulated the contamination of cold-smoked salmon during the first steps of processing. This scenario comprised three steps: *i*) cells in the exponential growth phase were placed in a water solution with 250 g l<sup>-1</sup> of NaCl at pH 7 and stored at 2°C for 24 h, *ii*) then cells were suspended in a solution containing 200 mg l<sup>-1</sup> of phenol and 30 g l<sup>-1</sup> of NaCl and stored at 25°C for 4 h, *iii*) finally, cells were placed in 30 g l<sup>-1</sup> NaCl water containing 150 ml l<sup>-1</sup> of glycerol stored at -18°C for 72 h.

## 2.4. Growth conditions

The surviving stressed cells were recovered in TSBye adjusted at different temperatures (30, 25, 20, 15, or 12°C), pH (7.1, 6.0, 5.8, or 5.5 adjusted with lactic acid) and water activities (0.997, 0.980, 0.977, or 0.970 adjusted with NaCl). One experiment was also performed in half-Fraser broth at 30°C. The growth conditions used are listed in Table 1.

## 2.5. Determination of population growth parameters

For the determination of population lag times and maximum specific growth rates, more than 100 stressed cells were grown in 50 ml of TSBye adjusted to the growth conditions. Bacterial counts of the cultures were periodically performed by plating adequate dilutions onto TSAye plates incubated for 72 h at 37°C. The population lag times and maximum specific growth rates were estimated from growth kinetics by fitting the logistic with delay growth model (Kono, 1968; Rosso et al., 1996):

$$\ln x(t) = \begin{cases} \ln x_0, & t \leq \text{lag} \\ \ln x_{\max} - \ln \left\{ 1 + \left( \frac{x_{\max}}{x_0} - 1 \right) \cdot \exp[-\mu_{\max} \cdot (t - \text{lag})] \right\}, & t > \text{lag} \end{cases} \quad (1)$$

where  $x(t)$  is the number of bacterial cells in the whole broth volume (cfu) at the instant  $t$  (h),  $x_0$  is the initial quantity of cells,  $x_{\max}$  is the maximum bacterial quantity,  $\text{lag}$  is the lag time (h), and  $\mu_{\max}$  is the maximum specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ ). The growth parameters were estimated from the growth kinetics by fitting the Eq. 1 with the NLINFIT subroutine of Matlab 7.0 software (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

## 2.6. Determination of individual cell lag times

Individual cell lag times were estimated from turbidity growth curves generated by an automated spectrophotometer, the Bioscreen C reader (Labsystem France SA, Les Ulis, France). Wells of two Bioscreen plates were inoculated with 300  $\mu\text{l}$  of the suspensions to

obtain a target value of 0.42 cells well<sup>-1</sup>. Assuming a Poisson distribution of the cells in the wells (Francois et al., 2003), the maximum concentration of 0.42 cells well<sup>-1</sup> corresponded to a maximum of 35% of wells showing growth with at least 80% of them containing only one cell. The increase in optical density (OD) was monitored at 600 nm. Time intervals between measurements varied from 10 min at 30°C to 30 min at 12°C (depending on the growth conditions). For each experiment 150 wells were kept for stressed cells, the 50 left over were dedicated to *L. monocytogenes* cells in the exponential growth phase. Each experiment was replicated at least two times and generally more than 100 individual cell lag times were obtained for each condition. Individual cell lag times were estimated from the times,  $Td_i$ , required for the microbial populations to generate a 0.05 increase of the initial baseline value of the OD. The determination of individual lag times from  $Td_i$  involved two steps. First, by using the standardization procedure described in Guillier et al. (2005a), the between-experiment variability was corrected and the  $Td_i$  datasets were grouped together. Then individual cell lag times of stressed cells,  $\tau_i$ , were deduced from  $Td_i$  using the mean of the  $Td$ -values of wells inoculated with cells in the exponential growth phase,  $\overline{Td_e}$ , as described by Guillier et al. (2005b):  $\tau_i = Td_i - \overline{Td_e}$ . This method is based on the assumption that the individual lag times in different growth conditions for cells issued from a culture in the exponential growth phase are not different from zero. This assumption was confirmed as we observed that the means of the individual lag times were not different from zero or were smaller than the generation times even when cells in the exponential phase were transferred from favourable to harsher conditions (data not shown).

### 3. Individual cell lag time distributions

Five statistical distributions were tested to describe our 54 observed datasets of individual cell lag time distributions. Four of these distributions have already been described in the literature for individual lag time distributions: the shifted Gamma (François et al., 2005b; Guillier et al., 2005a), the shifted Weibull (François et al., 2005b; Guillier et al., 2005a), the lognormal (McKellar and Lu, 2005), and the extreme value type II (EVII) distribution (Guillier and Augustin, 2005; Guillier et al., 2005a, 2005b). The fifth tested distribution was an extreme value type II distribution with a shape parameter fixed to five (EVII bis). The cumulative density function and the probability density function of this distribution are equal to

$\exp\left(-\left(\frac{y-a}{b}\right)^{-5}\right)$  and  $\frac{5}{b}\left(\frac{y-a}{b}\right)^{-6} \exp\left(-\left(\frac{y-a}{b}\right)^{-5}\right)$ , respectively. The parameters of the five

distributions were computed using the maximum likelihood (MLE subroutine of Matlab 7.0).

In order to select the theoretical distribution fitting the best the observed individual lag times, we used the Wallace-Boulton-Schwarz criterion (*BIC* criterion). The *BIC* criterion (Schwarz, 1978) accounts for the degree of parameterization of the distributions and was calculated for each datasets using the following equation:

$$BIC = -2 \cdot L(y) + p \cdot \log(n) \quad (2)$$

with the log maximum likelihood,  $L(y)$ , is equal to  $-\frac{n}{2} \cdot \log\left(2 \cdot \pi \cdot e \cdot \left(\frac{\sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}\right)^2\right)$  where  $y_i$

are the observed data,  $\hat{y}_i$  are the adjusted values,  $n$  is the number of observations, and  $p$  is the number of parameters of the distribution. The best distribution was the one minimizing the *BIC*-value.

The means of the *BIC*-values for the five tested distributions are reported in Table 2. The EVII distribution provided the best description of the 54 datasets. We reached the same

conclusion by studying the number of times EVII distribution was found as the best fitting distribution (Table 2). However, the standard deviation of the *BIC*-values for the EVII distribution was the highest indicating that the quality of the fit was heterogeneous according to the datasets. After the EVII distribution, we found, in decreasing order for the average *BIC*-values, EVII bis, lognormal, shifted Gamma and shifted Weibull distributions. By fixing the shape parameter of EVII to five, which was the mean value of the 54 shape parameters observed with the EVII distribution, we obtained a two parameters distribution (EVII bis) that provided a good fit of the 54 datasets. This distribution provided a better mean of the *BIC*-values than the other distributions and a better standard deviation of the *BIC*-values than EVII distribution with three parameters (Table 2). EVII bis distribution was also found better than two parameters Weibull or Gamma distributions (data not shown). Furthermore, it was of interest to use a two parameters distribution as the parameters could be estimated from the mean and the variance of the datasets. Indeed, the two parameters  $a$  and  $b$  of the EVII bis distribution are linked to the mean,  $E[\tau]$ , and the standard deviation,  $D[\tau]$ , of the individual cell lag time distributions by the following equations (Rgress+ version 2.5.1; [http://www.causaScienta.org/software/Rgress\\_plus.html](http://www.causaScienta.org/software/Rgress_plus.html)):

$$E[\tau] = a + 1.1642 \cdot b \quad (3)$$

$$D[\tau] = 0.3658 \cdot b \quad (4)$$

Eq. 3 and 4 were used to calculate the means and standard deviations of the 54 datasets from EVII bis parameter estimations (Table 1). We observed a good agreement between the observed and the calculated means and standard deviations whatever the physiological states, the growth conditions and the strains considered (Fig. 1).

We found in this study that the extreme value type II distribution provided the best fit over the whole range of physiological states, growth conditions and strains tested. François et al. (2005b) recently investigated the individual lag times of *L. monocytogenes* cells in 26

different growth conditions. Including all the observed values of individual lag times, the best distributions were exponential, Gamma, and Weibull as growth conditions were optimal, intermediate, and severe, respectively. When just taking individual lag time values superior to zero, the authors fitted a Gamma or a Weibull distribution. Katalik *et al.* (2005a) showed that the shifted Gamma distribution was the best approximation of the distribution inherent to the primary growth Baranyi's model (Baranyi and Robert, 1994). This finding was confirmed by individual lag time distribution measurements of *L. innocua* (Elfwing *et al.*, 2004; Katalik *et al.*, 2005b). Although all the proposed distributions are right skewed and quite similar, the difference in the choice of the distribution functions could be explained by the fact that the physiological states of the cells were different. Another simple reason that can be advanced is that the EVII distribution was not tested by the other authors. In the following, for modelling purpose, we chose a modified form of the EVII distribution with a fixed shape parameter that provided a good approximation of our datasets with only two parameters.

## 4. Relationship between the individual cell lag times and the population lag times

### 4.1. From the individual cell lag times to the population lag times

To estimate the population lag time from the individual cell lag time distributions of the cells constituting the population we used the relation of Baranyi (1998) and Katalik et al. (2005a). The authors established the relation between the population lag time of the deterministic process,  $lag$ , the population lag of the stochastic process,  $lag(x_0)$ , and the individual cell lag times,  $\tau_i$ :

$$lag(x_0) = -\frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln \left( \frac{1}{x_0} \sum_{i=1}^{x_0} \exp(-\mu_{\max} \cdot \tau_i) \right) \quad (5)$$

$$\text{and } \lim_{x_0 \rightarrow \infty} lag(x_0) = lag = -\frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln(E[\exp(-\mu_{\max} \cdot \tau)])$$

where  $E[.]$  is the expected value.

We calculated theoretical population lag times,  $lag$ , from 10 000 random individual cell lag time values issued from fitted EVII bis distributions (Table 1). We observed a good agreement between the calculated population lag times and the population lag times observed with high initial concentrations experiments (Fig. 2).

### 4.2. From the population lag times to the individual cell lag times

Since it is not possible to calculate the individual cell lag times from  $lag$  with Eq. 5, and as we observed a good linear correlation between the population lag times and the means of the individual cell lag times (Fig. 3), we proposed a simple linear relationship:

$$\ln(lag) = p_1 \cdot \ln(E[\tau]) + p_2 \quad (6)$$

where  $p_1$  and  $p_2$  are model parameters.

We estimated the values of the parameters  $p_1$  and  $p_2$  by using the major axis regression with 42 datasets. Indeed, for the left 12 conditions, it was not possible to estimate the population lag times as the growth rates were not estimated in these conditions (Table 1). We obtained

0.907 and -0.311 for  $p_1$  and  $p_2$ -values, respectively. As the estimated slope of the major axis (parameter  $p_1$ ) is inferior to one and the parameter  $p_2$  is negative,  $\ln(lag)$  is always inferior to  $\ln(E[\tau])$ , which is consistent with the findings of Kutalik et al. (2005a) who demonstrated that  $lag \leq E[\tau]$ .

## 5. Relationship between the mean and the standard deviation of the individual cell lag time distributions

### 5.1. Impact of the physiological state on the individual cell lag times

Fig. 4a reports the mean of the individual cell lag times obtained in TSBY at 30°C, pH 7.1, and aw 0.997 as a function of the loss of cultivability observed for 22 different stress protocols of *L. monocytogenes*. It appeared that the mean of the individual lag times was independent of the loss of cultivability previously supported by the populations of *L. monocytogenes* cells. However, whatever the physiological state of the cells, the logarithm of the standard deviation was linearly linked to the logarithm of the mean of (Fig. 4b).

As for previous results of Guillier *et al.* (2005a), this study revealed the necessity of taking into account to physiological states of the cells in lag time modelling. However, the influence of the physiological state seemed difficult to predict, as it was not linked to the loss of cultivability. Moreover, for successive stresses the mean of increased in a not predictable manner compared to individual stresses. It also depends on the order of the succession of stresses. For example, an osmotic stress followed by a lactic stress (Table 1, dataset #16) led to  $3.8 \log_{10} \text{cfu ml}^{-1}$  loss of cultivability with a mean individual cell lag time of 13.70 h whereas, by applying the lactic acid stress and then the osmotic stress (dataset #17), we observed a low loss of cultivability of  $1.6 \log_{10} \text{cfu ml}^{-1}$  but a mean individual lag time of 11.65 h.

### 5.2. Intra-specific variability of individual cell lag times

First, there was no link between the characteristics of the strains, serotypes and origins, and the mean of the individual lag times (Table 1). Then, as for the 22 different physiological states of *L. monocytogenes* LM14, there was no link between the loss of cultivability and the mean of of surviving cells (Fig. 5a) of the 11 strains of *L. monocytogenes*. Moreover, a

linear relation between the logarithms of the standard deviations and the means of the individual lag times was observed for the 11 strains (Fig. 5b).

The coefficient of variation (CV) of the loss of cultivability in our study was 31%, the CV of the means and the standard deviations of were equal to 22% and 36%, respectively. This is consistent with the CV of 22% for the optimal growth rates observed for *L. monocytogenes* in broth (Augustin et al., 2005). This confirms that the biological variability for the growth of *L. monocytogenes* strains is moderate.

### **5.3. Impact of the growth conditions on individual cell lag times**

The individual cell lag times in several different growth conditions were available for three different physiological states corresponding to scenarios of contamination of foods (S1, S2, and S5). As shown in Fig. 6, we observed that, for each physiological state, the logarithm of the standard deviation was linearly linked to the logarithm of the mean of . More interestingly, both the intercepts and the slopes seemed to be very close for the three different combinations of stresses.

### **5.4. Modelling the mean and the standard deviation of the individual cell lag times for *L. monocytogenes***

As we observed a linear correlation between the logarithms of the standard deviations and the means of the individual cell lag times whatever the stresses encountered, the strains studied, and the growth conditions used, we grouped together the 54 studied conditions. We also observed a good linear correlation (Fig. 7) between the two parameters for the grouped data. Thus, we proposed the following equation to describe the evolution of the logarithm of the standard deviation of the individual cell lag time distributions,  $D[\ ]$ , with the logarithm of the mean of these distributions,  $E[\ ]$ :

$$\ln(D[\tau]) = p_3 \cdot \ln(E[\tau]) + p_4 \quad (7)$$

where  $p_3$  and  $p_4$  are model parameters.

The logarithm transformation was used for the standard deviation and the mean of the individual cell lag times to stabilize the variance of these data. The box-Cox method (Box et al., 1978) was used on the sets of replicates to find this variance stabilizing transformation (data not shown). As we observed approximately equal error variances, we used the major axis regression to estimate the  $p_3$  and  $p_4$ -values. The slope,  $p_3$ , and the intercept,  $p_4$ , of the major axis were equal to 1.004 and -0.447, respectively.

The relation between  $E[\tau]$  and  $D[\tau]$  allowed us to check whether the general working hypothesis assuming that the product  $\mu_{\max} \cdot \text{lag}$  is constant for a given physiological state (see Swinnen et al., 2004 for a review) can be applied to  $\tau$ . If the parameter  $k_i$  quantifying the physiological state of a cell  $i$  is constant whatever the growth conditions, we have:

$$\tau_{ij} \cdot \mu_j = k_i \quad (8)$$

where  $\tau_{ij}$  is the individual lag time of the cell  $i$  in the growth condition  $j$ , and  $\mu_j$  is the growth rate in the growth condition  $j$ . With the mathematical properties of the mean and the standard deviation, we obtain:

$$E[\tau_j] = \frac{E[k]}{\mu_j} \quad (9)$$

$$\text{and } D[\tau_j] = \frac{D[k]}{\mu_j} \quad (10)$$

Then:

$$\ln(D[\tau_j]) = \ln(E[\tau_j]) + \ln\left(\frac{D[k]}{E[k]}\right) \quad (11)$$

Eq. 11 is a special case of Eq. 7 with  $p_3 = 1$  and  $p_4 = \ln\left(\frac{D[k]}{E[k]}\right)$ . We obtained a value of 1.004

for the parameter  $p_3$  of Eq. 7 that was thus consistent with the constancy of  $k_i$  for a given physiological state when growth conditions changed. But it was more surprising to obtain a  $p_3$ -value close to one even when physiological states were varying. It therefore seemed that

whatever the physiological state under consideration in our study, the ratio  $\frac{D[k]}{E[k]}$  was

relatively constant (Table 3). We obtained a mean value of 0.63 for  $\frac{D[k]}{E[k]}$  with the 32

physiological states and strains tested with a low dispersion as the standard deviation of this ratio was equal to 0.12. By plotting the logarithms of the means and the standard deviations of individual cell lag times observed by Francois et al. (2005b) for *L. monocytogenes* in 26 different growth conditions, we also observed a linear relationship (Fig. 7) with a slope close

to one. However, they obtained a mean value and a standard deviation for the ratio  $\frac{D[k]}{E[k]}$  of

0.41 and 0.27, respectively. The lower mean value obtained by Francois et al. (2005b) compared to the one we observed is perhaps linked to the fact that they used not stressed cells of *L. monocytogenes*. McKellar et al. (2002) obtained a mean value and a standard deviation

for the ratio  $\frac{D[k]}{E[k]}$  of approximately 0.21 and 0.15, respectively, for *L. monocytogenes* cells in

the stationary phase inoculated in broth adjusted to 8 different pH levels. For exponentially

growing *Lactobacillus plantarum* cells, Smelt et al. (2002) obtained a ratio  $\frac{D[k]}{E[k]}$  equal to

approximately 0.09. This ratio was increased to 0.30 when the cells were heat stressed.

The linear relationship observed by Metris et al. (2003) between the mean and the standard deviation of individual detection times,  $Td_{ij}$ , of stationary phase *L. monocytogenes* cells growing in different growth conditions  $j$  is also consistent with the hypothesis of constancy of

the parameter  $k$ . Indeed, we can show that:  $\frac{E[Td_j]}{D[Td_j]} = \frac{E[k] + \ln(x/x_0)}{D[k]}$  where  $x_0$  is the initial

number of cells (ideally equal to one) and  $x$  is the number of cells corresponding to the

detection time. The ratio  $\frac{E[Td_j]}{D[Td_j]}$  is thus constant if  $k$  is also constant.

These results seem reinforce the hypothesis of constancy of the product  $k = \mu_{\max} \cdot \tau$  at the

individual cell level. The  $k$ -value could thus express the individual cell physiological state.

The coefficient of variation of this parameter seems logically increase when cells are stressed to a value we observed in our study quite constant whatever the stress encountered and the strains used.

## 6. Application

The models proposed in this study can be used to predict the duration of the lag phase whatever the growth conditions and the initial bacterial concentration from a single growth experiment performed with a high initial concentration for a given physiological state.

An example of this application is showed in Fig. 8 for cells of *L. monocytogenes* in the S1 physiological state. By fitting Eq. 1 to the growth curve obtained with a high inoculum size in TSBye at 30°C, pH 7.1 and aw 0.970 (Table 1, dataset #19), we obtained a lag time of 4.16 h and a maximum specific growth rate of 0.58 h<sup>-1</sup> (Fig. 8a). Then, we calculated the mean individual cell lag times from this population lag time with Eq. 6. The calculated value, 6.78 h, was close to 8.01 h, the observed mean of . By using Eq. 7, we calculated a standard deviation of 4.37 h for the individual cell lag times that was close to the observed value of 5.89 h. With the mean and the standard deviation, it was possible to calculate the two parameters of the EVII bis distribution (Eq. 3 and 4) and to simulate the growth of few initial cells in the same growth condition. The calculated theoretical cumulative distribution for the individual cell lag times was consistent with the observed distribution (Fig. 8b).

We can also predict individual cell lag times for other growth conditions. We showed that the product of the growth rate by the individual lag times,  $k$ , was not significantly affected by the tested growth conditions and was only representative of the physiological state of the cells. With Eq. 9 and 10, we obtained 3.93 and 2.54 for the mean and the standard deviation of  $k$ , respectively. To simulate the growth of S1 stressed cells in TSBye at 15°C (instead of 30°C), pH 6.0 (instead of 7.1) and aw 0.980 (instead of 0.970) (Table 1, dataset #25), we used a secondary growth model (Augustin et al., 2005) to predict the growth rate. We obtained 0.18 h<sup>-1</sup> for the predicted maximum specific growth rate for an observed value of 0.21 h<sup>-1</sup>. By using the mean value and the standard deviation of  $k$  and this growth rate, we could predict 21.86 h and 14.09 h for the mean and the standard deviation of the individual cell lag times.

These values were very close to the observed ones (Table 1) and the predicted cumulative distribution of the individual lag times was consistent with the observed distribution (Fig. 8c).

Finally, we predicted the growth curve for a high inoculum size with a lag time of 12.02 h calculated with the Eq. 6 and a maximum specific growth rate of  $0.18 \text{ h}^{-1}$ . The calculated lag time was close to the observed value of 13.62 h and the predicted growth curve was also consistent with the observed kinetic (Fig. 8d).

Although the relation between the mean and the standard deviation of the individual cell lag times is based on many physiological states, strains and growth conditions, there is a need to check the validity of this relation as well as the relation between mean of  $\sigma$  and the population lag time for harsher growth conditions than those tested to increase the confidence of the proposed models for the individual cell lag times of *L. monocytogenes*.

### Acknowledgements

This study is supported by a grant from the Ministères de la Recherche et de l'Agriculture (convention R02/04 programme Aliment-Qualité-Sécurité) and belongs to the French national program for predictive microbiology Sym'Previus. L. Guillier is a recipient of a Doctoral fellowship from Arilait-Recherches and the Association Nationale de la Recherche Technique. We gratefully acknowledge Hélène Bergis and Marie Cornu for providing salmon stress datasets.

## References

- Augustin, J.-C. , Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L., 2005. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1019-1042.
- Baranyi, J., 1998. Comparison of the stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *Journal of Theoretical Biology* 192, 403-408.
- Baranyi, J, Roberts, T., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S., 1978. Statistics for experimenters, In: An Introduction To Design, Data Analysis, and Model Building. Statistics For Experimenters. Wiley, New York, pp. 232-235.
- Elfwing, A., LeMarc, Y., Baranyi, J., Ballagi, A., 2004. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 675-678.
- Francois K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., van Impe, J.F., Debevere, J. 2003. Modelling the individual lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Letters in Applied Microbiology* 37, 26-30.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., van Impe, J.F., Debevere J., 2005a. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on

the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 73, 203-206.

Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., van Impe, J.F., Debevere J., 2005b. Modelling the effect on environmental parameter (Temperature, pH & aw) on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*. Acta Horticultae 674, 39-46.

Guillier, L., Augustin, J.-C., 2005. Influence of stress and growth conditions on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. Acta Horticultae 674, 31-37.

Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.-C., 2005a. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 71, 2940-2948.

Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.-C., 2005b. Automated image analysis of bacterial colony growth as a tool to study individual lag time distributions of immobilized cells. Journal of Microbiological Methods *in press*.

Kozak, J., Balmer, T., Byrne, R., Fisher, K., 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods - incidence in dairy products. Food Control 7, 215-221.

Kutalik, Z., Razaz, M., Baranyi, J., 2005a. Connection between stochastic and deterministic modelling of bacterial growth. Journal of Theoretical Biology 232, 285-299.

Kutalik, Z., Razaz, M., Elfwing, A., Ballagi, A., Baranyi, J., 2005b. Stochastic modelling of individual cell growth using flow chamber microscopy images. International Journal of Food Microbiology 105, 177-190.

McKellar, R.C., Lu, X., 2005. Development of a global stochastic model relating the distribution of individual cell and population physiological states. International Journal of Food Microbiology 100, 33-40.

McKellar, R.C., Lu, X., Knight, K.P., 2002. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 73, 127-135.

Métris, A., George, S.M., Peck, M.W., Baranyi, J., 2003. Distribution of turbidity detection times generated by single cell-generated bacterial populations. Journal of Microbiological Methods 55, 821-827.

Rørvik, L.M., 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. International Journal of Food Microbiology 62, 183-190.

Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J., Veit, P., 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. Journal of Food Protection 59, 944-949.

Smelt, J.P.P.M., Otten, G.D., Bos, A.P., 2002. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. International Journal of Food Microbiology 73, 207-212.

Schwarz, G., 1978. Estimating the dimension of a model. The Annals of Statistics 6, 461-464.

Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., van Impe, J.F., 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. International Journal of Food Microbiology 96, 137-159.

Uyttendaele, M., de Troy, P. Debevere, J., 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. International Journal of Food Microbiology 53, 75-80.

Whiting, R.C., Bagi, L.K., 2002. Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 73, 291-295.

Wu, Y., Griffith, M.W., McKellar, R.C., 2000. A comparison of the Bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of individual cells of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology 30, 468-472.

Figure 1. Scatter plots of observed (a) means and (b) standard deviations of the individual cell lag times of *L. monocytogenes* against means and standard deviations calculated with the parameters of the extreme value type II bis distribution. (●) data, (--) bisecting line between the two axes.

Figure 2. Scatter plot of observed population lag time against population lag times calculated from individual lag times of *L. monocytogenes*. (●) data, (--) bisecting line between the two axes.

Figure 3. Relationship between population lag times and mean of the individual cell lag times of *L. monocytogenes*. (-) major axis regression.

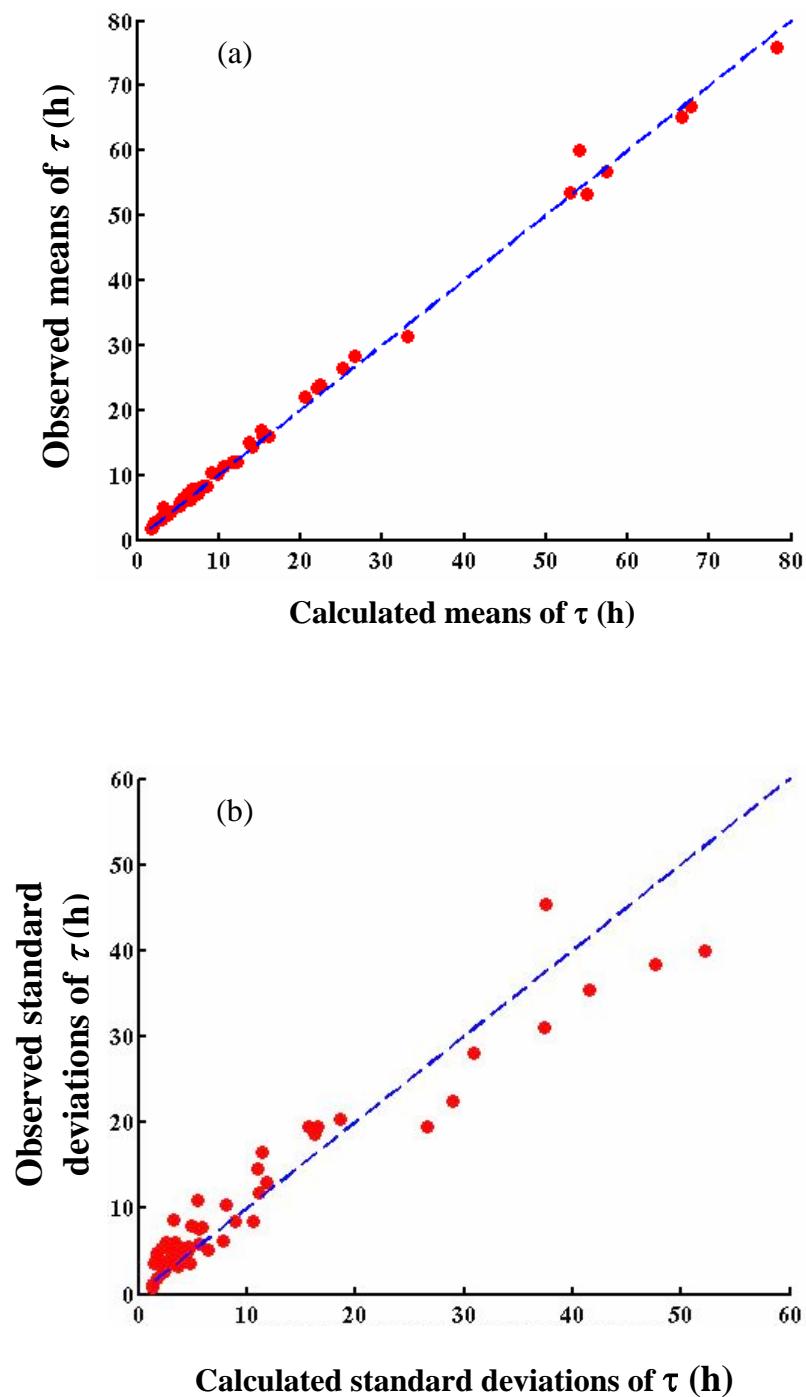
Figure 4. (a) Impact of the loss of cultivability observed on TSAye during the stress protocols and the mean of the individual lag times of *L. monocytogenes* surviving cells and (b) relationship between mean and standard deviation of the individual cell lag times for 22 physiological states in TSBye at 30°C, pH 7.1, and  $a_w$  0.997. Numbers are dataset #.

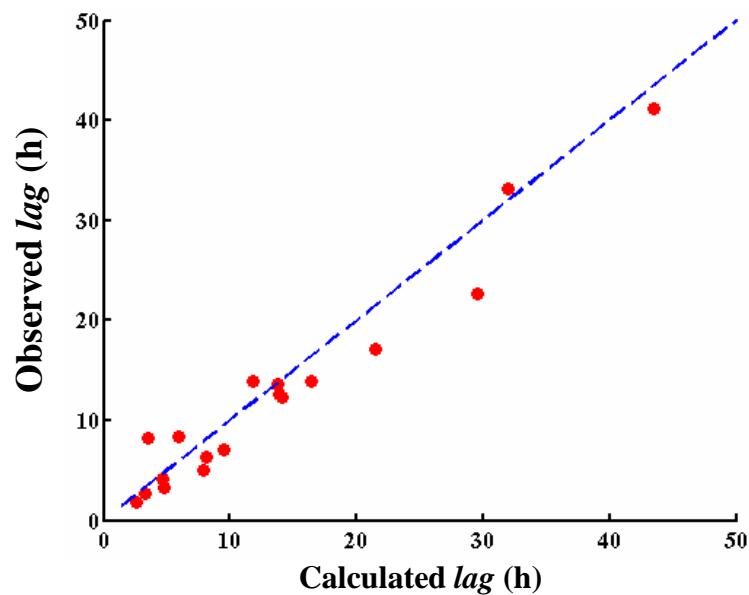
Figure 5. (a) Impact of the loss of cultivability observed on TSAye for NaCl stress protocol on the mean of the individual lag times of *L. monocytogenes* surviving cells and (b) relationship between mean and standard deviation of the individual cell lag times for 11 strains in TSBye at 30°C, pH 7.1, and,  $a_w$  0.997. Numbers are dataset #.

Figure 6. Relationship between standard deviations and means of the individual cell lag times of *L. monocytogenes* for three different physiological states in different growth conditions. (□) S1 stressed cells, (◇) S2 stressed cells, and (○) S5 stressed cells.

Figure 7. (a) Relationship between mean and standard deviation of the individual cell lag times of *L. monocytogenes*. (●) 54 datasets of this study, (-) major axis regression. (b) Comparison of the data (■) obtained by François et al. (2005b) for not stressed *L. monocytotgenes* cells to the major axis regression obtained from our data (-).

Figure 8. Observations (●) and predictions (--) of the individual cell lag time distributions of *L. monocytogenes*, in the physiological state S1, in (b) TSBye at 30°C, pH 7.1, and aw 0.970 and (c) in TSBye at 15°C, pH 6.0, and aw 0.980, from (a) the estimation (—) of the lag time for a high inoculum in TSBye at 30°C, pH 7.1, and aw 0.970. Predicted (--) and observed (●) growth of *L. monocytogenes* cells in (d) the S1 physiological state in TSBye at 15°C, pH 6.0, and aw 0.980.

**Figure 1**

**Figure 2**

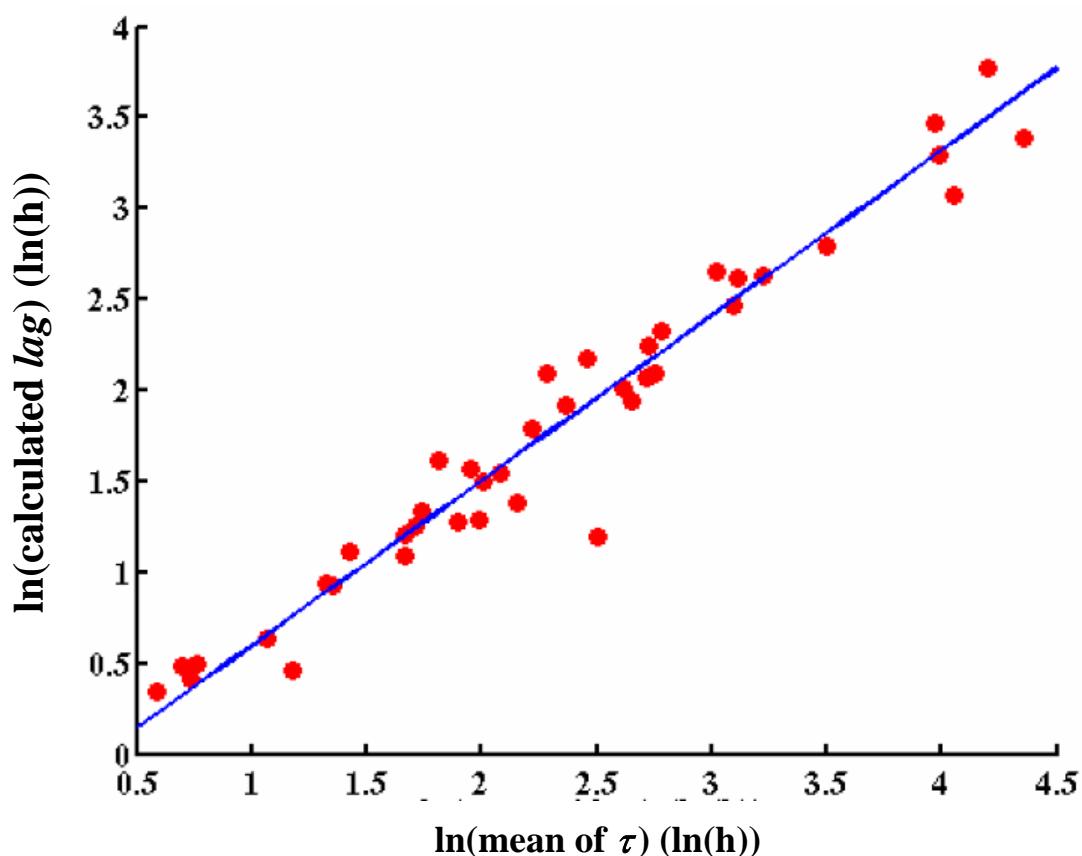
**Figure 3**

Figure 4

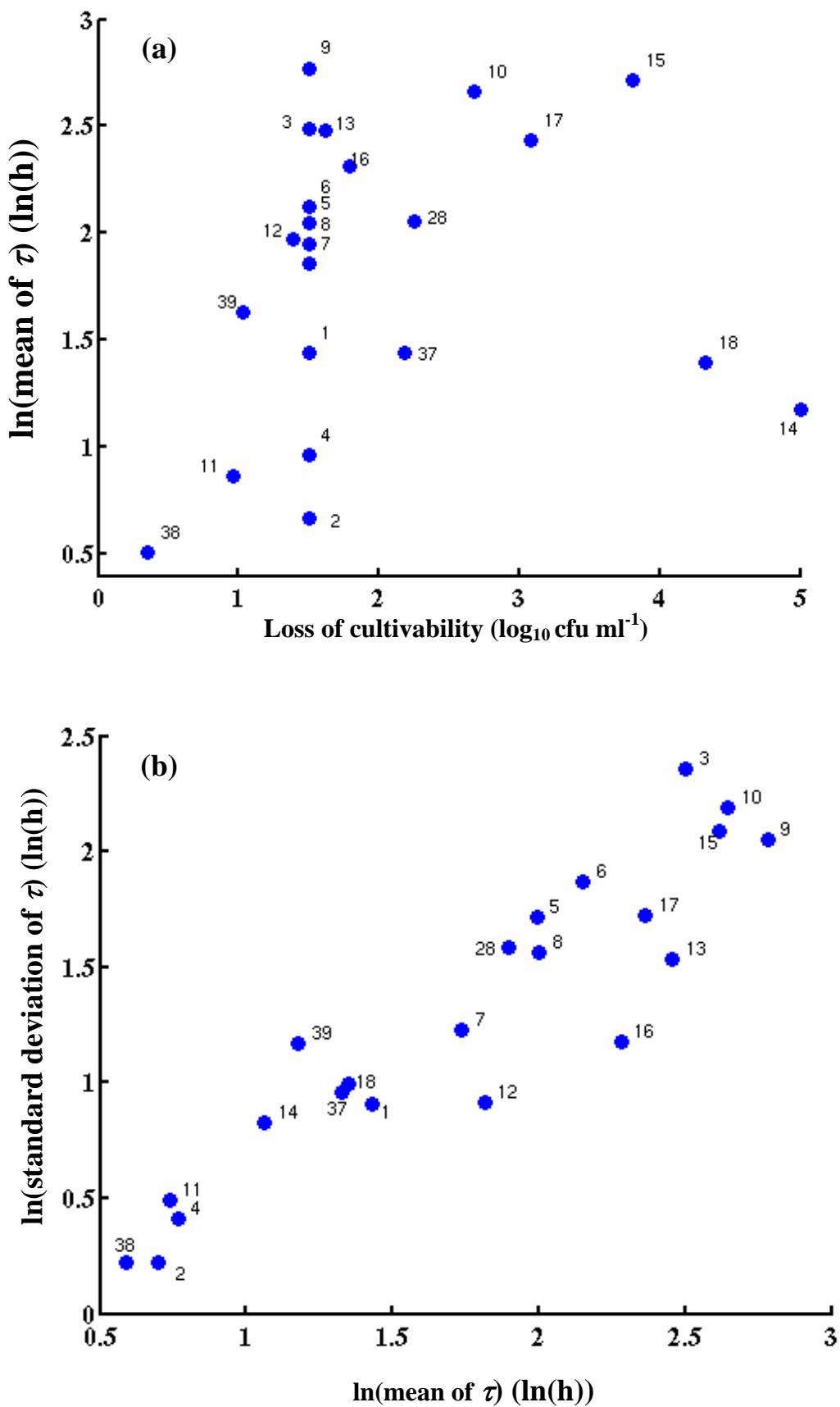
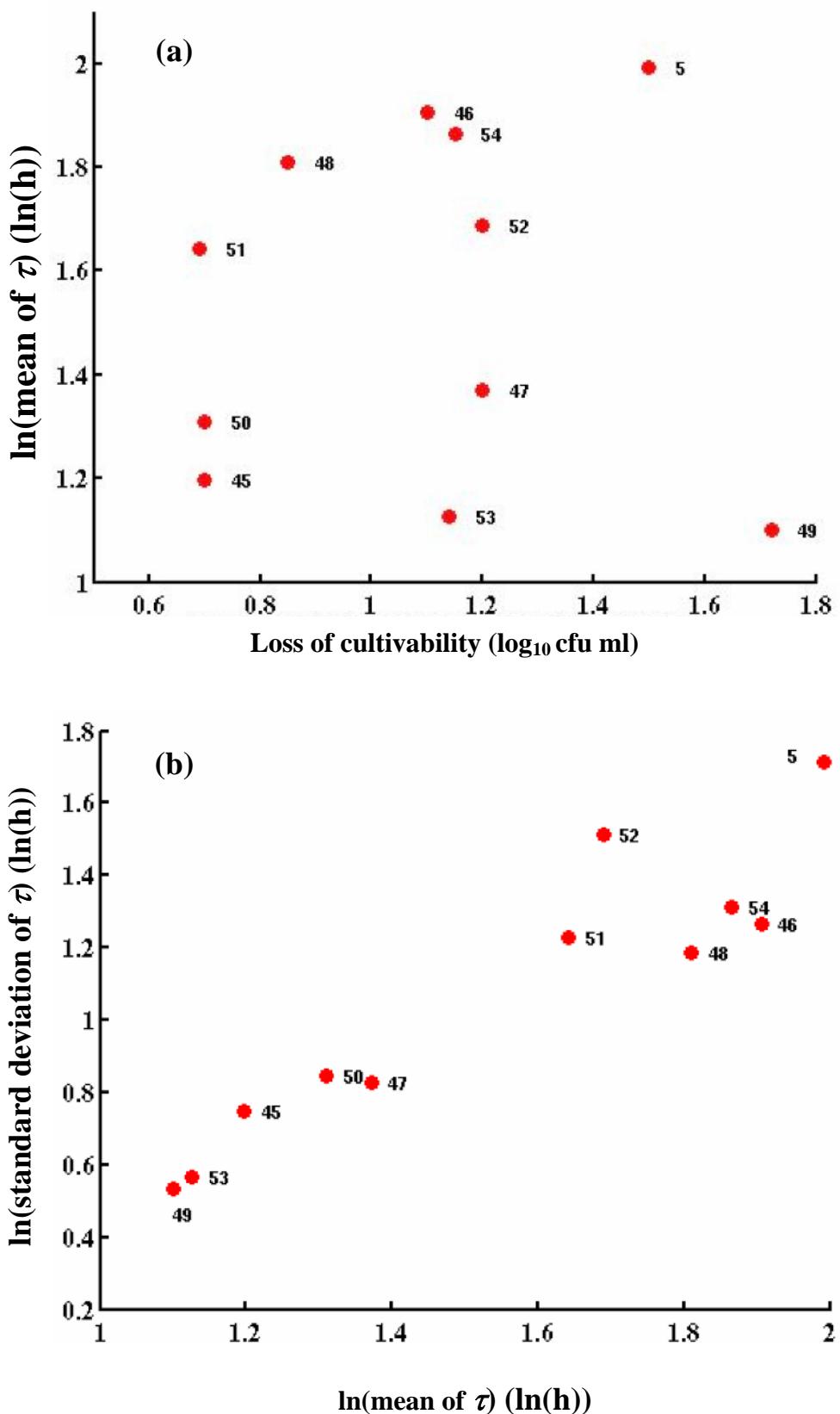


Figure 5



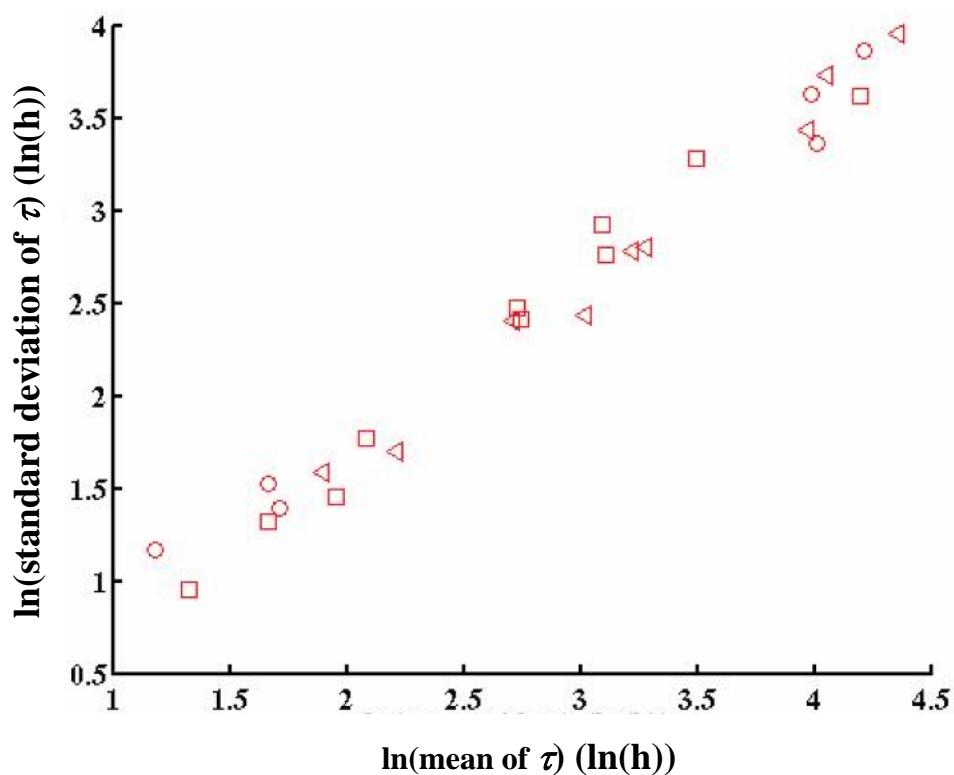
**Figure 6**

Figure 7

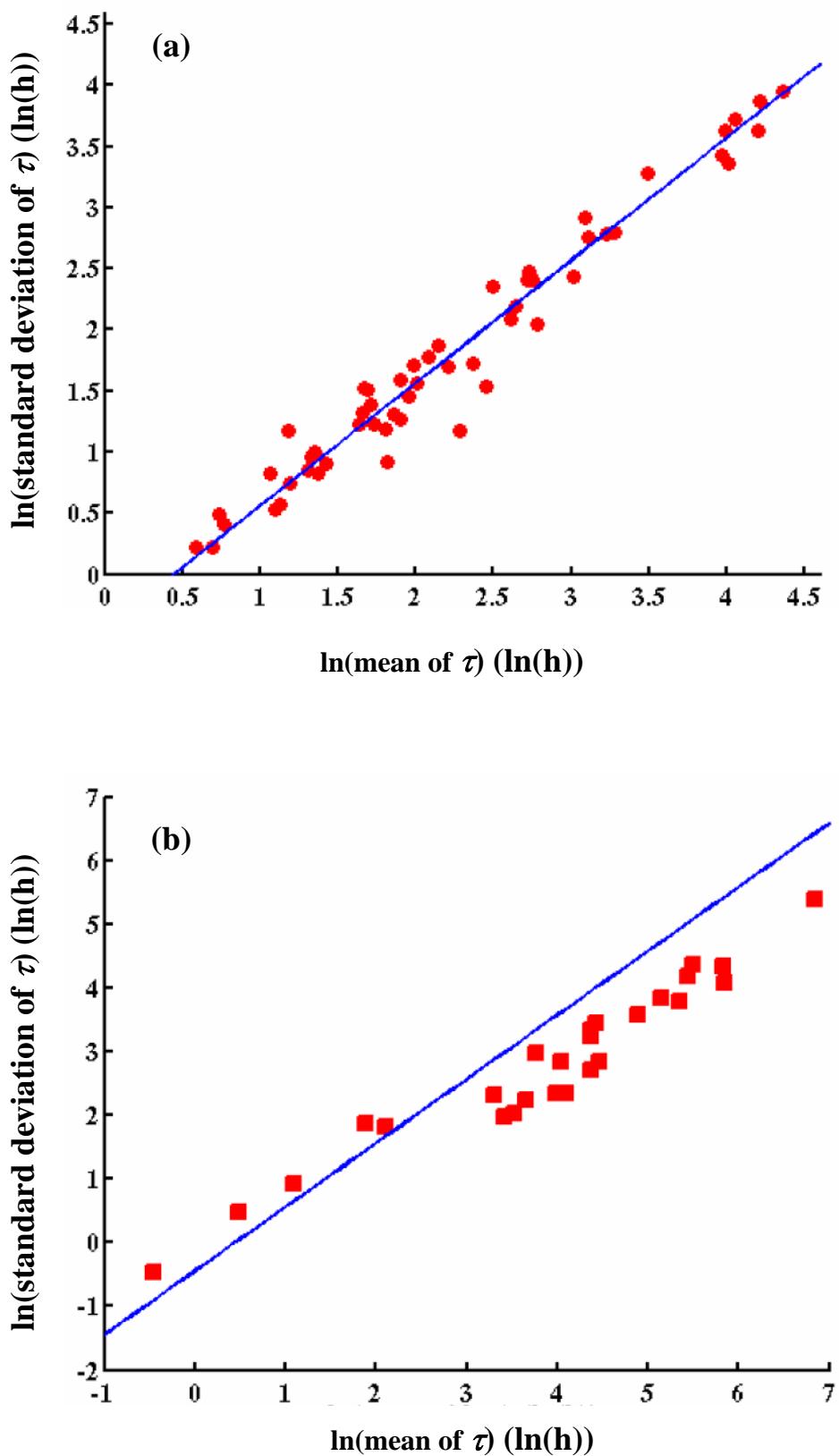


Figure 8

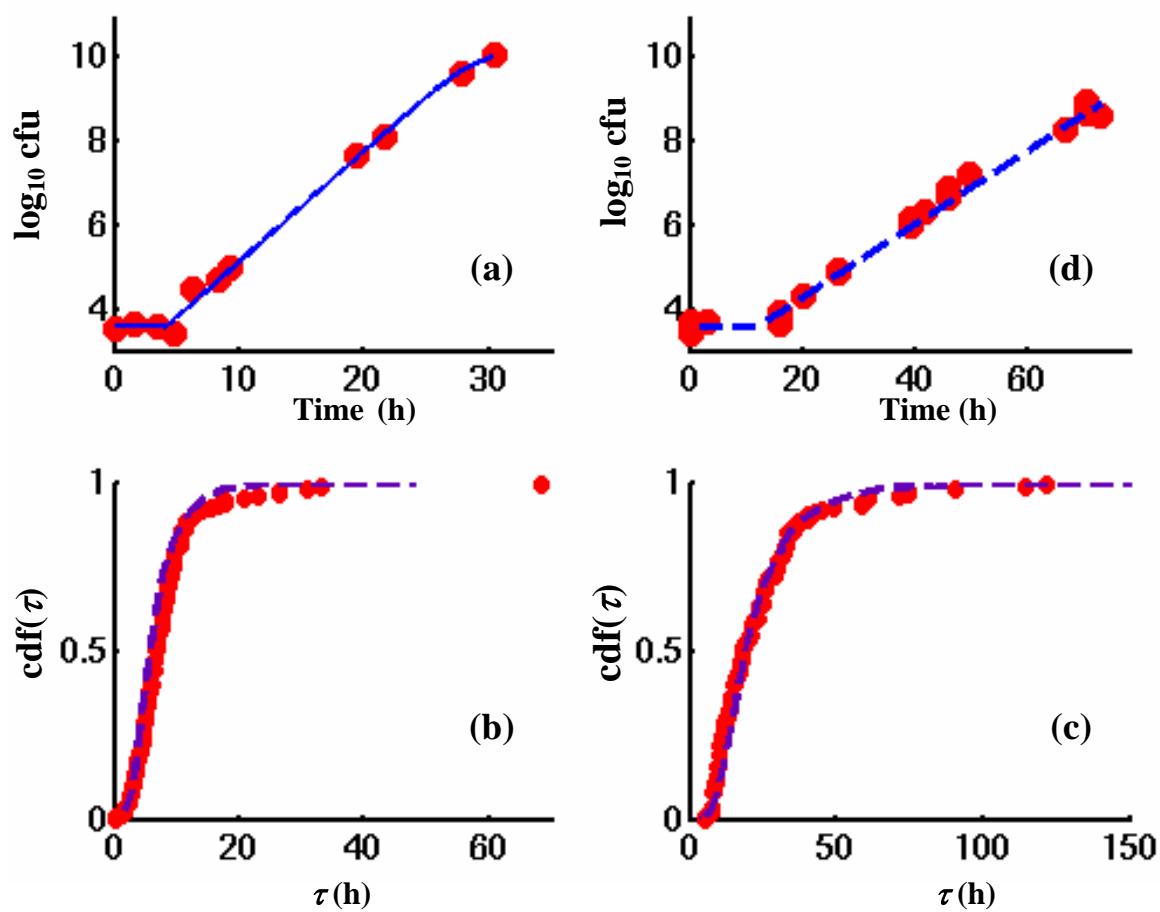


Table 1. Individual cell lag times and population growth parameters of *L. monocytogenes* for 54 different physiological states, growth conditions or strains.

Dataset Strain	Stress encountered	Loss of cultivability on TSAye (log <sub>10</sub> cfu ml <sup>-1</sup> )	Growth conditions			Extreme value II bis distribution (c=5)				Observed growth rate (h <sup>-1</sup> )	Observed population lag (h)	Calculated population lag (h)	
			T (°C)	pH	aw	a	b	Calculated mean of $\bar{D}$ (h)	Calculated standard deviation of $\bar{D}$ (h)				
1	LM14	Lactic acid (pH 4.6 - 48h)	1.5	30	7.1	0.997	-3.70	6.76	4.18	2.47	0.90	-	3.06
2	LM14	HCl	1.5	30	7.1	0.997	-1.97	3.41	2.01	1.25	0.90	-	1.63
3	LM14	BAC	1.5	30	7.1	0.997	-21.43	28.88	12.19	10.56	0.90	-	3.30
4	LM14	Cold (48 h)	1.5	30	7.1	0.997	-2.65	4.13	2.15	1.51	0.90	-	1.64
5	LM14	NaCl (25°C - 25h)	1.5	30	7.1	0.997	-10.36	15.20	7.33	5.56	0.90	-	3.61
6	LM14	Starvation	1.5	30	7.1	0.997	-12.06	17.74	8.59	6.49	0.90	-	3.98
7	LM14	Chlorine	1.5	30	7.1	0.997	-5.20	9.35	5.68	3.42	0.90	-	3.82
8	LM14	NaOH	1.5	30	7.1	0.997	-7.75	13.02	7.41	4.76	0.90	-	4.45
9	LM14	Heat	1.5	30	7.1	0.997	-8.57	21.24	16.16	7.77	0.90	-	10.20
10	LM14	Lactic acid (pH 4.4 – 24h)	1.4	30	7.1	0.997	-1.79	6.81	6.13	2.49	0.90	-	5.01
11	LM14	NaCl (25°C - 48h)	2.7	30	7.1	0.997	-14.40	24.50	14.13	8.96	0.90	-	6.94
12	LM14	NaCl (15°C - 25h)	1.0	30	7.1	0.997	-3.12	4.47	2.09	1.64	0.90	-	1.50
13	LM14	Cold (1 year)	5.0	30	7.1	0.997	-4.41	6.27	2.89	2.29	0.90	-	1.88
14	LM14	Starvation + Heat	3.1	30	7.1	0.997	-7.19	15.32	10.65	5.60	0.90	-	6.84
15	LM14	Starvation + NaCl (25°C - 25h)	1.8	30	7.1	0.997	-0.55	8.89	9.79	3.25	0.90	-	8.11
16	LM14	NaCl (25°C - 25h) + Lactic acid (pH 4.6 - 8h)	3.8	30	7.1	0.997	-11.96	22.04	13.70	8.06	0.90	-	7.46
17	LM14	Lactic acid (pH 4.6 - 8h) + NaCl (25°C - 25h)	1.6	30	7.1	0.997	-3.12	12.68	11.65	4.64	0.90	-	8.79
18	LM14	S1	4.3	30	7.1	0.997	-4.52	7.13	3.78	2.61	0.90	1.87	2.56
19	LM14	S1	4.3	30	7.1	0.970	-10.74	16.10	8.01	5.89	0.58	4.16	4.71
20	LM14	S1	4.3	30	5.5	0.997	-6.55	11.70	7.07	4.28	0.71	3.25	4.79
21	LM14	S1	4.3	30	5.5	0.970	-19.88	30.51	15.64	11.16	0.46	6.33	8.10
22	LM14	S1	4.3	30	Half-Fraser		-6.68	10.26	5.27	3.75	0.78	2.68	3.33
23	LM14	S1	4.3	15	7.1	0.997	-22.39	32.41	15.34	11.85	0.23	7.09	9.47
24	LM14	S1	4.3	15	7.1	0.970	-37.06	50.78	22.06	18.57	0.18	13.93	11.77
25	LM14	S1	4.3	15	6.0	0.980	-27.68	43.08	22.48	15.76	0.21	13.62	13.78
26	LM14	S1	4.3	12	7.1	0.997	-51.74	72.79	33.01	26.62	0.16	13.93	16.36
27	LM14	S1	4.3	12	5.5	0.970	-52.36	102.23	66.65	37.39	0.12	41.16	43.54
28	LM14	S2	2.3	30	7.1	0.997	-8.91	13.39	6.67	4.90	0.90	8.19	3.57
29	LM14	S2	2.3	25	7.1	0.997	-8.31	15.01	9.16	5.49	0.67	8.36	5.99
30	LM14	S2	2.3	20	7.1	0.997	-20.02	30.18	15.12	11.04	0.44	5.02	7.92
31	LM14	S2	2.3	12	7.1	0.997	-45.08	84.31	53.07	30.84	0.17	33.10	31.97
32	LM14	S2	2.3	20	7.1	0.970	-15.89	31.25	20.49	11.43	0.29	12.31	14.12
33	LM14	S2	2.3	20	5.5	0.970	-88.10	142.88	78.25	52.26	0.25	22.66	29.50
34	LM14	S2	2.3	15	7.1	0.997	-74.74	113.46	57.36	41.50	0.23	17.11	21.54
35	LM14	S2	2.3	20	6.0	0.980	-26.39	44.26	25.13	16.19	0.33	12.59	13.93
36	LM14	S2	2.3	20	5.8	0.977	-25.78	44.99	26.60	16.46	-	-	-
37	LM14	S3	2.2	30	7.1	0.997	-4.79	7.42	3.85	2.71	0.90	-	2.54
38	LM14	S4	0.4	30	7.1	0.997	-2.18	3.42	1.80	1.25	0.90	-	1.41

Table 1. Continued

Dataset Strain	Stress encountered	Loss of cultivability on TSAye (log <sub>10</sub> cfu ml <sup>-1</sup> )	Growth conditions			Extreme value II bis distribution (c=5)			Observed growth rate (h <sup>-1</sup> )	Observed population lag (h)	Calculated population lag (h)
			T (°C)	pH	aw	a	b	Calculated mean of $\bar{x}$ (h)	Calculated standard deviation of $\bar{x}$ (h)		
39	LM14	S5	1.0	30	7.1	0.997	-7.02	8.81	3.25	3.22	0.90
40	LM14	S5	1.0	30	7.1	0.970	-9.31	12.54	5.29	4.59	0.58
41	LM14	S5	1.0	30	5.5	0.997	-7.23	10.99	5.56	4.02	0.71
42	LM14	S5	1.0	12	7.1	0.997	-65.54	102.70	54.03	37.56	0.16
43	LM14	S5	1.0	12	7.1	0.970	-36.97	79.05	55.06	28.91	-
44	LM14	S5	1.0	12	5.5	0.997	-83.97	130.26	67.68	47.64	-
45	ADQP101	NaCl	0.7	30	7.1	0.997	-3.41	5.77	3.31	2.11	-
46	ATCC 19115	NaCl	1.1	30	7.1	0.997	-4.59	9.71	6.72	3.55	-
47	Scott A	NaCl	1.2	30	7.1	0.997	-3.34	6.25	3.94	2.29	-
48	INRA 101	NaCl	0.9	30	7.1	0.997	-4.34	8.97	6.11	3.28	-
49	INRA 102	NaCl	1.7	30	7.1	0.997	-2.42	4.66	3.01	1.70	-
50	INRA 103	NaCl	0.7	30	7.1	0.997	-3.71	6.37	3.71	2.33	-
51	UNIR 100	NaCl	0.7	30	7.1	0.997	-5.70	9.34	5.17	3.41	-
52	UNIR 101	NaCl	1.2	30	7.1	0.997	-9.04	12.42	5.41	4.54	-
53	V7	NaCl	1.1	30	7.1	0.997	-2.51	4.81	3.08	1.76	-
54	CLIP 22573	NaCl	1.2	30	7.1	0.997	-5.38	10.17	6.46	3.72	-

Table 2. Mean and standard deviation of the *BIC* criterion for the five distributions fitted to the 54 datasets of individual cell lag times of *L. monocytogenes*.

Distribution	Mean	Standard deviation	Number of times found as best fit (out of 54)
Extreme value type II	-259.5	147.4	25
Extreme value type II bis (shape parameter set to 5)	-233.6	126.0	11
Lognormal	-214.6	122.9	5
Shifted Gamma	-212.5	138.7	4
Shifted Weibull	-203.6	136.4	9

Table 3. Ratios  $D[k]/E[k]$  for the 11 strains of *L. monocytogenes* as a function of the stresses encountered.

Strain	Stress encountered	$D[k]/E[k]$
LM14	Lactic acid (pH 4.6 - 48h)	0.59
LM14	HCl	0.62
LM14	BAC	0.87
LM14	Cold (48 h)	0.70
LM14	NaCl (25°C - 25h)	0.76
LM14	Starvation	0.76
LM14	Chlorine	0.60
LM14	NaOH	0.64
LM14	Heat	0.48
LM14	Lactic acid (pH 4.4 – 24h)	0.41
LM14	NaCl (25°C - 48h)	0.63
LM14	NaCl (15°C - 25h)	0.78
LM14	Cold (1 year)	0.79
LM14	Starvation + Heat	0.53
LM14	Starvation + NaCl (25°C - 25h)	0.33
LM14	NaCl (25°C - 25h) + Lactic acid (pH 4.6 - 8h)	0.59
LM14	Lactic acid (pH 4.6 - 8h) + NaCl (25°C - 25h)	0.40
LM14	S1	0.71
LM14	S2	0.65
LM14	S3	0.75
LM14	S4	0.70
LM14	S5	0.69
ADQP101	NaCl	0.64
ATCC 19115	NaCl	0.53
Scott A	NaCl	0.58
INRA 101	NaCl	0.54
INRA 102	NaCl	0.57
INRA 103	NaCl	0.63
UNIR 100	NaCl	0.66
UNIR 101	NaCl	0.84
V7	NaCl	0.57
CLIP 22573	NaCl	0.58
<i>Mean</i>		0.63
<i>Standard deviation</i>		0.12

## V. Application de la démarche de modélisation des temps de latence cellulaires. Prévision des distributions de latence cellulaires dans plusieurs conditions à partir d'un ou plusieurs temps de latence populationnels.

Nous disposons pour l'état physiologique S1 de dix courbes de croissance avec des inoculums forts. Nous avons dans un premier temps confronté les observations aux prévisions des distributions des temps de latence cellulaires dans les dix conditions d'accueil obtenues à partir de chacune des dix courbes de croissance populationnelles. Nous avons procédé de la façon suivante :

- ❶ Nous avons déterminé à l'aide du modèle primaire logistique avec délai et rupture (Rosso, 1996) le temps de latence populationnel dans les conditions environnementales A :  $lag_A$ .

$$\ln x(t) = \begin{cases} \ln x_0, & t \leq lag_A \\ \ln x_{\max} - \ln \left\{ 1 + \left( \frac{x_{\max}}{x_0} - 1 \right) \cdot \exp[-\mu_{\max} \cdot (t - lag_A)] \right\}, & t > lag_A \end{cases}$$

- ❷ Nous avons ensuite estimé la moyenne des temps de latence cellulaires dans les mêmes conditions environnementales,  $E[\tau_A]$ , à l'aide du temps de latence populationnel :

$$\ln(lag_A) = 0.907 \cdot \ln(E[\tau_A]) - 0.311$$

- ❸ L'écart type des temps de latence cellulaires,  $D[\tau_A]$ , est ensuite estimé par la relation

$$\ln(D[\tau_A]) = 1.004 \cdot \ln(E[\tau_A]) - 0.477$$

- ❹ Nous retrouvons les deux paramètres de la distribution EVIIb avec les relations suivantes :

$$E[\tau_A] = a_A + 1.1642 \cdot b_A$$

$$D[\tau_A] = 0.3658 \cdot b_A$$

- ❺ Nous avons tous les éléments pour prévoir la distribution des temps de latence cellulaires dans les conditions environnementales A. Il est possible de déterminer la fonction de répartition de la distribution EVIIb :

$$cdf(\tau_A) = \exp \left( - \left( \frac{\tau_A - a_A}{b_A} \right)^{-5} \right),$$

ou de tirer au sort des valeurs de temps de latence cellulaires :

$\tau_A = a_A + b_A \cdot \left( -\ln(u(0,1))^{-\frac{1}{5}} \right)$ , où  $u(0,1)$  est un nombre tiré au sort dans une distribution uniforme de bornes [0,1].

- ❻ Ensuite pour déterminer les distributions des temps de latence cellulaires pour d'autres conditions environnementales B, nous utilisons la relation suivante :

$\tau_B = \frac{\tau_A \cdot \mu_{\max,A}}{\mu_{\max,B}}$ , où les taux de croissance  $\mu_{\max,A}$  et  $\mu_{\max,B}$  sont prédits par le nouveau modèle secondaire que nous avons présenté dans l'article 1.

⑦ Enfin nous pouvons prédire le temps de latence populationnel pour toute taille d'inoculum grâce à la relation de Katalik et al. (2005a) :

$$\text{lag}(x_0) = -\frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln\left(\frac{1}{x_0} \sum_{i=1}^{x_0} \exp(-\mu_{\max} \cdot \tau)\right).$$

Ce temps de latence de la population  $x_0$  et le taux de croissance prédit par le modèle secondaire de l'article 1 peuvent ensuite être utilisés dans un modèle primaire de croissance.

Les Figures 20-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 reprennent les étapes ① à ⑥ pour les 10 combinaisons. Les prévisions des  $\tau_A$  obtenues à partir des cinétiques de croissance avec des inoculum forts sont globalement satisfaisantes quand bien même la qualité des dénombrements pour les prévisions de  $\text{lag}_A$  (point de départ de toute notre démarche) n'est pas optimale (du point de vue du nombre de dénombrements dans la phase de latence et la phase exponentielle). Au final, seule la prévision réalisée à partir de la courbe de croissance à 30°C, pH 7.1 et  $a_w$  0.997 entraîne une sous-estimation nette de la prévision des temps de latence cellulaires dans la même condition ( $\tau_A$ ) et dans les autres conditions ( $\tau_B$ ). Les prévisions des temps de latence cellulaires semblent également sous-estimées pour la condition à 12°C, pH 5.5 et  $a_w$  0.97 quel que soit le temps de latence populationnel de départ. La sous estimation des temps de latence  $\tau_B$  pour cette condition n'est pas dûe à une surestimation du taux de croissance. En effet, le taux de croissance prédit est légèrement plus faible que le taux de croissance observé (0.12 contre 0.10 h<sup>-1</sup>).

Afin de mieux visualiser la qualité de nos prévisions, nous avons regroupé pour une même distribution des temps de latence cellulaires toutes les prévisions réalisées ( $\tau_B$ ) à partir des dix temps de latence populationnels (Figure 21). Les prévisions des temps de latence cellulaires dans des conditions « défavorables » de température, pH et d'activité de l'eau sont plus courtes que les observations quand le temps de latence populationnel utilisé est estimé pour des conditions favorables. En revanche, en utilisant un temps de latence populationnel estimé pour des conditions « défavorables », les prévisions des temps de latence cellulaires dans les conditions favorables sont surestimées.

En appliquant la même démarche pour l'état physiologique S4, nous avons constaté le même phénomène de sous-estimation ou de surestimation des prévisions par rapport aux observations, selon la nature des conditions environnementales dans lesquelles les temps de latence populationnels sont estimés (Figure 22).

Ces observations laissent à penser que le produit  $\mu_{\max}^* \tau$  n'est pas tout à fait constant dans différentes conditions de re-croissance pour un même état physiologique. Ce produit augmente quand les conditions deviennent plus défavorables. Mais faute de plus de conditions d'accueil et répondant au critère de parcimonie, il semble plus prudent de conserver l'hypothèse de la constance de ce produit pour un état physiologique.

Une conséquence importante de ces observations est que pour la prévision des temps de latence cellulaires dans une condition environnementale, il est souhaitable de déterminer expérimentalement le temps de latence populationnel dans une condition identique ou plus favorable afin de ne pas prédire des temps de latence plus longs.

Ensuite, nous avons déterminé les temps de latence populationnels dans des conditions environnementales B ( $lag_B$ ) à partir des temps de latence cellulaires prédits ( $\tau_B$ , étapes **①** à **⑥**) comme nous l'avons décrit dans le point **⑦**. Plusieurs exemples sont présentés sur les Figures 23-1,2,3,4,5,6,7,8,9 et 10. Les prévisions de la croissance pour des inoculum forts sont cohérentes avec les observations. A notre connaissance ces résultats sont les premiers résultats expérimentaux qui viennent valider l'approche de modélisation de Baranyi (1998, 2002) du temps de latence populationnel à partir des temps de latence cellulaires. Les différences entre observations et prévisions sont moins marquées que pour les temps de latence cellulaires, mais nous retrouvons la même surestimation des temps de latence populationnels quand le point de départ correspond à la condition 12°C, pH 5.5 et  $a_w$  0.97. Donc, afin de se placer du côté sécuritaire des prévisions, il est préférable de réaliser la détermination du temps de latence populationnel dans des conditions proches des conditions optimales.

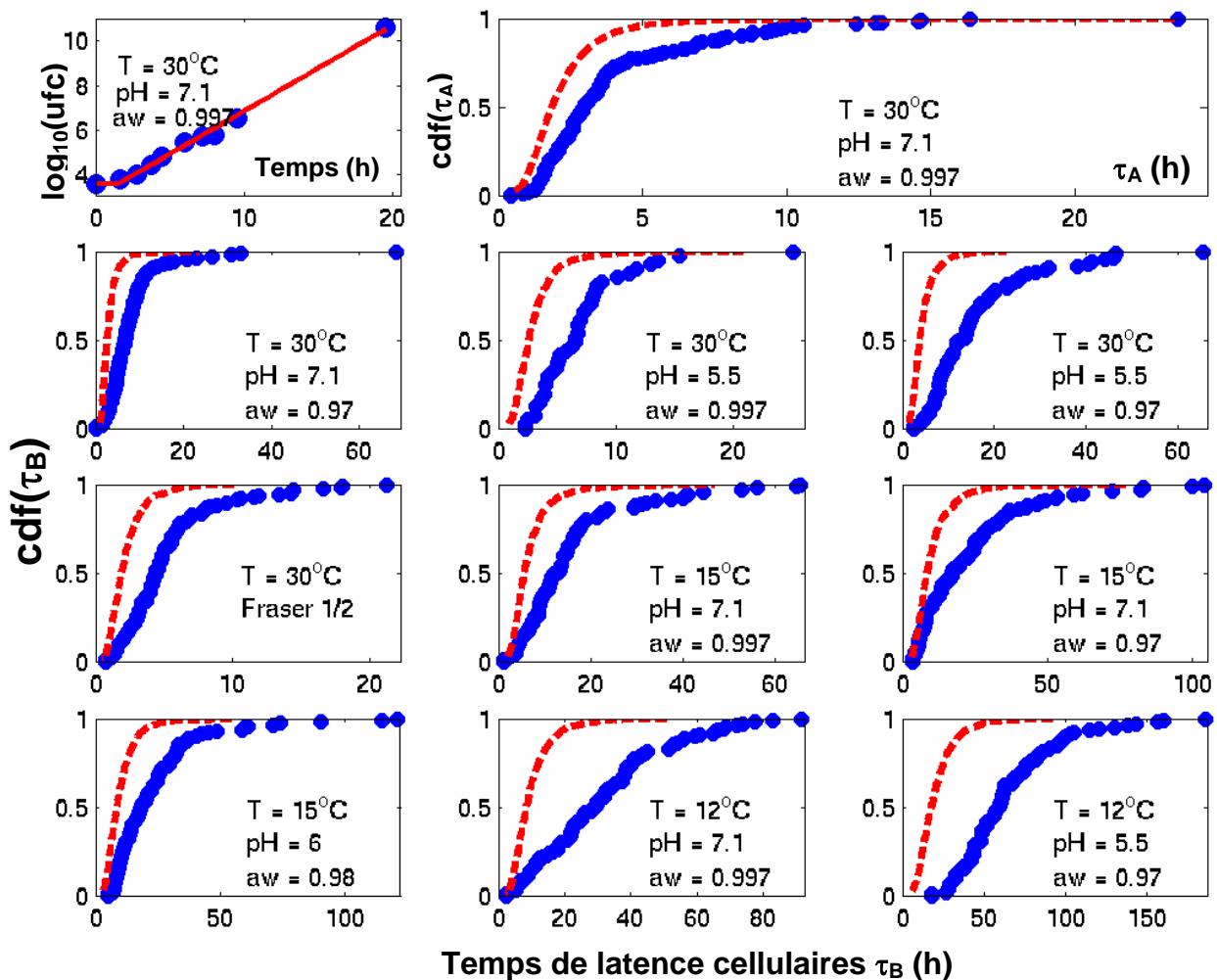


Figure 20-1. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 7.1$  et  $a_w 0.997$ .

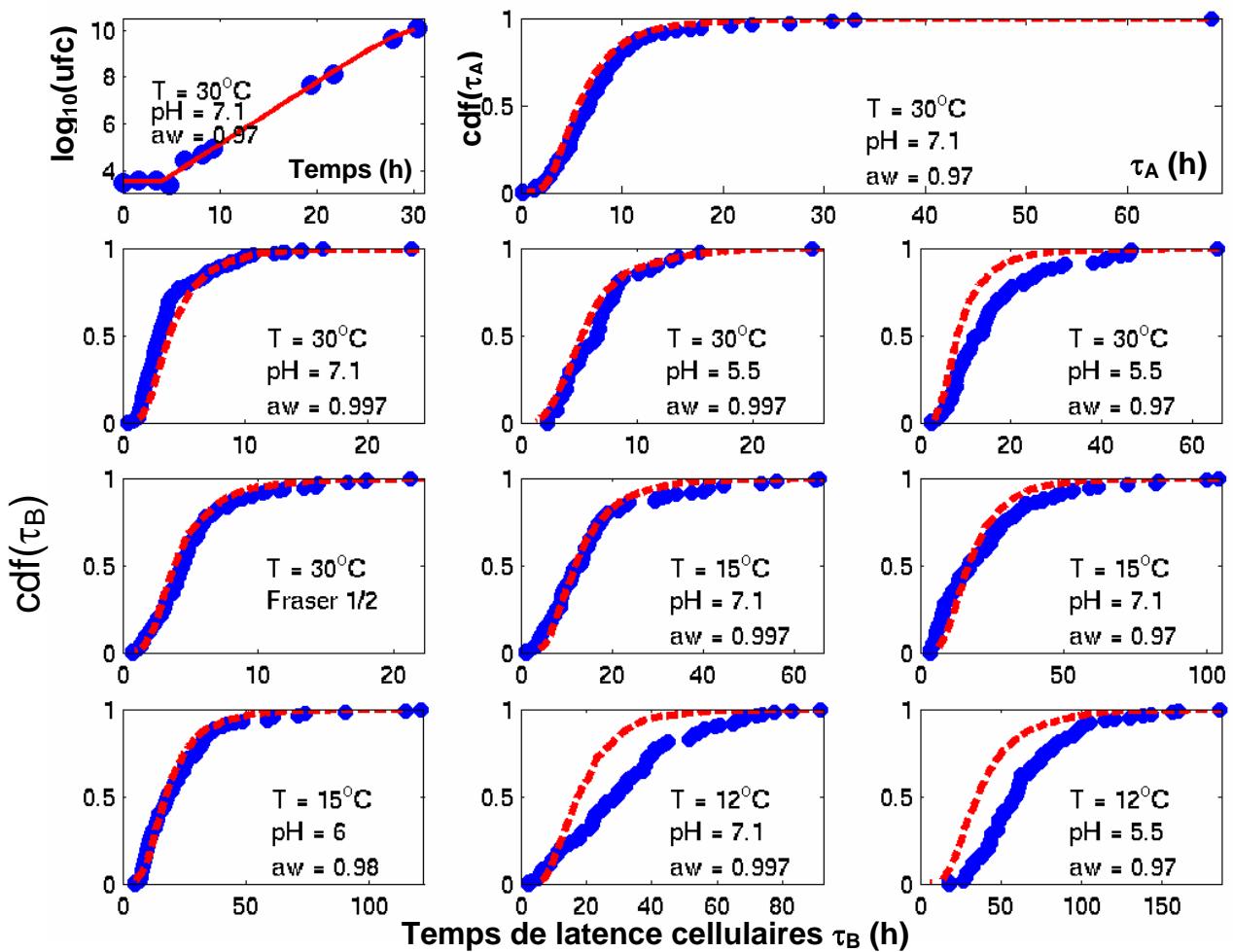


Figure 20-2. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ , pH 7.1 et  $a_w$  0.97.

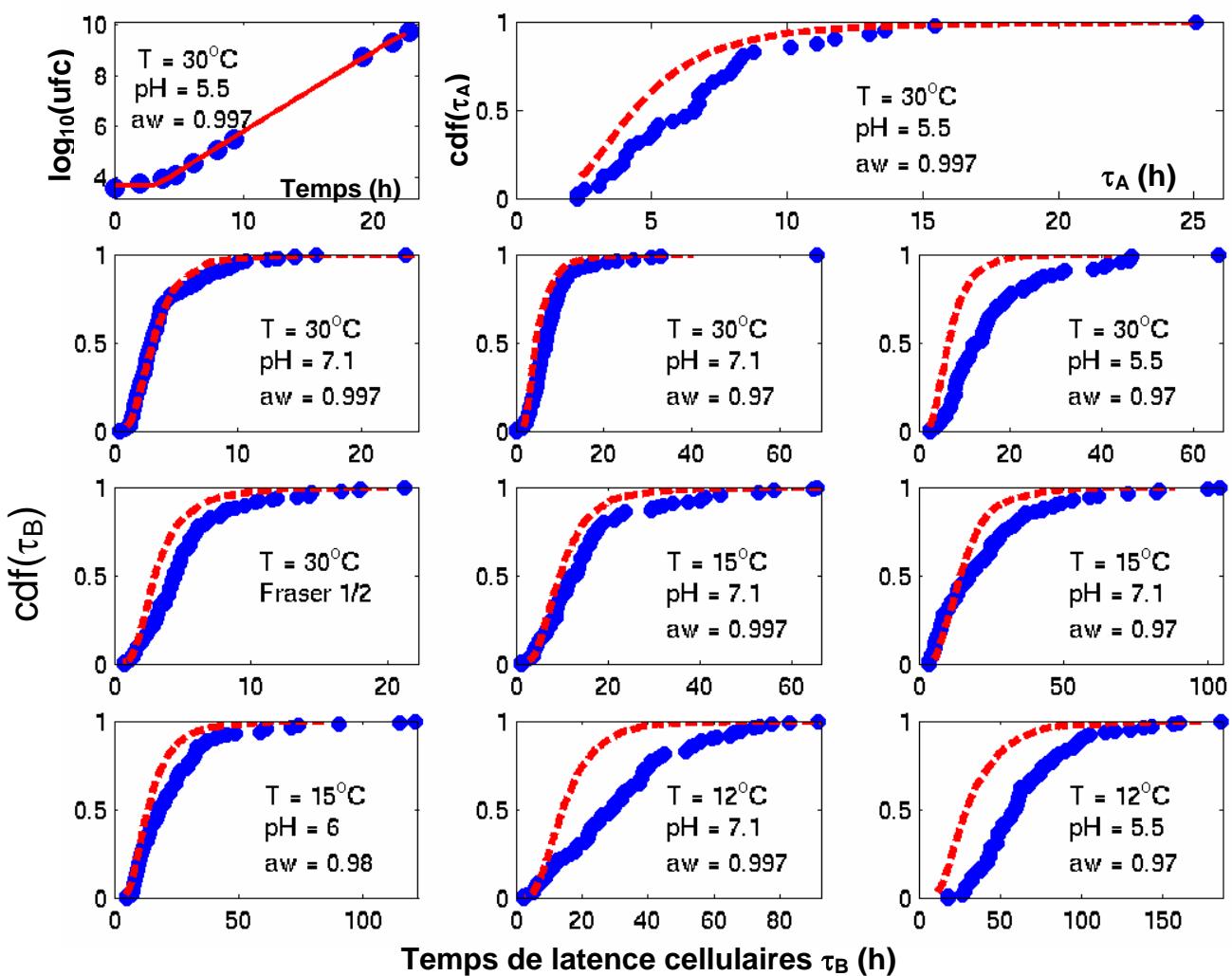


Figure 20-3. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.5 et  $a_w$  0.997.

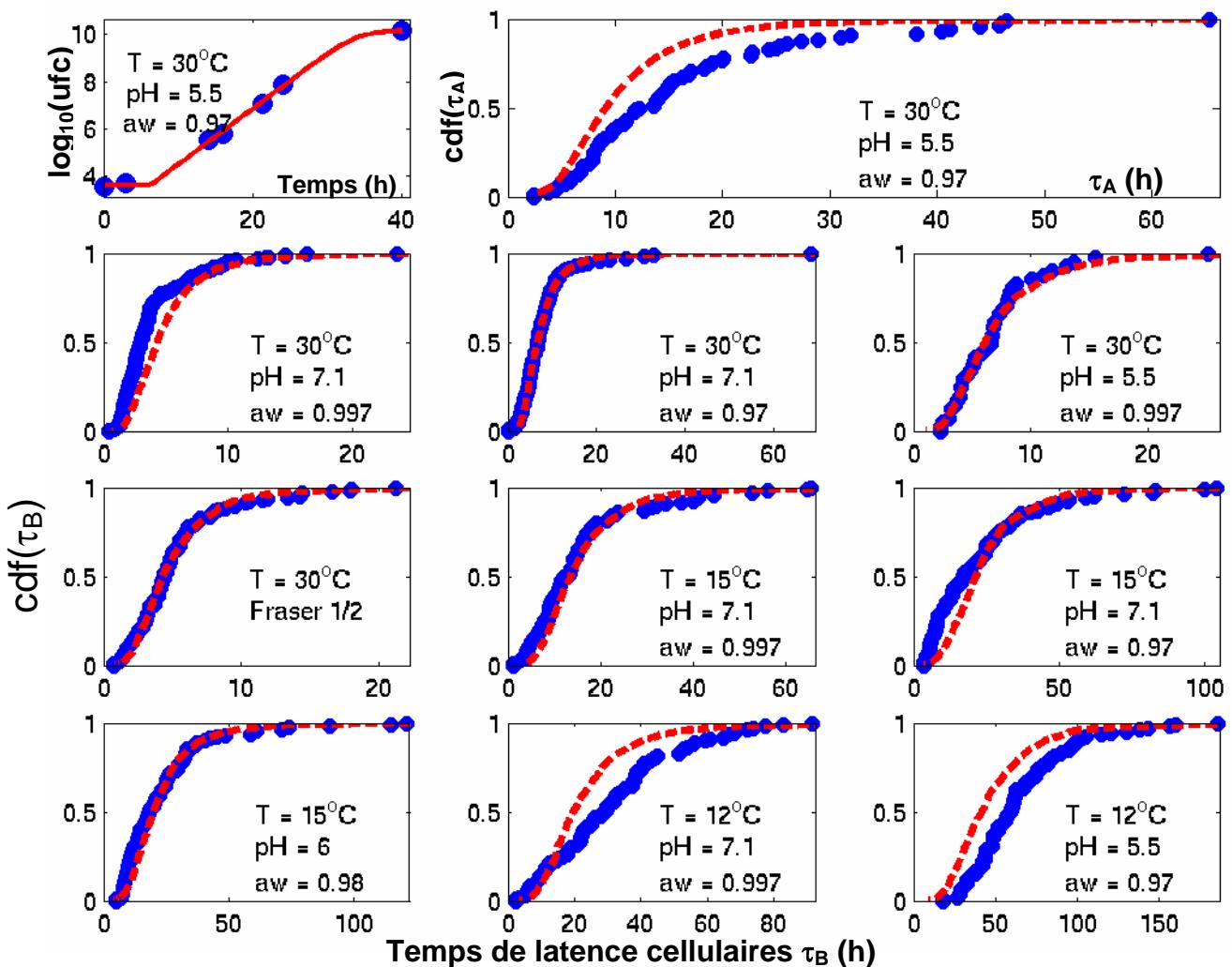


Figure 20-4. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 5.5$  et  $\text{a}_w 0.97$ .

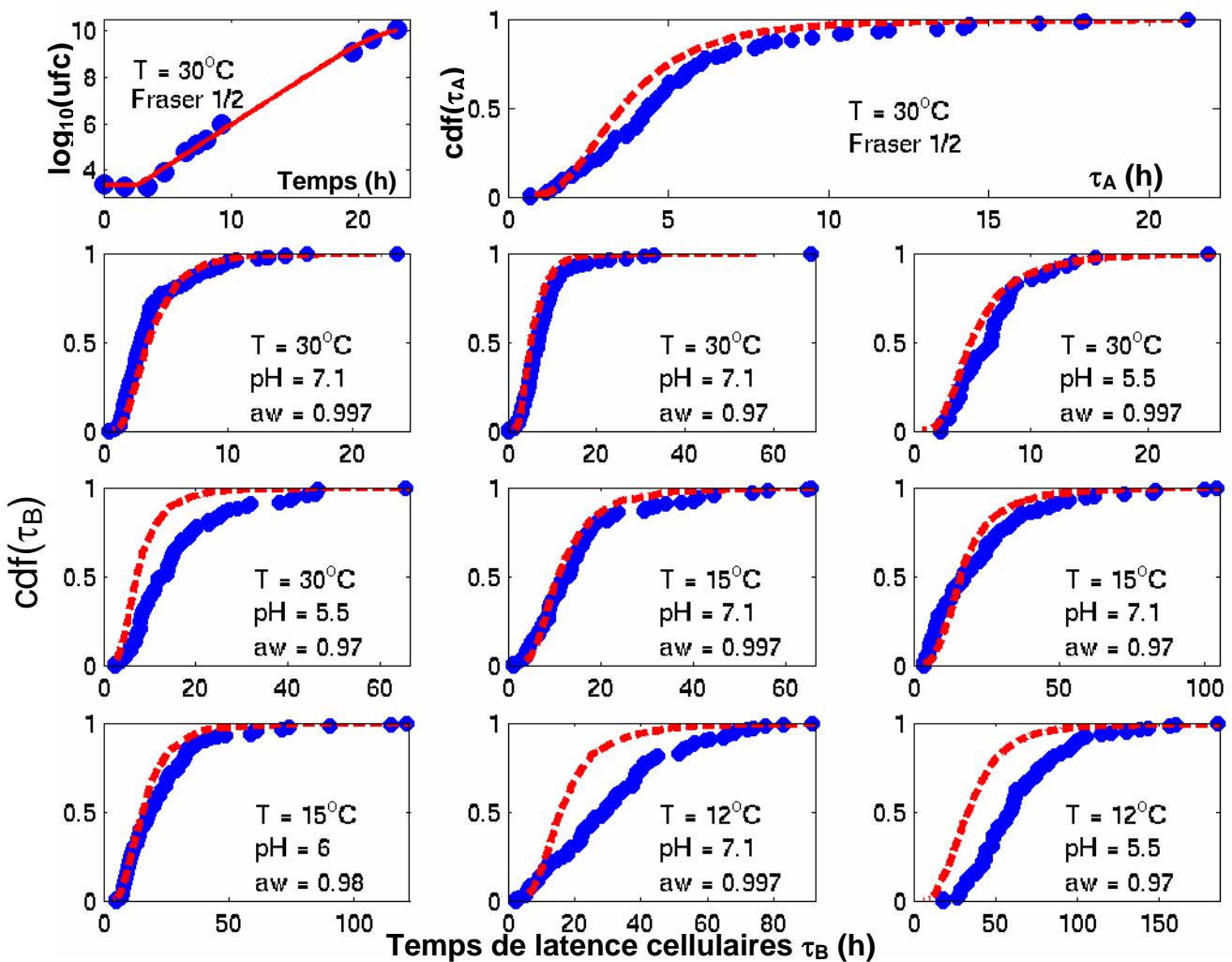


Figure 20-5. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$  Fraser 1/2.

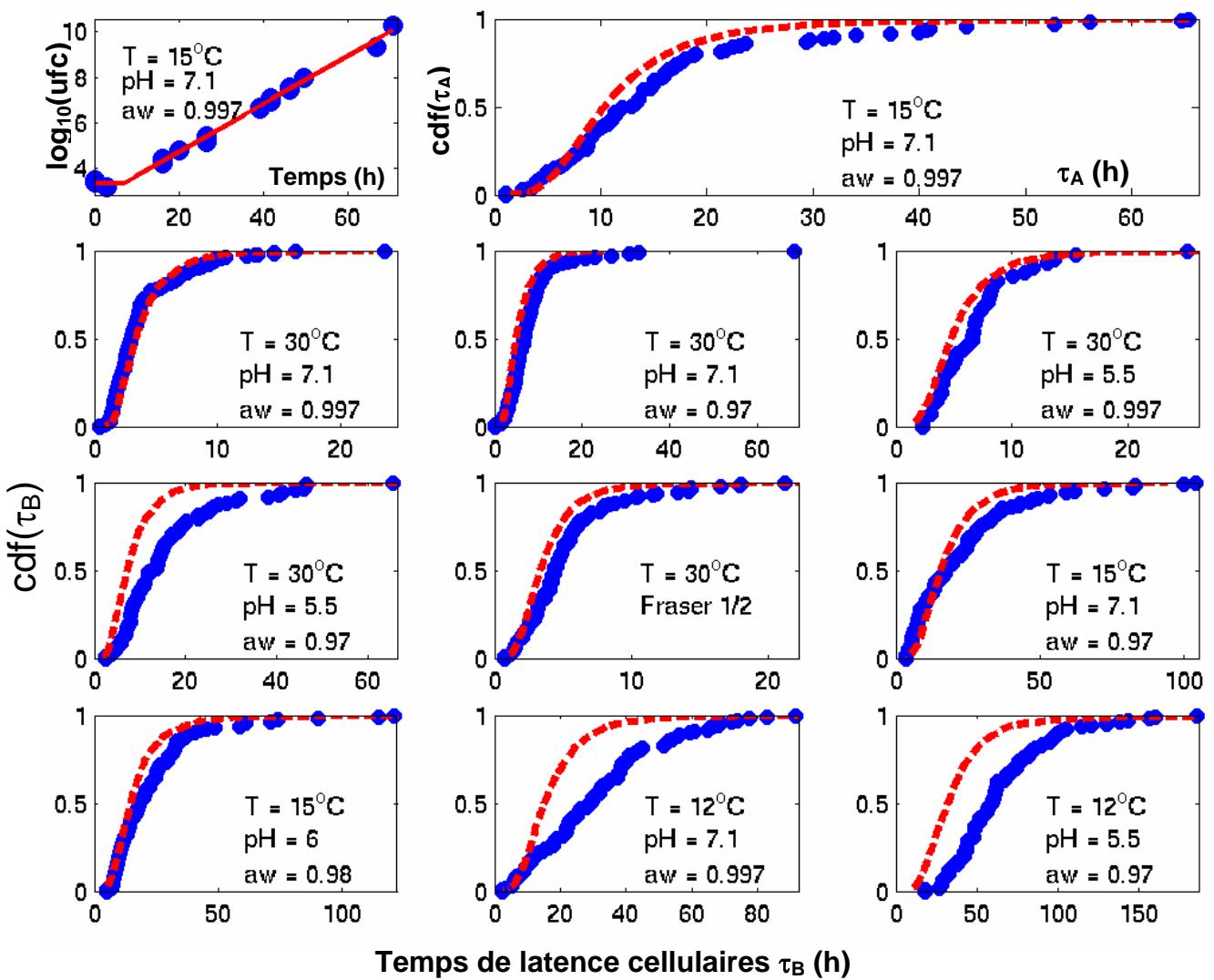


Figure 20-6. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $15^\circ\text{C}$ , pH 7.1 et  $a_w$  0.997.

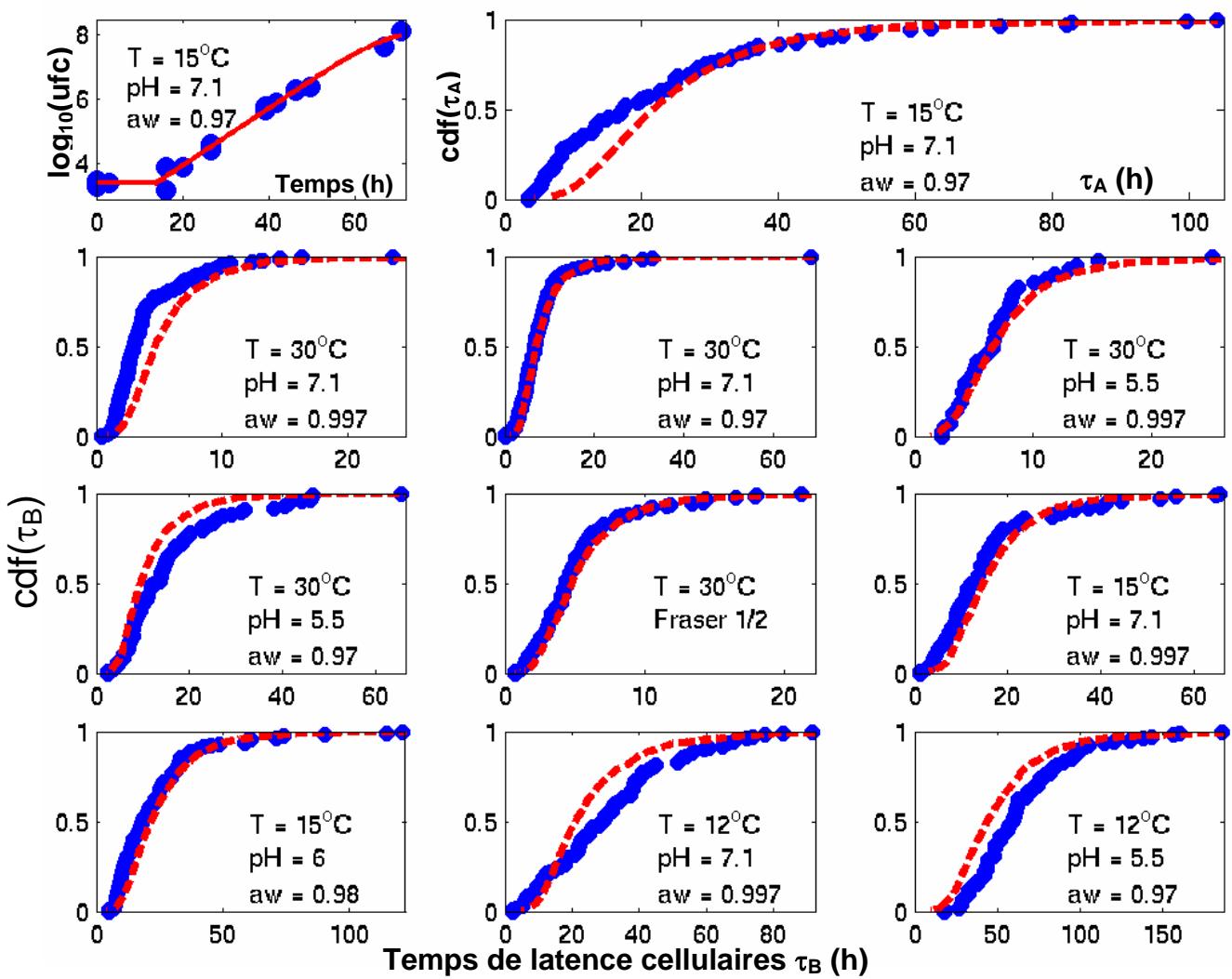


Figure 20-7. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à 15°C, pH 7.1 et  $a_w$  0.97.

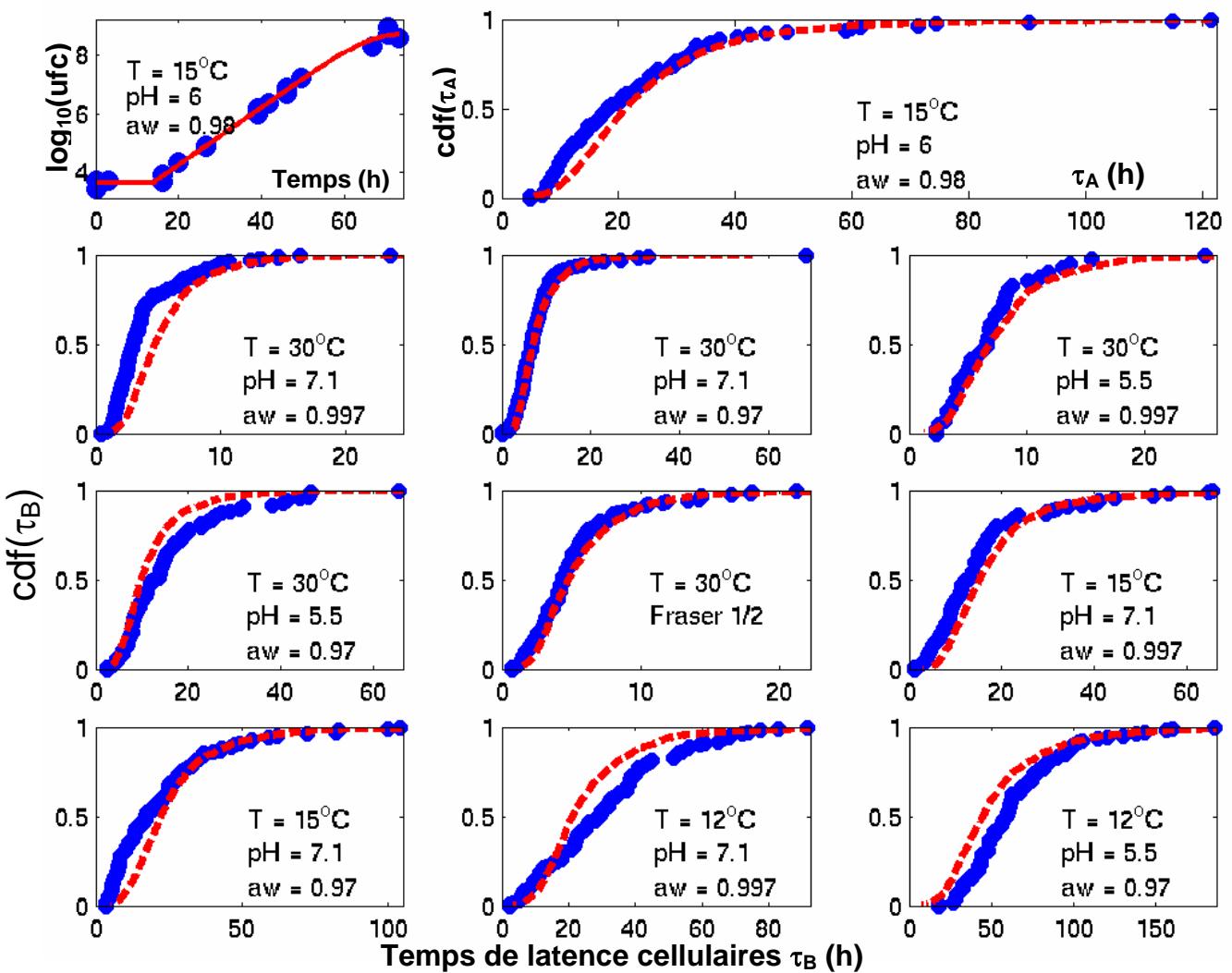


Figure 20-8. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $15^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 6$  et  $a_w 0.98$ .

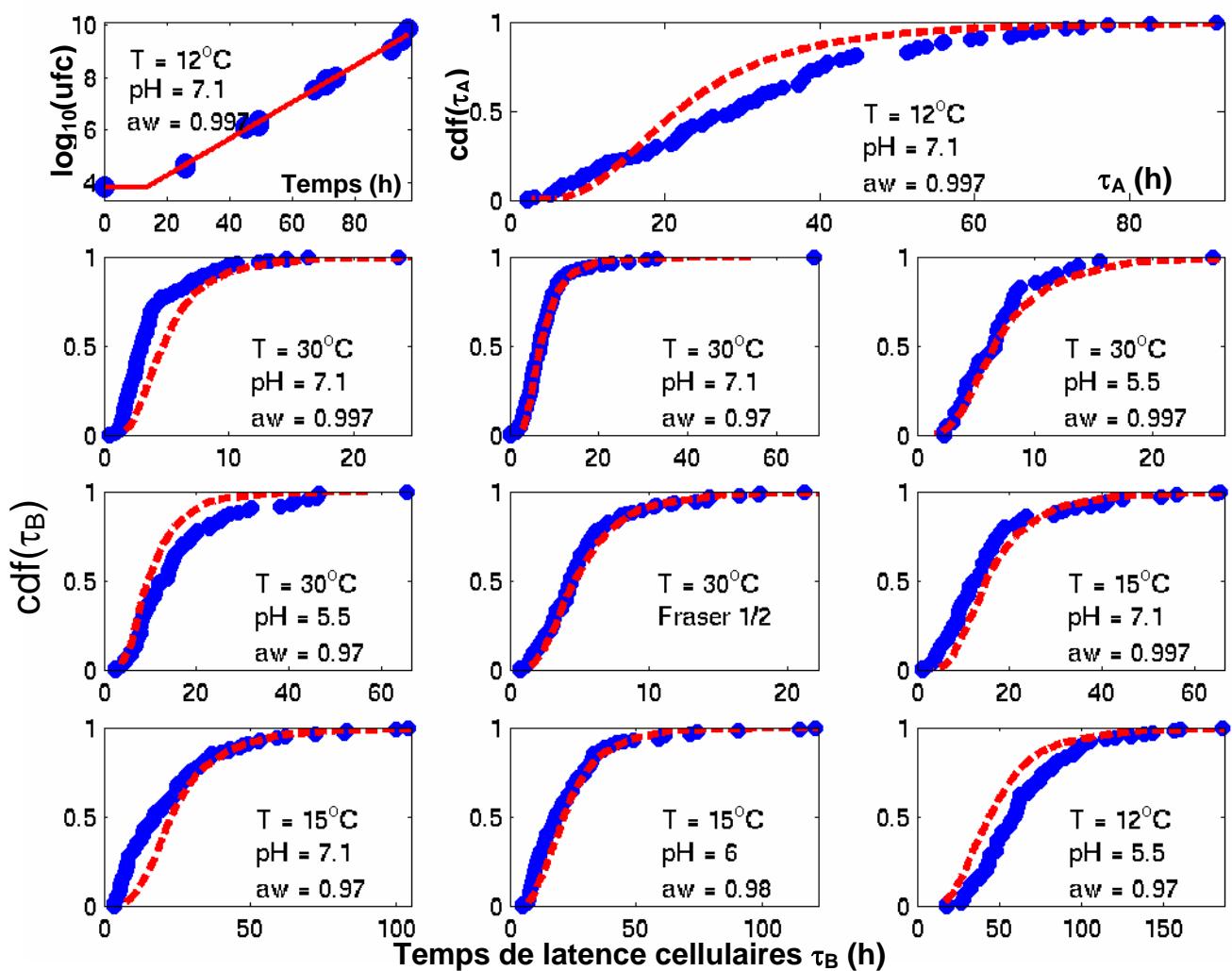


Figure 20-9. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $12^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 7.1$  et  $a_w 0.997$ .

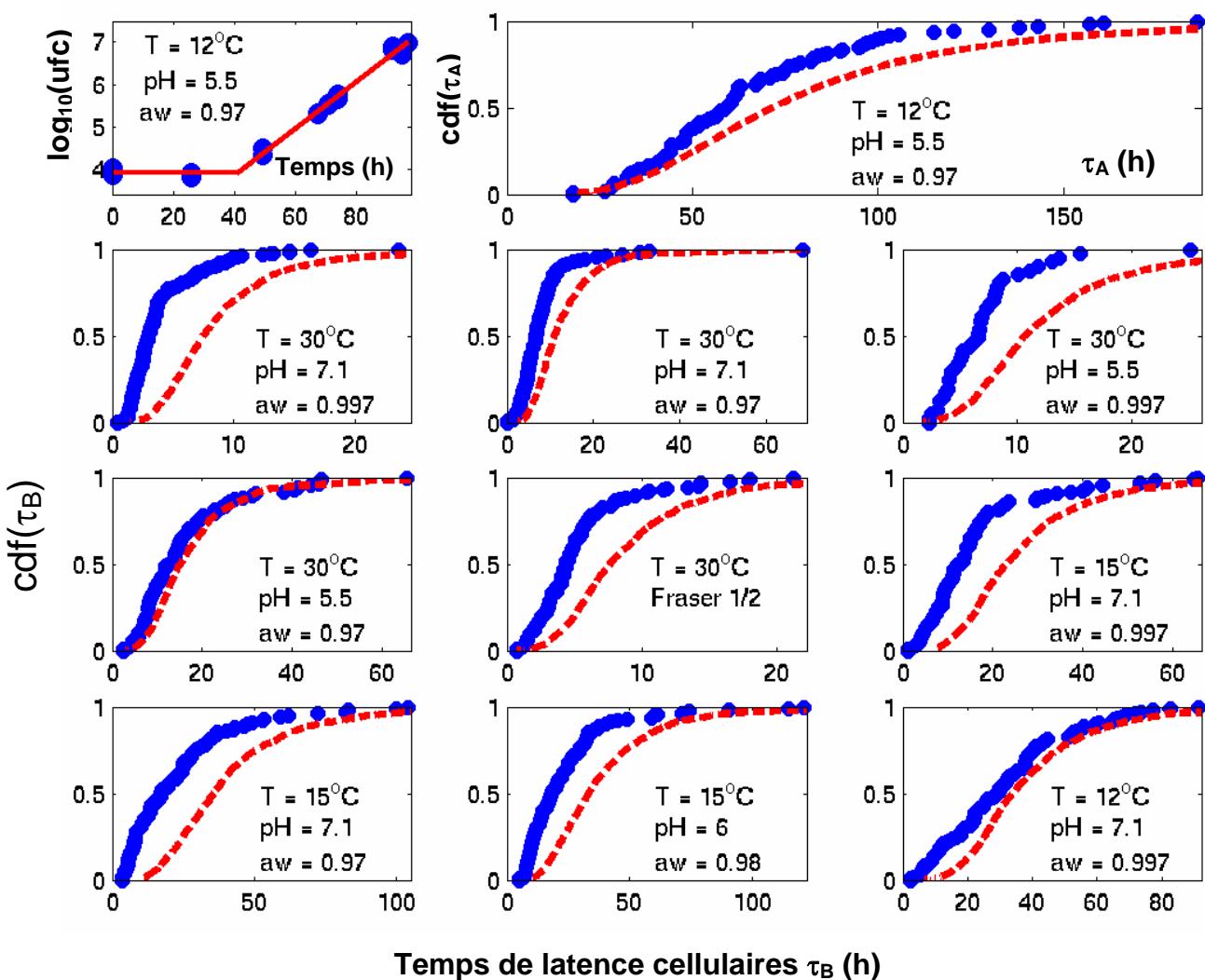


Figure 20-10. Observations (●) et prévisions (--) des distributions des temps de latence cellulaires en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 5.5$  et  $a_w 0.97$ .

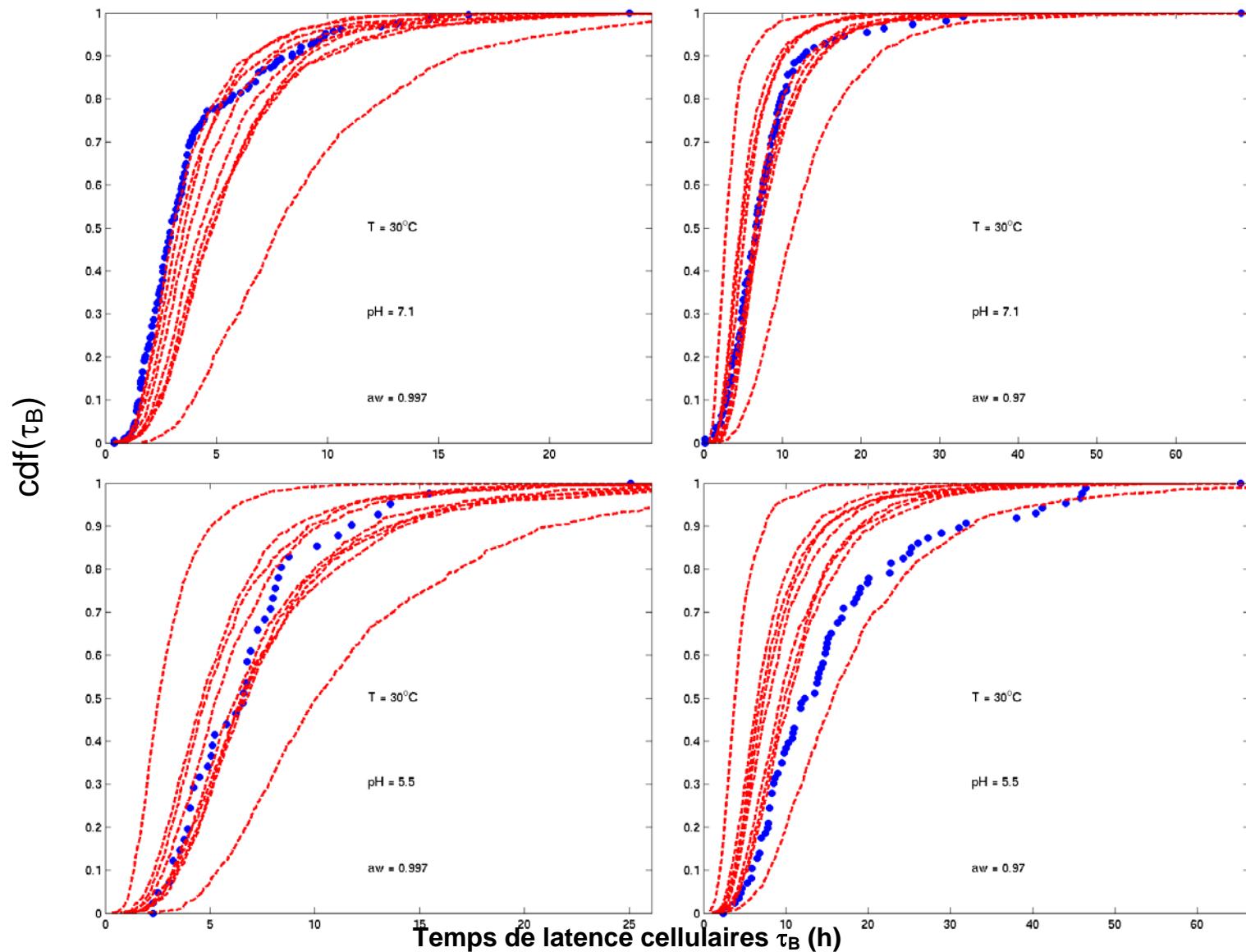


Figure 21-1. Observations (●) et prévisions (--) des distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1 (#18) à partir des temps de latence populationnels dans d'autres conditions environnementales

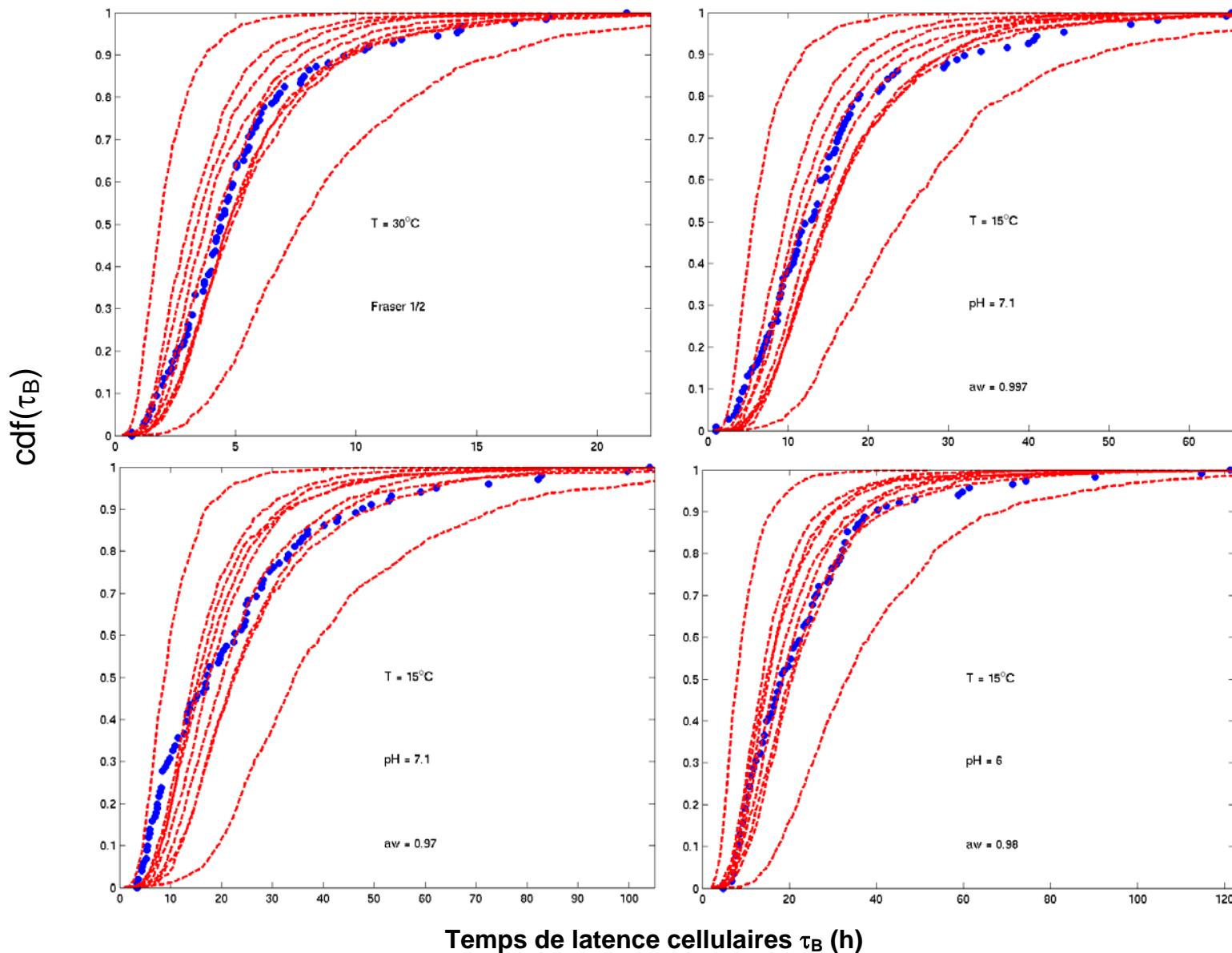


Figure 21-2. Observations (●) et prévisions (--) des distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1 (#18) à partir des temps de latence populationnels dans d'autres conditions environnementales

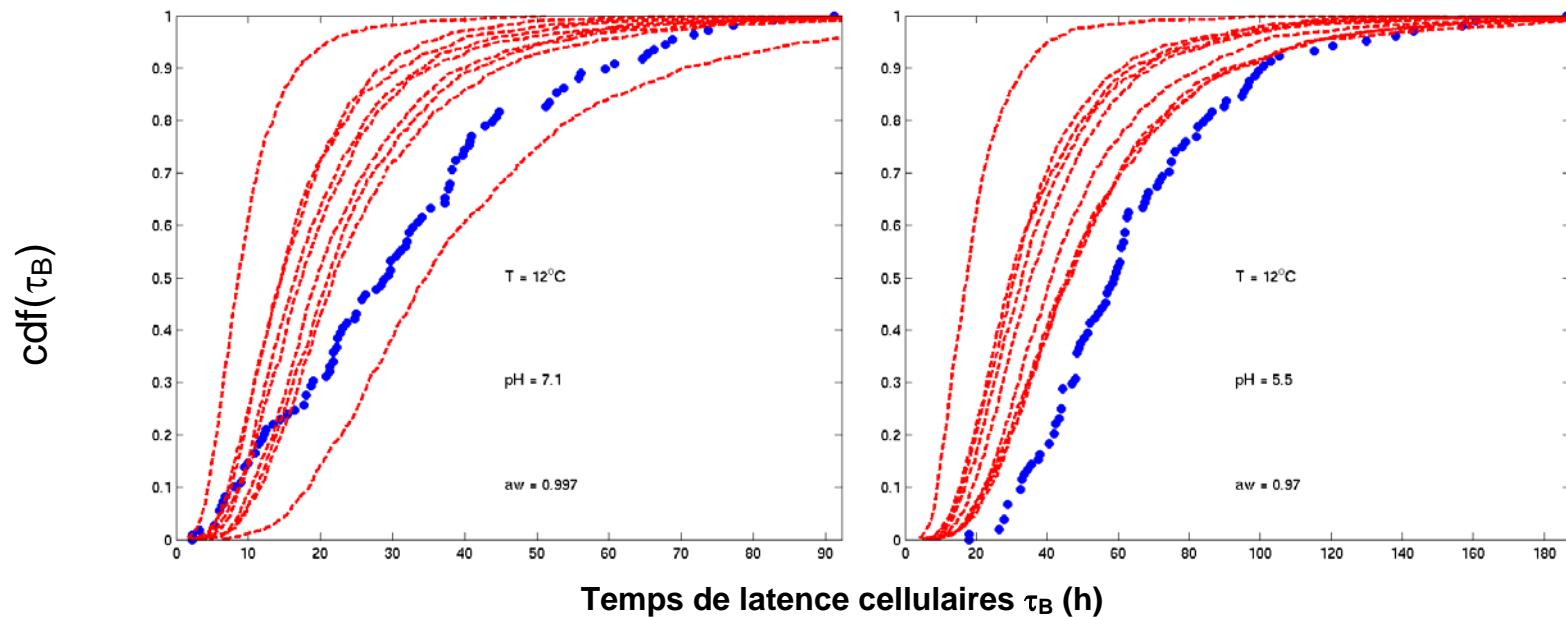


Figure 21-3. Observations (●) et prévisions (--) des distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1 (#18) à partir des temps de latence populationnels dans d'autres conditions environnementales

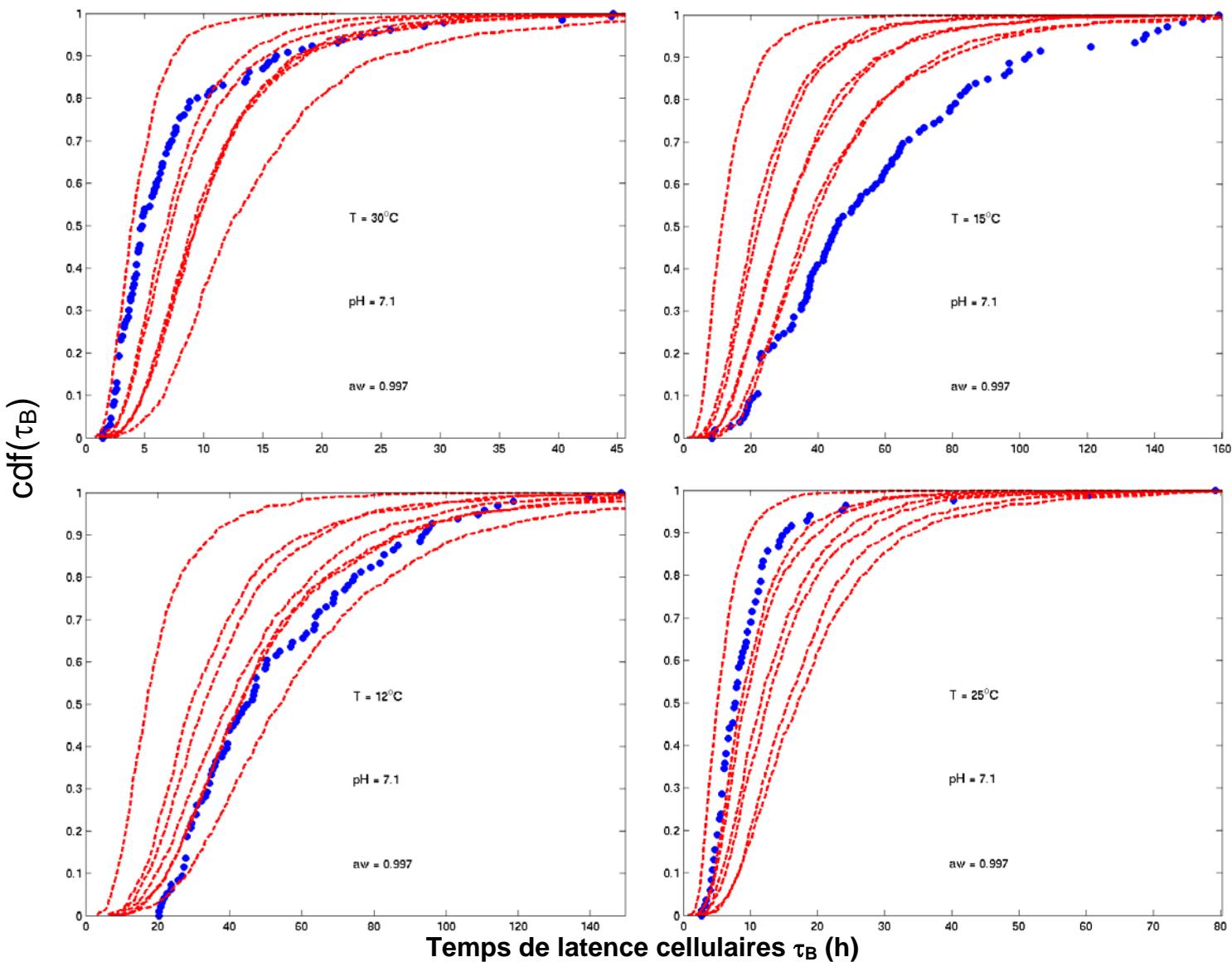


Figure 22-1. Observations (●) et prévisions (--) des distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S4 (#21) à partir des temps de latence populationnels dans d'autres conditions environnementales.

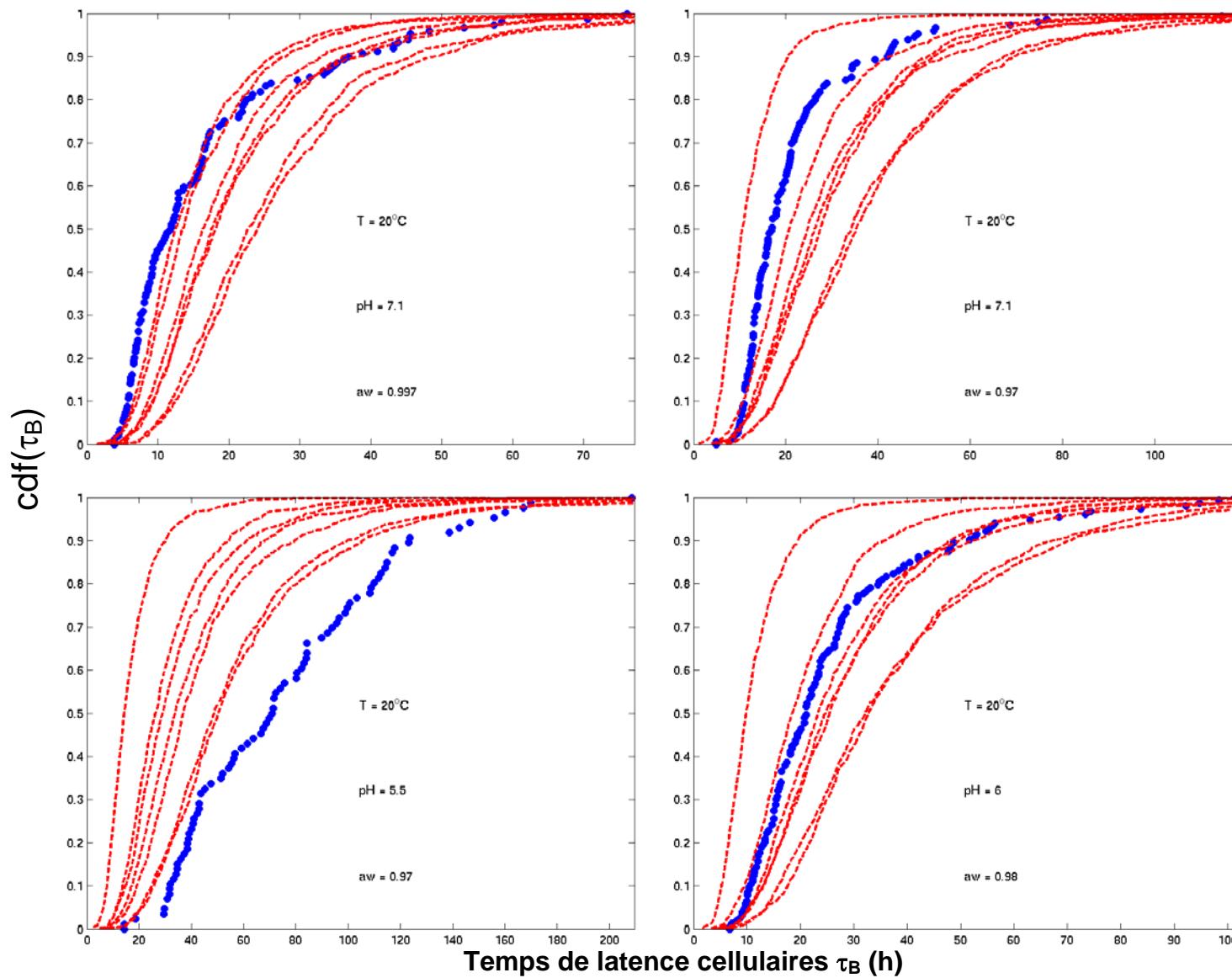


Figure 22-2. Observations (●) et prévisions (--) des distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S4 (#21) à partir des temps de latence populationnels dans d'autres conditions environnementales.

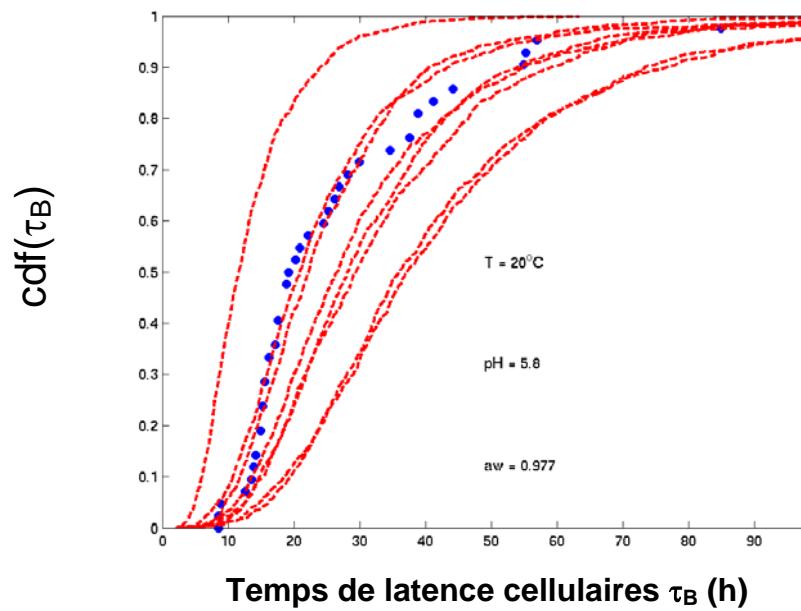


Figure 22-3. Observations (●) et prévisions (--) des distributions cumulatives (cdf) des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S4 (#21) à partir des temps de latence populationnelw dans d'autres conditions environnementales.

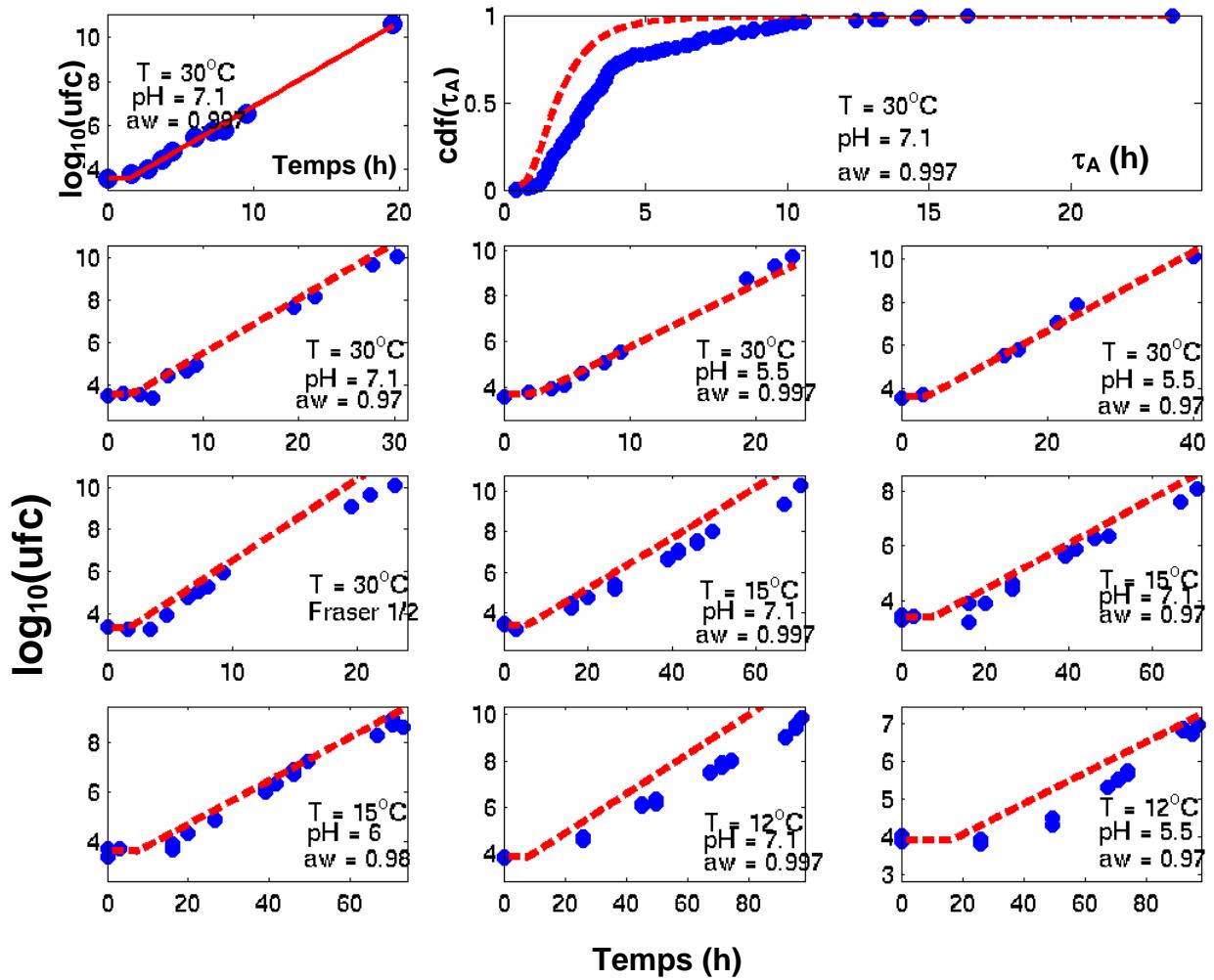


Figure 23-1. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 7.1$  et  $a_w 0.997$ .

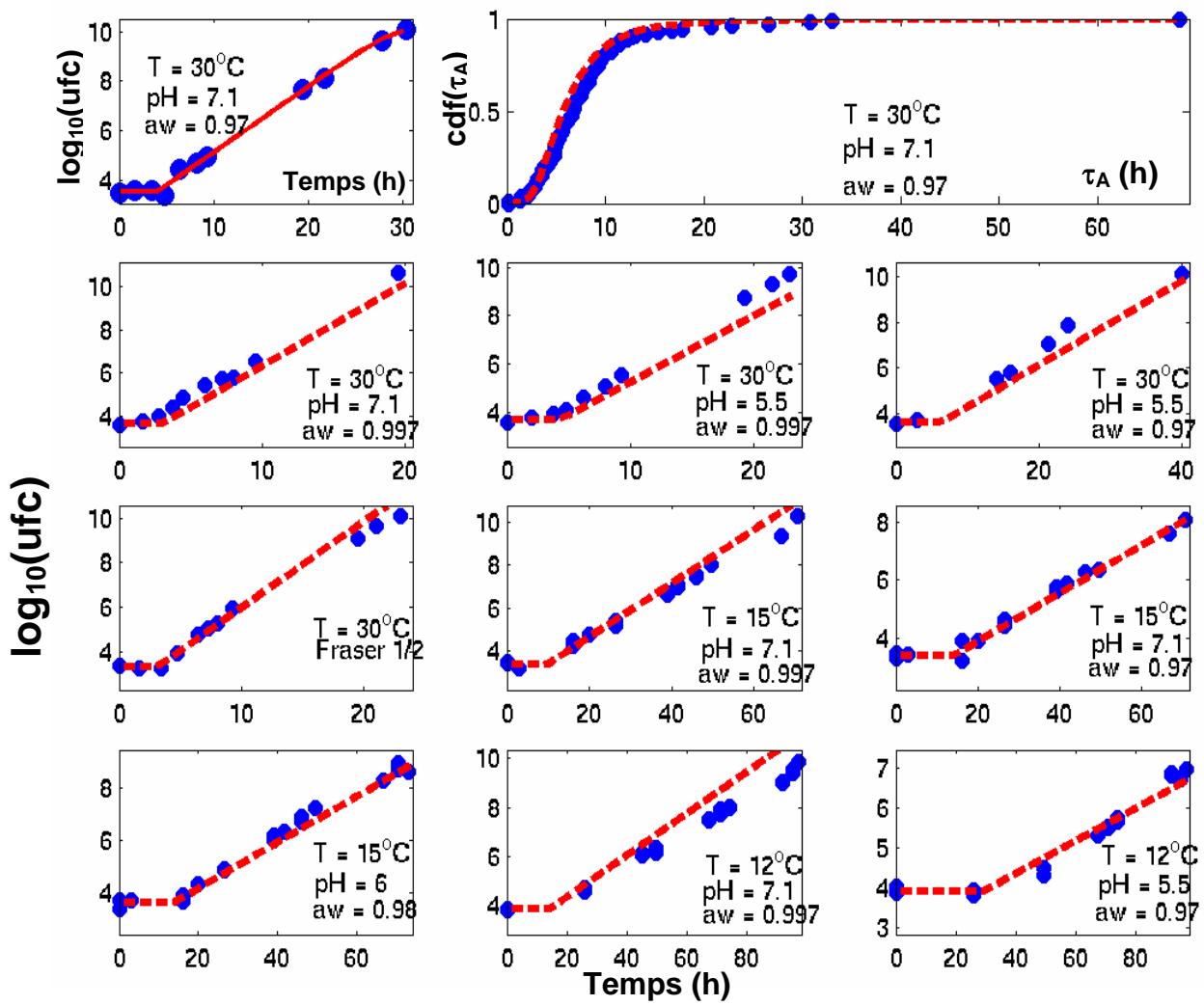


Figure 23-2. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ , pH 7.1 et  $a_w$  0.97.

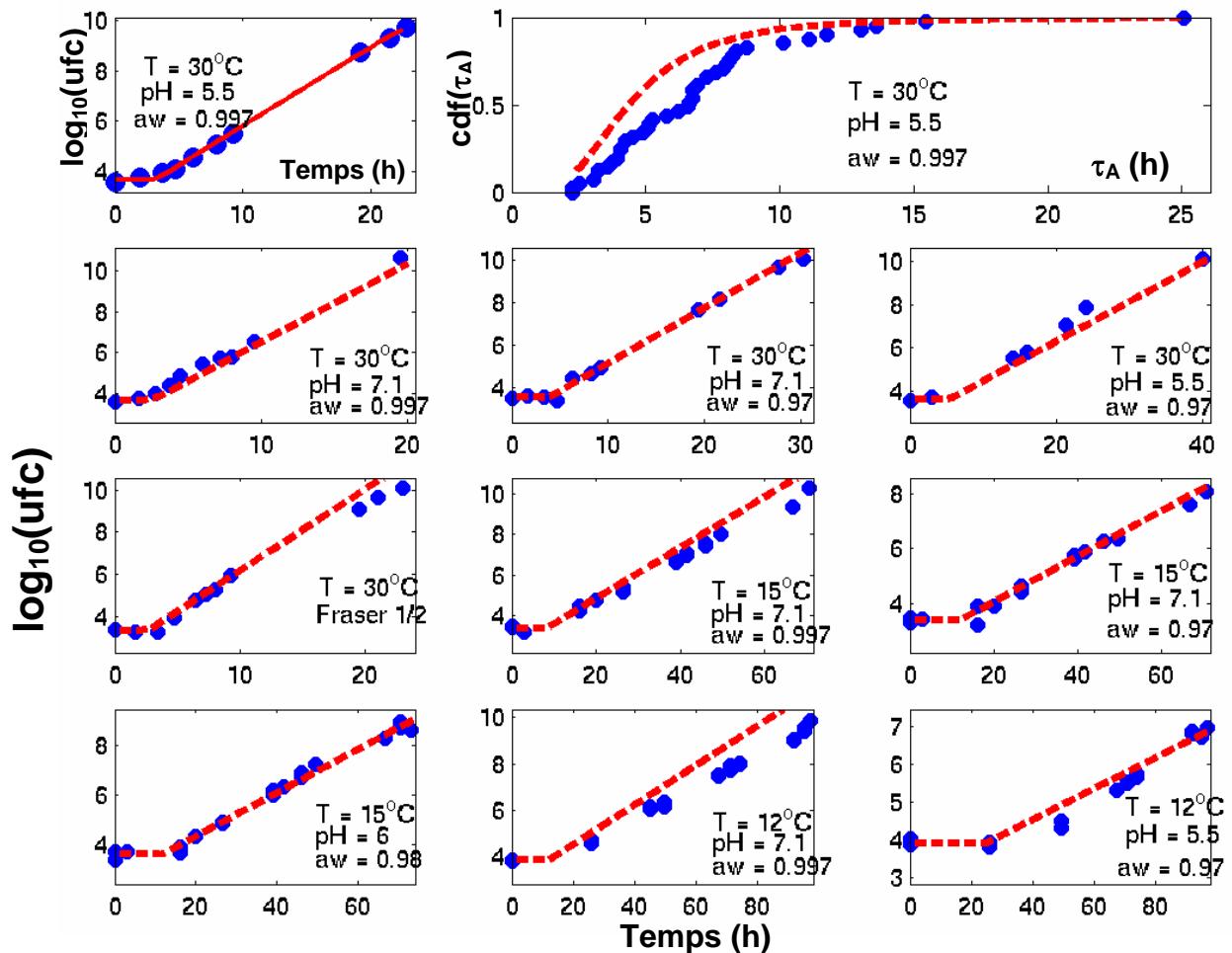


Figure 23-3. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.5 et  $a_w$  0.997.

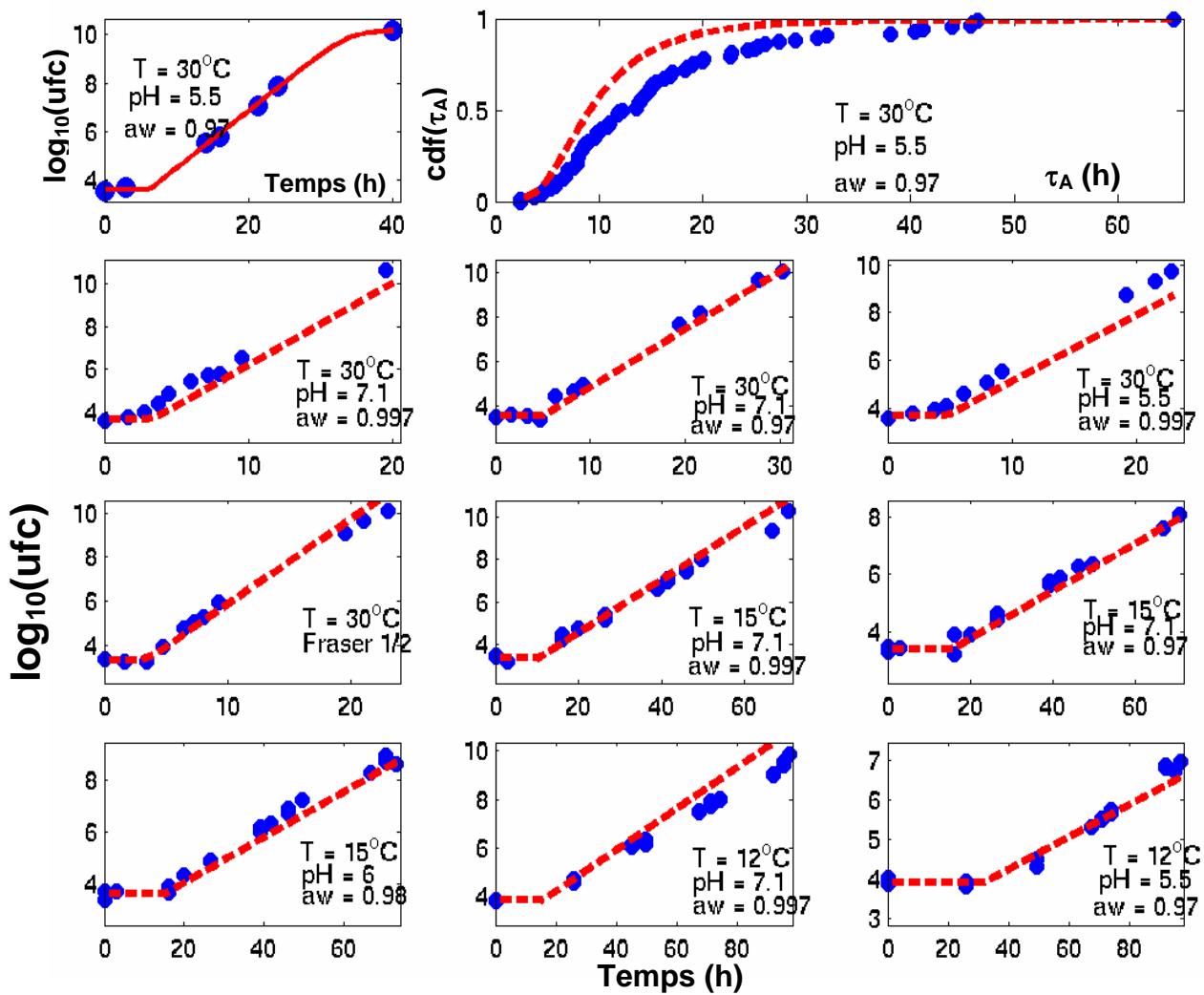


Figure 23-4. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 5.5$  et  $a_w 0.97$ .

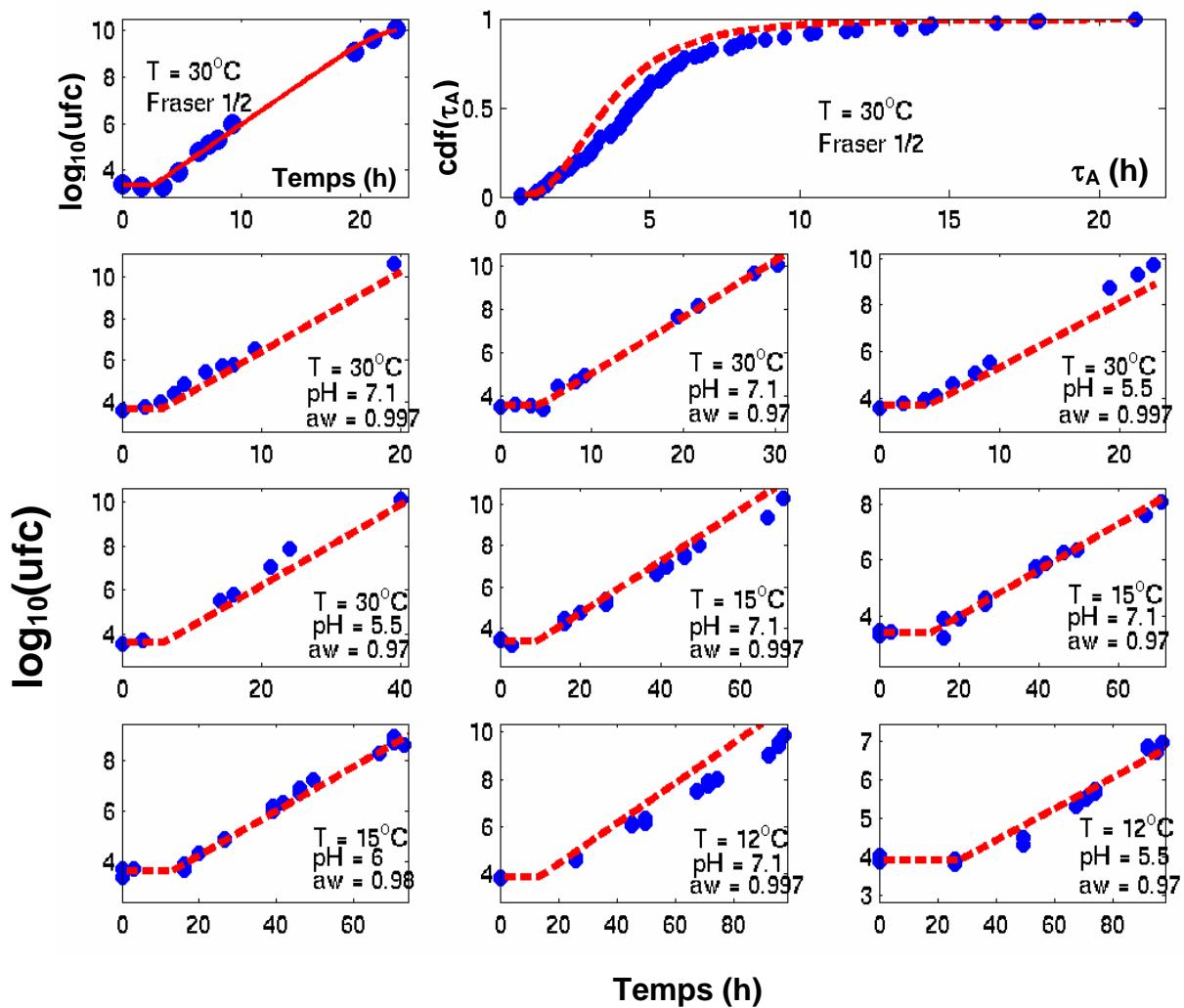


Figure 23-5. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $30^\circ\text{C}$ , Fraser 1/2.

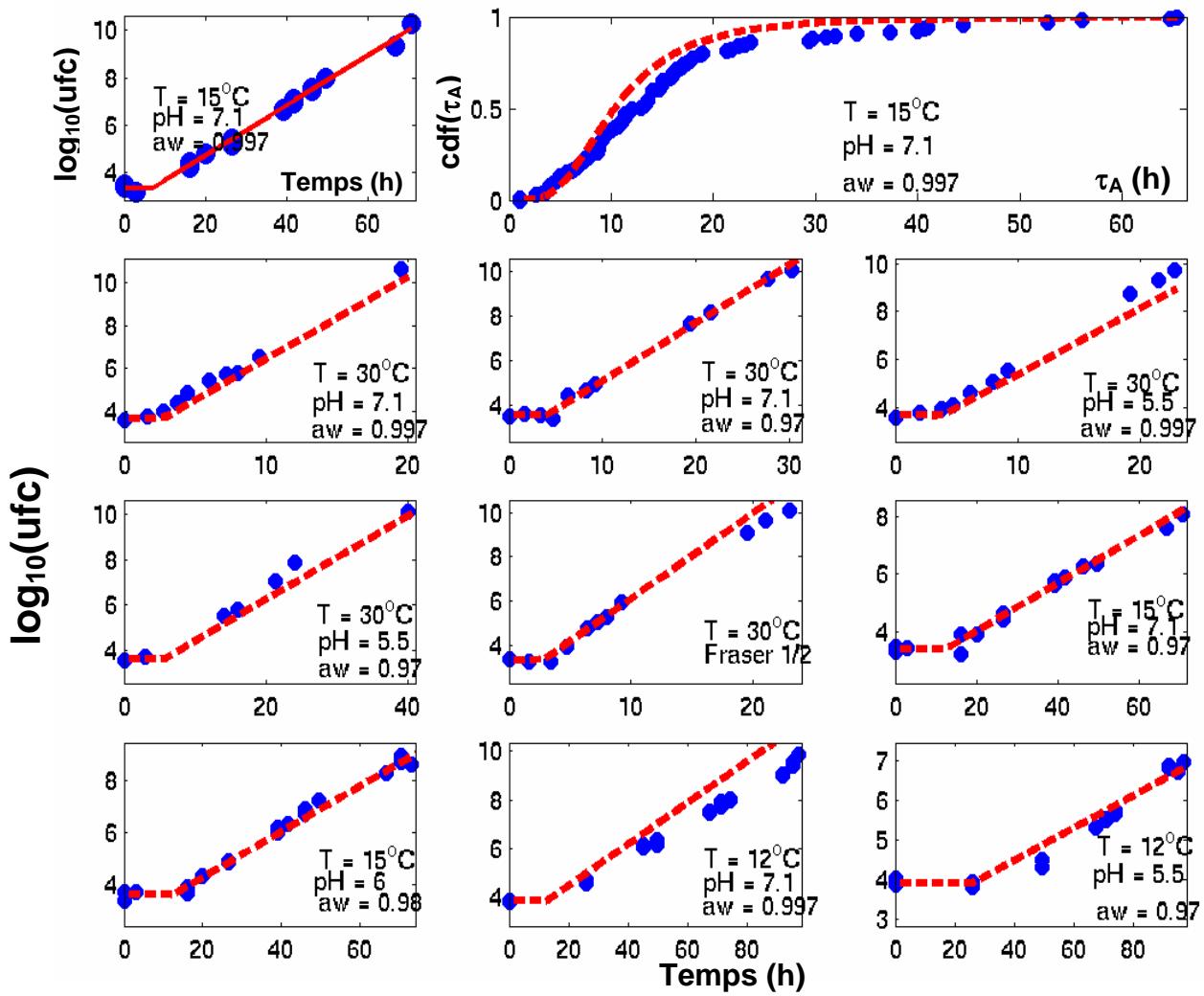


Figure 23-6. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $15^\circ\text{C}$ , pH 7.1 et  $a_w$  0.997.

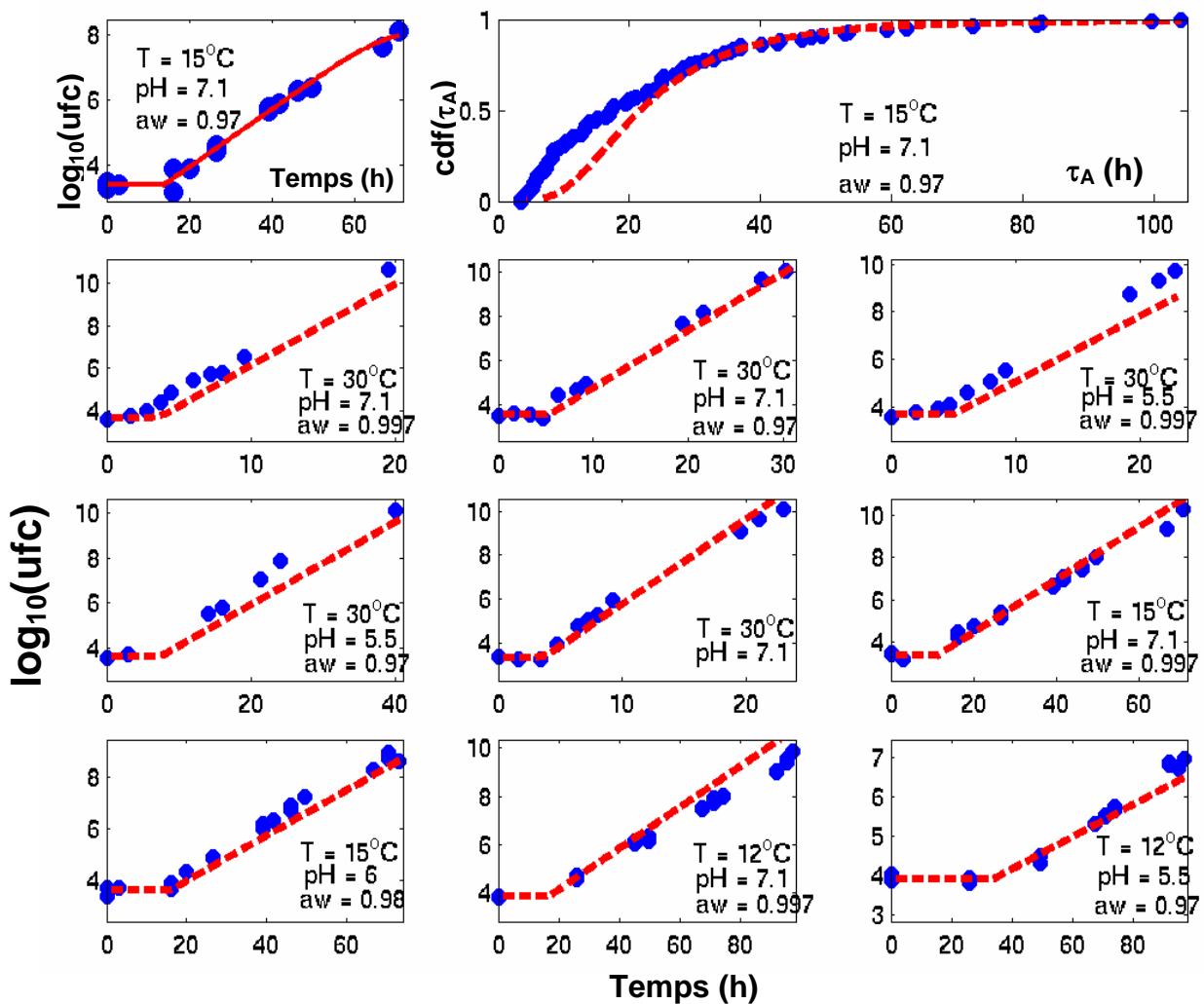


Figure 23-7. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $15^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 7.1$  et  $a_w 0.97$ .

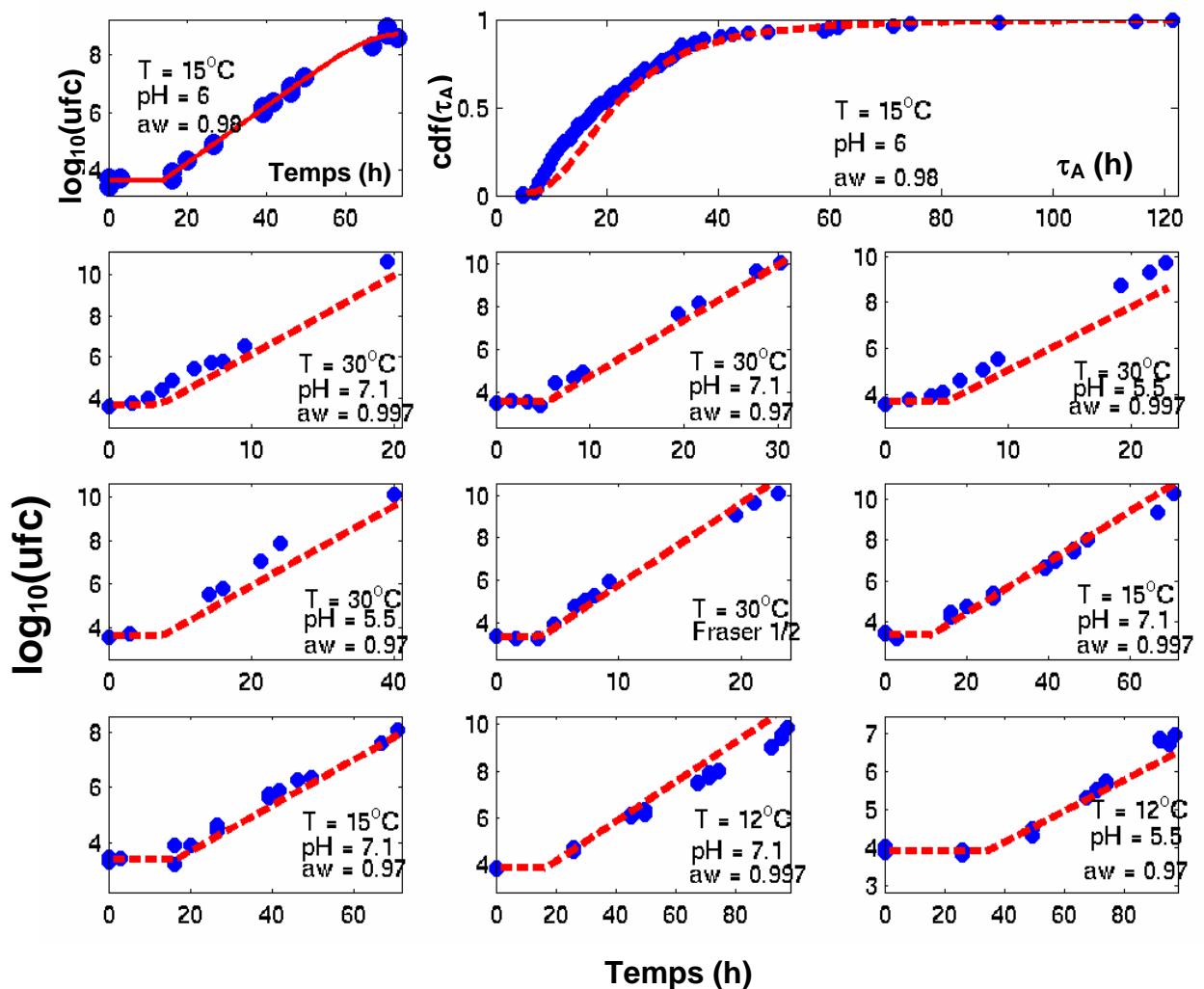


Figure 23-8. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $15^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 6$  et  $a_w 0.98$ .

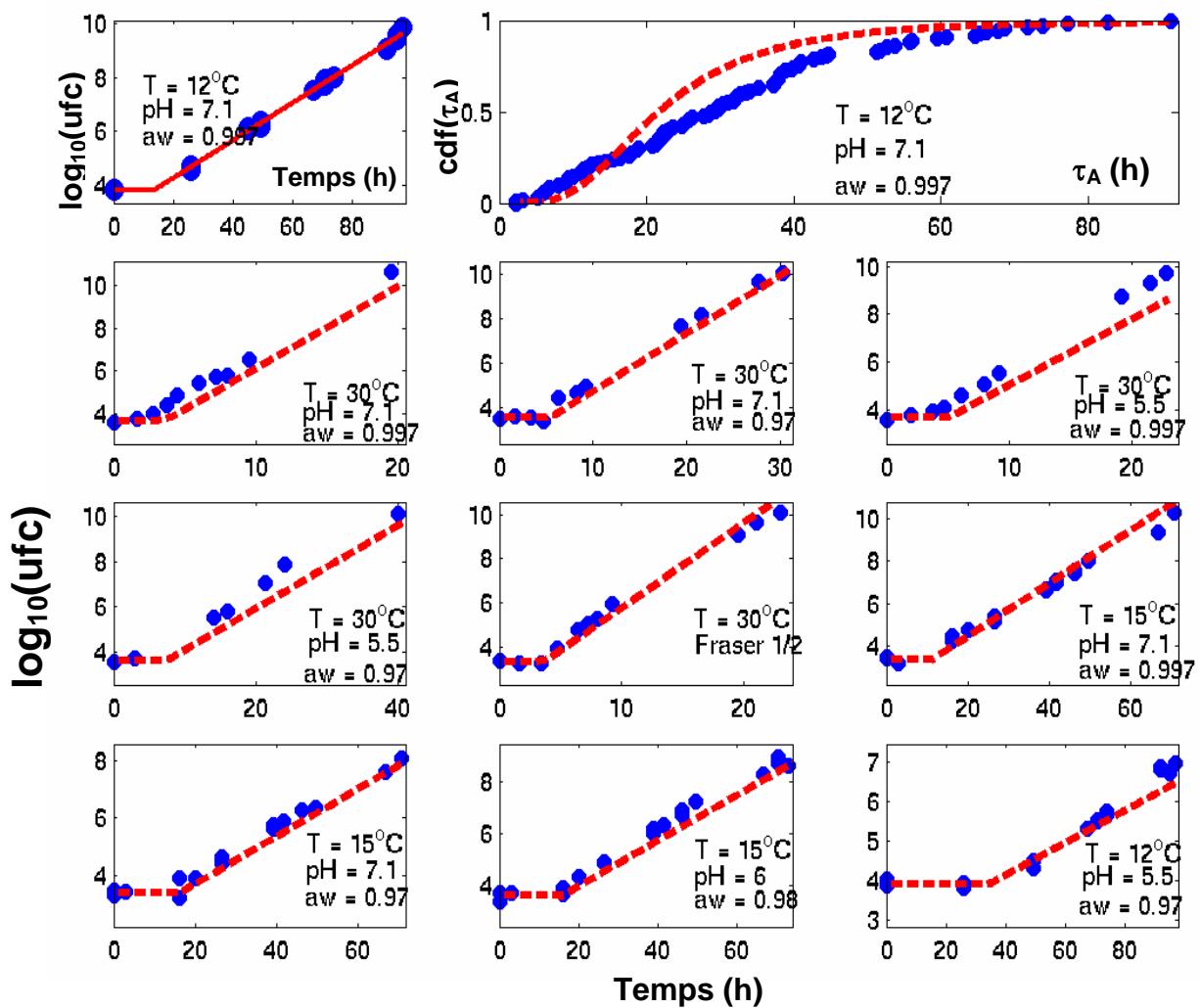


Figure 23-9. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $12^\circ\text{C}$ , pH 7.1 et  $a_w$  0.997.

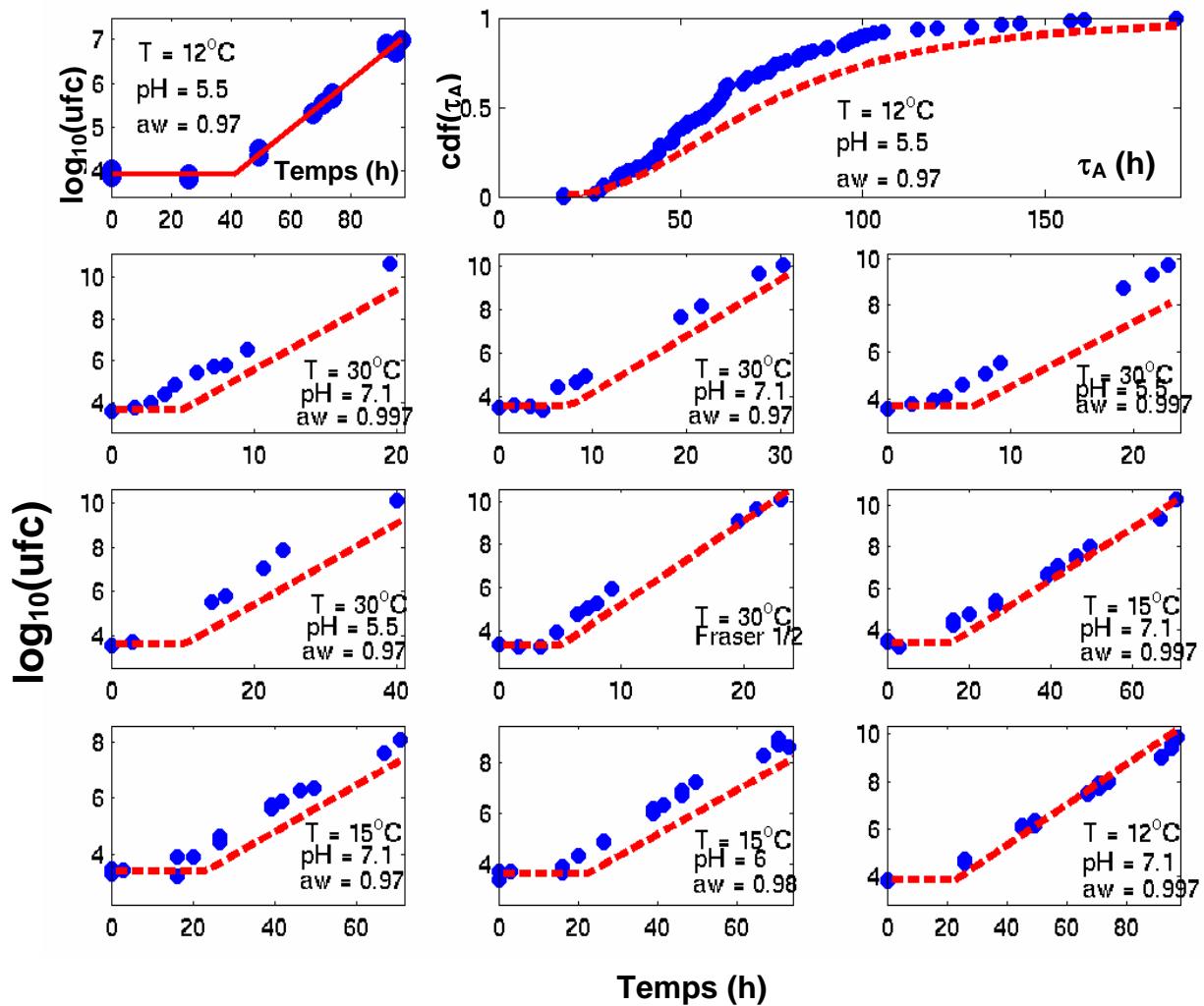


Figure 23-10. Observations (●) et prévisions (--) de la croissance en milieux liquides de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1, à partir du temps de latence populationnel à  $12^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 5.5$  et  $a_w 0.97$ .







## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## I. Conclusion

### I.1. Originalité et apports de nos résultats à la connaissance des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes*

D'un point de vue méthodologique, deux aspects importants ont pu être améliorés. D'une part, la possibilité d'étudier les temps de latence des cellules en milieu solide, et d'autre part, la détermination des temps de latence à partir des temps de détection sans avoir à estimer le taux de croissance. Le premier point, grâce à l'automatisation, offre un potentiel pour l'acquisition de données en milieu solide que n'offraient pas les systèmes existants, comme le système gel-cassette (Brocklehurst et al., 1997). Le deuxième point constitue un réel avantage au vue de la relative difficulté rencontrée par Francois et al. (2005c) pour établir une calibration entre la densité optique et le nombre d'ufc ; cette calibration étant nécessaire à l'estimation du taux de croissance.

L'originalité de nos résultats porte également sur la diversité des états physiologiques utilisés. Tous les états physiologiques sont le résultat de stress qui sont pour la plupart représentatifs des situations rencontrées par *L. monocytogenes* dans les industries agro-alimentaires. Cette approche est également abordée par d'autres auteurs (Elfwing et al., 2004 ; Katalik et al., 2005b) qui ont appliqué différents stress thermiques sur *L. innocua* avant l'étude des temps de latence des cellules survivantes. En revanche, Francois et al. (2005a,b) ont porté leur étude pour *L. monocytogenes* sur un état physiologique très peu stressé. Les résultats obtenus pour cet état physiologique présentent des valeurs plus faibles, par rapport à nos observations, pour des temps de latence cellulaires pris dans des conditions similaires.

Enfin les résultats apportent une validation au modèle stochastique de croissance de Baranyi (1998) qui permet l'estimation du temps de latence populationnel à partir des temps de latence cellulaires. Nous avons également proposé un modèle original permettant de retrouver les distributions des temps de latence des cellules à partir d'une cinétique de croissance établie avec un inoculum fort de ces mêmes cellules.

### I.2. Rappels des objectifs et des résultats atteints

Le but de ce travail était de caractériser les distributions des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes* en fonction de leur état physiologique et de proposer un modèle décrivant l'impact

des facteurs environnementaux sur ces distributions. Une méthode d'étude des temps de latence cellulaires sur milieu solide devait également être mise au point.

Les différents objectifs fixés au départ ont été atteints :

- Nous avons, dans un premier temps, étudié l'influence de l'état physiologique sur les distributions des temps de latence. Les états physiologiques étudiés regroupent des stress unitaires ou en successions. L'ensemble des protocoles de stress appliqués aux cellules recouvre une grande partie des stress rencontrés par *L. monocytogenes* dans l'environnement des usines agro-alimentaires et au cours des procédés de fabrication des aliments. Nous avons pu montrer l'importance de la prise en compte de l'aspect stochastique de la croissance et de l'état physiologique des cellules sur les distributions. Les résultats obtenus forment une base de données d'états physiologiques utilisable pour l'appréciation de l'exposition alimentaire à *L. monocytogenes*.

- Une méthode originale de détermination des temps de latence cellulaires a été mise au point. Les résultats obtenus pour les cellules immobilisées sont équivalents à ceux des cellules planctoniques pour un état physiologique et des conditions d'accueil équivalents. Au cours de l'utilisation de cette méthode nous avons pu observer et aborder les phénomènes de compétition et de population maximale atteinte. Ce dernier point ouvre des perspectives pour la suite de ce travail (cf. chapitre F.III.3).

- Nous avons montré que toutes les distributions des temps de latence cellulaires pouvaient être décrites par la distribution des valeurs extrêmes (avec un paramètre de forme fixé). En regroupant l'ensemble des données, nous avons montré qu'il était possible de retrouver la dispersion des temps de latence connaissant la moyenne des temps de latence cellulaires. De plus, nous avons proposé une relation permettant l'estimation de la moyenne des temps de latence cellulaires à partir du temps de latence populationnel obtenu avec un inoculum fort. Nous avons également montré que, pour un état physiologique donné, les conditions de croissance n'influaient pas significativement le produit ( $\mu_{\max} * \tau_i$ ) pour les facteurs environnementaux étudiés. Une validation des distributions des temps de latence cellulaires dans les fromages à pâte molle et croûte lavée et dans le saumon fumé est prévue.

## II. Fin du programme

### II.1 Validation sur aliments

Les distributions des temps de latence seront validées par des résultats obtenus sur des matrices alimentaires réelles, en l'occurrence du fromage à pâte molle et croûte lavée et du saumon fumé. Cette validation sera basée sur le principe décrit ci-dessous.

Les deux aliments serontensemencés avec quelques cellules de *L. monocytogenes* dans un état physiologique connu (choisi parmi les 22 états physiologiques étudiés). La taille de l'inoculum ( $N_0$ ) répond à deux critères :

- Avoir une taille suffisamment importante pour ne pas avoir un trop grand nombre d'unités à analyser sans cellule.
- Avoir une taille de l'inoculum qui ne masque pas la variabilité des temps de latence cellulaires.

L'influence de ces deux paramètres a été vérifiée par simulation ; la Figure 24 montre l'importance de la taille de l'inoculum pour des cellules stressées.

Plus de 50 fromages ou sachets de saumon fumés serontensemencés avec  $N_0$  cellules stressées. Ces unités seront conservées dans des conditions de stockage proches des conditions habituelles de conservation. Toutes les unités seront dénombrées le même jour. La distribution des niveaux de contamination permettra de caractériser la variabilité des temps de latence des cellules de l'inoculum (Figure 25). La même expérience sera réalisée avec les mêmes lots de produits, conservés dans les mêmes conditions et avec la même taille d'inoculum mais cette fois-ci avec des cellules non stressées issues d'une culture en phase exponentielle. La comparaison des distributions des niveaux de contamination pour les produitsensemencés avec les deux états physiologiques permettra de valider la part de variabilité des niveaux de contamination expliquée par la variabilité des temps de latence cellulaires.

Avant de lancer les essais avec les inoculum faibles, nous procéderons à des pré-essais avec des inoculums forts et stressés ( $> 10^3$  / unité) afin de connaître le taux de croissance dans les deux produits. À partir de ce taux de croissance, et des distributions des temps de latence déterminées en milieu liquide pour les états physiologiques qui seront utilisés, nous procéderons à des simulations afin de choisir le temps de conservation des unités. Deux critères imposent le choix de ce temps :

- La grande majorité des sachets ne doit plus être en phase de latence. En effet, à cause du niveau initial et du seuil de détection, il serait impossible de déterminer si les produits ne contiennent pas de cellules, ou s'ils contiennent des cellules en phase de latence.

- Les sachets où la croissance est la plus rapide ne doivent pas avoir atteint la phase stationnaire (impossibilité de retrouver le temps de latence).

Les études de validation sur poisson fumé seront réalisées par l'AFSSA LERQAP. Nous avons choisi de broyer les filets de saumon fumé avant l'inoculation par les cellules de *L. monocytogenes* de façon à homogénéiser les conditions physico-chimiques. En effet, les concentrations en phénol et l'activité de l'eau varient légèrement selon l'épaisseur des filets. Le saumon broyé sera réparti dans des sachets puis inoculés par les cellules de *L. monocytogenes*. Ce type de saumon a déjà été utilisé par Gnanou Besse (2004) ; il présente « l'avantage » d'avoir une flore annexe peu importante. Cette caractéristique permet de limiter les problèmes de compétition qui pourrait exister avec les cellules de *L. monocytogenes* en phase de latence.

Les études de validation sur fromage seront effectuées par AERIAL qui maîtrise les conditions d'affinage des fromages à pâte molle et croûte lavée. Nous avons envisagé l'inoculation en surface de fromages en cours d'affinage. En effet dans le cas de fromage affiné, la flore technologique est bien implantée et présente un effet barrière pour *L. monocytogenes*. Nous avons pu observer cet effet barrière lors de pré-essais réalisés sur ces fromages avec un niveau maximal de population pour *L. monocytogenes* relativement faible (de 5 à 6 log<sub>10</sub>). Ainsi, la « fenêtre d'étude » est trop faible pour observer une distribution de niveau de contamination et pour valider les distributions des temps de latence.

Les problèmes d'hétérogénéité des conditions physico-chimiques, de compétition microbienne ou de niveau maximal atteint ne sont pas à minimiser pour l'étude de *L. monocytogenes* dans les aliments. Mais nous avons choisi de nous placer dans des conditions limitant l'influence de ces trois facteurs afin de pouvoir caractériser au mieux la part de la variabilité des niveaux de contamination expliquée par la variabilité des temps de latence cellulaires.

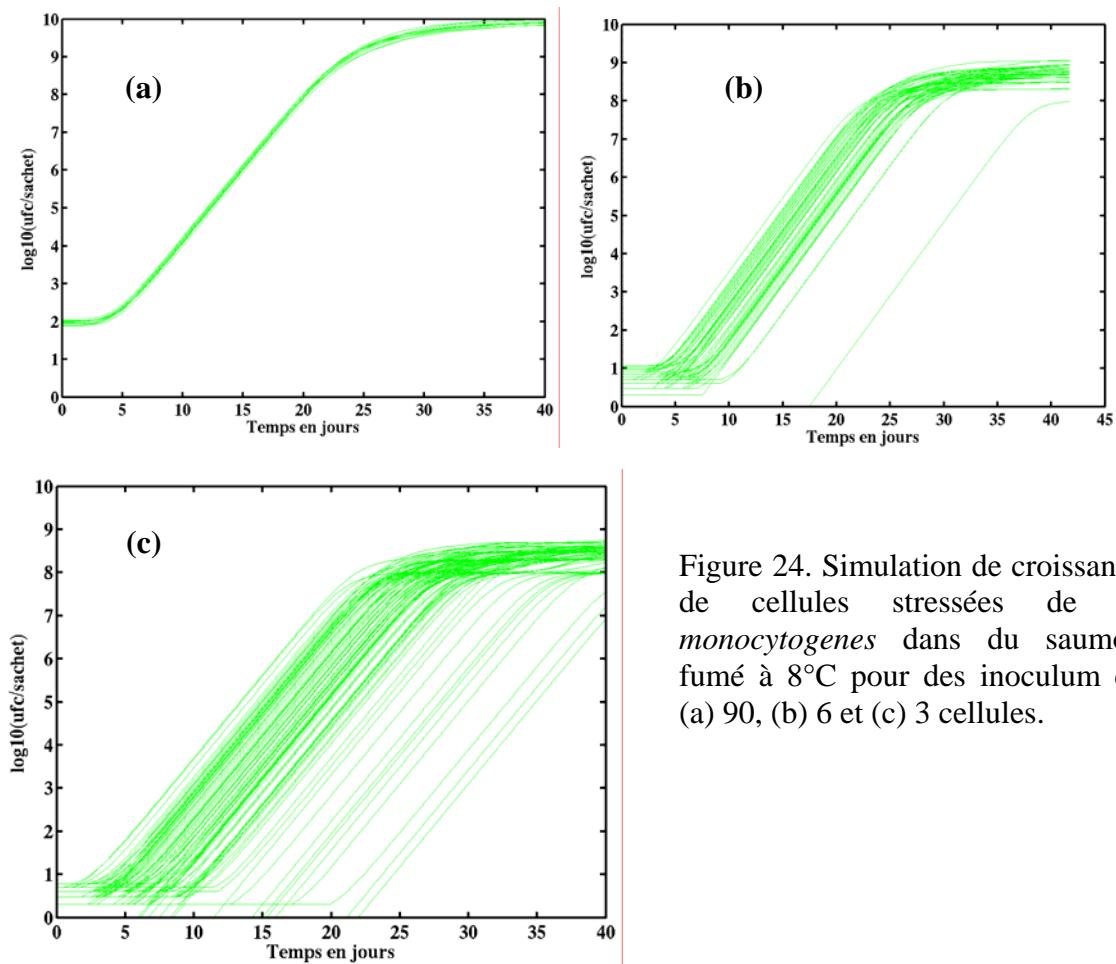


Figure 24. Simulation de croissance de cellules stressées de *L. monocytogenes* dans du saumon fumé à 8°C pour des inoculum de (a) 90, (b) 6 et (c) 3 cellules.

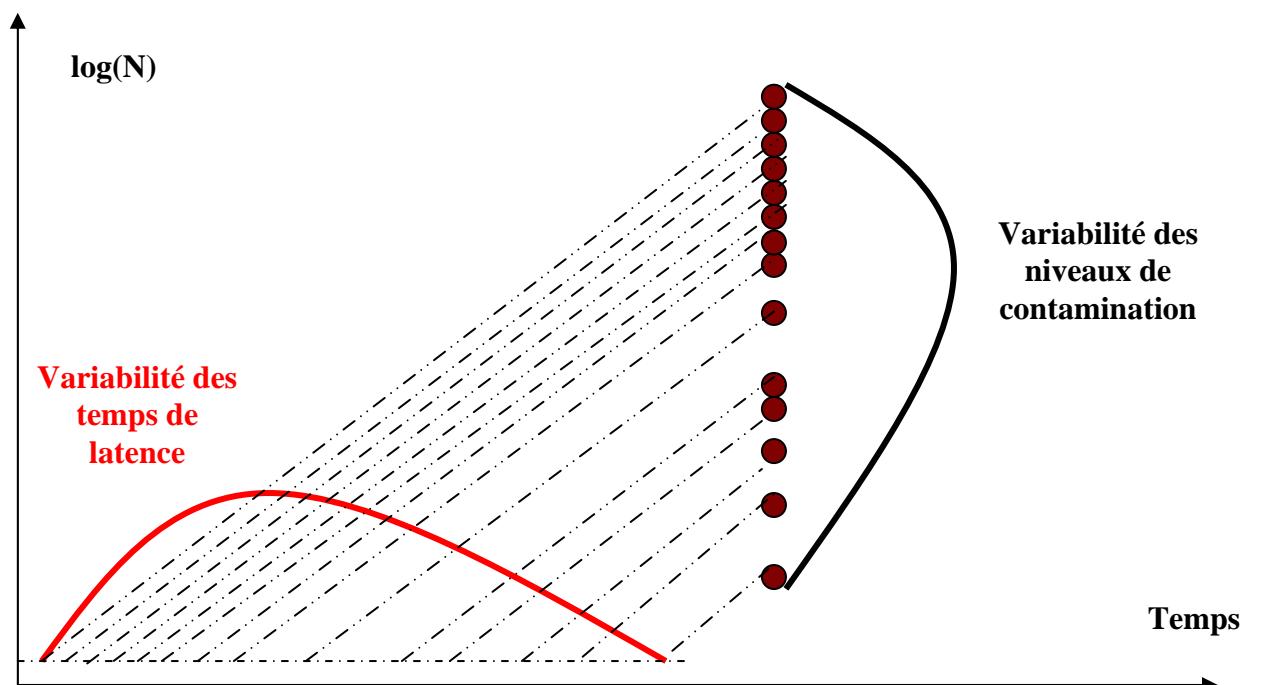


Figure 25. Mise en évidence de la variabilité des temps de latence à partir des distributions des niveaux de contamination de plusieurs unités ensemencées avec  $N_0$  cellules.

## II.2 Intégration des résultats dans la base de données Sym'Previus

Dans un premier temps, toutes les distributions des temps de latence seront intégrées dans la base de données de SYM'PREVIUS. Deux formes sont pour l'instant envisagées : l'intégration des résultats bruts et/ou l'intégration des paramètres des distributions ajustées aux observations.

Après les étapes de validation sur aliments et après discussion avec les partenaires de SYM'PREVIUS nous pourrons envisager l'intégration du modèle à l'outil de simulation. Une approche stochastique du temps de latence pour *L. monocytogenes* serait ainsi proposée. Les utilisateurs (en se limitant dans un premier temps aux centres techniques et aux industriels du GIS) choisirraient un état physiologique parmi les 22 états physiologiques de cette étude. À chacun de ces états correspondrait une distribution des constantes physiologiques. Le modèle secondaire des temps de latence proposé et de la relation de Katalik et al. (2005) permettrait l'estimation du temps de latence en fonction de la taille de l'inoculum et des conditions environnementales choisies. En outre, l'utilisateur pourrait utiliser une courbe de croissance avec un inoculum fort dans un état physiologique particulier pour déterminer les distributions des temps de latence cellulaires de son inoculum.

## II. Perspectives

### II.1 Perspective 1: Étude du comportement des cellules de *L. monocytogenes* vers les limites de croissance

Les résultats de notre étude aux niveaux populationnel et individuel ne permettent pas la remise en cause l'hypothèse de la constance du produit  $\mu_{\max} * \text{lag}$  ou  $\mu_{\max} * \tau_i$ . Cependant l'allure des distributions cumulatives des  $\mu_{\max} * \tau_i$  indique que cette hypothèse n'est peut-être plus valable quand les conditions se rapprochent des limites de croissance de *L. monocytogenes*. En effet pour les conditions les plus défavorables de pH et d'activité de l'eau (pH 5.5 et aw 0.97), les distributions des produits  $\mu_{\max} * \tau_i$ , ont des valeurs moyennes plus longues. Quand on regarde l'impact de ces deux conditions sur le taux de croissance par l'intermédiaire du modèle proposé dans l'article 1, il apparaît qu'il n'y a pas encore d'interaction entre les conditions environnementales ( $\psi=1$ ). Les données de Francois et al. (2005b) utilisées en validation ne comprennent pas non plus de conditions pour lesquelles il existe des interactions entre les facteurs environnementaux. L'intérêt de valider nos observations vers les limites de croissance est renforcée par les résultats de McKellar et al. (2002a). En effet, ces auteurs ont observé une augmentation de la variabilité des temps de latence cellulaires quand le pH diminuait ; mais passé un certain seuil (pH

5), cette variabilité diminue. Les auteurs ont expliqué ce phénomène par la sélection d'une petite fraction de la population avec des temps de latence cellulaires proches et l'incapacité des autres cellules à se multiplier.

L'étude des probabilités de croissance vers les limites de croissance serait également intéressante. En effet, les probabilités de croissance observées dans notre étude sont relativement faibles (supérieures à 10%) par rapport à celles observées par Pascual et al. (2001), Robinson et al. (2001), Koutsoumanis et al. (2005) vers les limites de croissance (inférieures à 0.1%).

Comme nous l'avons montré dans le chapitre D, les distributions de latence et la probabilité de croissance sont reliées. L'étude des deux aspects pourrait donc être effectuée simultanément.

## **II.2. Perspective 2 : Quantification de l'influence du stress sur le recouvrement de *L. monocytogenes* dans les milieux d'enrichissement et de revivification**

Nous avons étudié, pour la combinaison de stress S1, la distribution des temps de latence en bouillon Fraser 1/2. Le résultat d'une simulation de la croissance de 100 cellules pendant la phase d'enrichissement primaire en 24 h pour cet état physiologique est présentée sur la Figure 26. Même avec un inoculum de départ d'une cellule dans les 250 ml de milieu Fraser 1/2 (soit une cellule dans 25 g d'aliment), les niveaux de population atteints sont relativement importants au bout des 24 heures. Les cellules sont majoritairement sorties de la phase de latence (probabilité inférieure à 0.3%), mais les niveaux atteints rendent parfois (<5%) peu probable le transfert d'au moins une cellule dans le milieu Fraser pour l'enrichissement secondaire. De plus, pendant cette phase de latence de *L. monocytogenes*, la flore annexe pourrait prendre un avantage écologique. Pour ce même état physiologique, nous avons observé que seulement 55% des cellules sont capables de cultiver en bouillon Fraser 1/2 (Tableau 12). Il serait intéressant d'étendre cette étude à d'autres états physiologiques et d'évaluer les performances des méthodes de détection de *L. monocytogenes* ou d'autres agents pathogènes dans divers aliments. L'évaluation de la revivification sur la cultivabilité des cellules stressées pourrait être associée à cette étude.

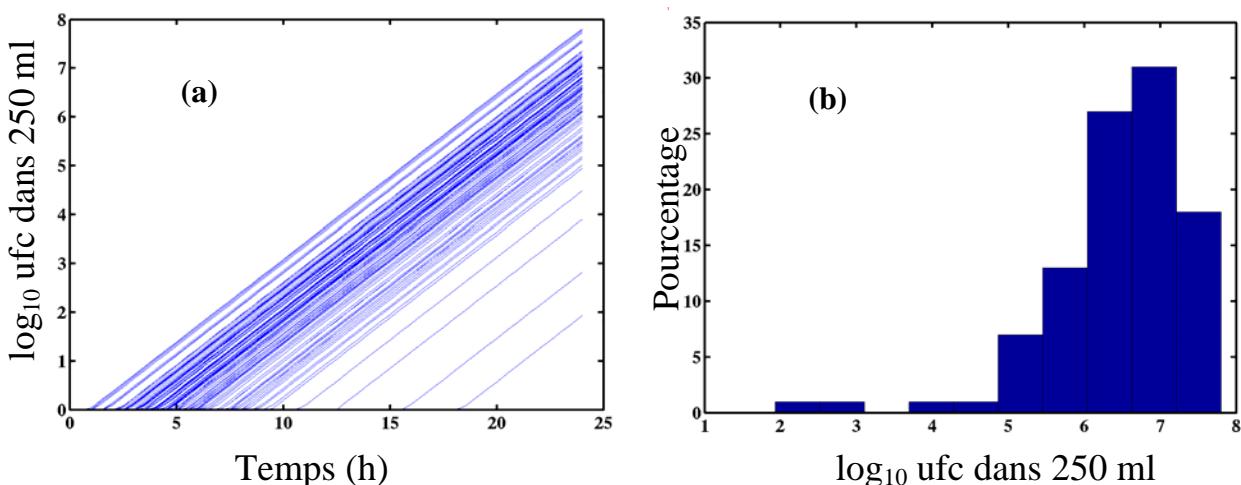


Figure 26. (a) 100 simulations de la croissance d'une cellule de *L. monocytogenes* dans l'état physiologique S1 dans 250 ml de bouillon Fraser 1/2 pendant 24 h à 30°C. (b) Distribution des niveaux de population atteints au terme de ces 24 heures.

### II.3. Perspective 3 : Utilisation de l'analyse d'image pour l'étude de la population maximale atteinte par *L. monocytogenes* dans les aliments et de l'influence de la flore annexe sur sa croissance

La mise au point d'une méthode de suivi des colonies par analyse d'image ouvre la voie pour l'étude du comportement des cellules de *L. monocytogenes* immobilisées. Nous avons pu constater un ralentissement de la croissance radiale des colonies ou une baisse de la taille maximale atteinte par les colonies quand les densités en cellules par boîte étaient trop importantes. Ces observations viennent confirmer des travaux précédents (Chapuis et al., 1995 ; Malakar et al., 2002, 2003). Ce ralentissement a été considéré comme un biais pour la détermination des temps de latence cellulaires. Nous avons utilisé des densités faibles afin de réduire cet effet sur le taux de croissance radial. De plus nous n'avons pas prolongé l'étude des cinétiques jusqu'à atteindre des tailles maximales. Mais l'outil employé ouvre la possibilité d'étudier quantitativement l'influence des colonies les unes sur les autres et sur le niveau maximal atteint grâce à l'automatisation des prises de vue et de l'analyse d'image.

La compétition pour la croissance en milieu solide entre les flores pathogènes, d'altérations et technologiques pourrait, de la même façon, être abordée à l'aide de cette méthodologie.





**A**

- Aase B., Sundheim, G., Langsrud, S. et Rorvik, L.M.** 2000. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol **62**, 57-63.
- Adair, C., Kilsby, D.C. et Whittall, P.T.** 1989. Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the square root model for predicting bacterial growth in foods. Food Microbiol **6**, 7-18.
- Allion, A.** 2004. Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires.
- Anonyme** 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*, part 2 enumeration method. International standard ISO 11290-2. Génève : International Organisation for Standardisation.
- Anonyme** 2004a. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. Institut de Veille Sanitaire. [www.invs.sante.fr/publications/2004/inf\\_origine\\_alimentaire/inf\\_origine\\_alimentaire.pdf](http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf_origine_alimentaire/inf_origine_alimentaire.pdf).
- Anonyme** 2004b. Manuel du salage en fromagerie. Théorie & Pratiques. ARILAIT Recherches – ATLA - ITFF. Oct. 2004.
- Anonyme** 2005. Draft commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. Commission Européenne. SANCO/1498/2001 rev. 15. Bruxelles, 15 mars 2005.
- Augustin, J.C.** 1999. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard – Lyon I.
- Augustin, J.C. et Carlier, V.** 2000a. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol **56**, 29-51.
- Augustin, J.C., Rosso, L. et Carlier, V.** 1999. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. J Microbiol Meth **38**, 137-46.
- Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L. et Carlier, V.** 2000a. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol **66**, 1706-10.
- Augustin, J.C., Rosso, L. et Carlier, V.** 2000b. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol **57**, 169-81.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjoberg, A.M., Aarnisalo, K., Bjorkroth, J., Mattila Sandholm, T. et Korkeala, H.** 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. Appl Environ Microbiol **65**, 150–155.

**B**

- Baranyi, J.** 1998. Comparison of Stochastic and Deterministic Concepts of Bacterial Lag. J Theor Biol **192**, 403-408.
- Baranyi, J.** 2002. Stochastic modelling of bacterial lag phase. Int J Food Microbiol **73**, 203-6.
- Baranyi, J. et Pin, C.** 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. Appl Environ Microbiol **65**, 732-6.
- Baranyi, J. et Pin, C.** 2001. A parallel study on bacterial growth and inactivation. J Theor Biol **210**, 327-36.
- Baranyi, J. et Roberts, T.A.** 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int J Food Microbiol **23**, 277-294.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. et McClure, P.** 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiol **10**, 43-59.
- Barer, M.R., Gribbon, L.T., Harwood, C.R. et Nwoguh, C.E.** 1993. The viable but non-

- culturable hypothesis and medical bacteriology. Rev Med Microbiol **4**, 183–91.
- Baty, F. et Delignette-Muller, M.L.** 2004. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? Int J Food Microbiol **91**, 261-77.
- Baty, F., Flandrois, J.P. et Delignette-Muller, M.L.** 2002. Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. Appl Environ Microbiol **68**, 5816-25.
- Becker, L.A., Cetin, M.S., Hutkins, R.W. et Benson, A.K.** 1998. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. J Bacteriol **180**, 4547-54.
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C. et Lebert, A.** 1996. Recommendations for calculating growth parameter by optical density measurements. J Microbiol Meth **25**, 225-32.
- Begot, C., Lebert, I. et Lebert, A.** 1997. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. Food Microbiol **14**, 403-11.
- Besnard, V., Federighi, M. et Cappelier, J.M.** 2000. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol **31**, 77-81.
- Besnard, V., Federighi, M., Declerq, E., Jugiau, F. et Cappelier, J.M.** 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. Vet Res **33**, 359-70.
- Botello, E. et Nordstrom, K.** 1998. Effects of chromosome underreplication on cell division in *Escherichia coli*. J Bacteriol **180**, 6364-74.
- Bogosian, G. et Bourneuf, E.V.** 2001. A matter of bacterial life and death. EMBO Rep **2**, 770-4.
- Bozoglu, F., Alpas, H. et Kaletunc, G.** 2004. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. FEMS Immunol Med Microbiol **40**, 243-7.
- Bréand, S.** 1998. Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard – Lyon I.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L. et Tomassone, R.** 1997. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. Int J Food Microbiol **38**, 157-67.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L. et Tomassone, R.** 1999. A model describing the relationship between regrowth lag time and mild temperature increase for *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol **46**, 251-261.
- Bremer, P.J., Osborne, C.M., Kemp, R.A. et Smith, J.J.** 1998. Survival of *Listeria monocytogenes* in sea water and effect of exposure on thermal resistance. J Appl Microbiol **85**, 545-53.
- Brocklehurst, T.F.** 2004. Challenge of food and the environment. Dans : R. C. McKellar and X. Lu (ed.), Modeling microbial responses in food. CRC Series in contemporary food science, Washington, D.C. p. 197-232.
- Brocklehurst, T.F., Mitchell, G.A. et Smith, A.C.** 1997. A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. Food Microbiol **14**, 303-11.
- Buchanan, R.L. et Cyganorowicz, M.L.** 1990. A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. Food Microbiol **7**, 237-40.
- Buchanan, R.L. et Klawitter, L.A.** 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. Int J Food Microbiol **12**, 235-46.
- Buchanan, R.L. et Phillips, J.G.** 1990. Response surface model for predicting the effects of

- temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. J Food Prot **53**, 370-76.
- Buchanan, R.L. et Solberg, M.** 1972. Interaction of sodium nitrite, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. J Food Sc **37**, 81-5.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C. et Damert, W.C.** 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. Food Microbiol **14**, 313-26.
- Bull, M.K., Hayman, M.M., Stewart, C.M., Szabo, E.A. et Knabel, S.J.** 2005. Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery of *Listeria monocytogenes* following high pressure processing of milk. Int J Food Microbiol **101**, 53-61.
- Busch, S.V. et Donnelly, C.W.** 1992. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Appl Environ Microbiol **58**, 14-20.

**C**

- Casadei, M.A., Esteves de Matos, R., Harrison, S.T. et Gaze, J.E.** 1998. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products as affected by the growth medium. J Appl Microbiol **84**, 234-9.
- Chapuis, C., Rosso, L. et Flandrois, J.P.** 1995. Relationship between colonial surface and density on agar plate. J Appl Bacteriol **79**, 542-50.
- Crawford, R.G., Beliveau, C.M., Peeler, J.T., Donnelly, C.W. et Bunning, V.K.** 1989. Comparative recovery of uninjured and heat-injured *Listeria monocytogenes* cells from bovine milk. Appl Environ Microbiol **55**, 1490-4.
- Colburn, K.G., Kaysner, C.A. et Wekell, M.M.** 1992. A viable but non culturable state of *Listeria monocytogenes* in filtered and unfiltered freshwater and marine water. The eleventh symposium on problems of listeriosis **75**.
- Cotter, P.D., O'Reilly, K. and Hill, C.** 2001. Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. J Food Prot **64**, 1362-8.
- Cotter, P.D., Emerson, N., Gahan, C.G. et Hill, C.** 1999. Identification and disruption of lisRK, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol **181**, 6840-3.

**D**

- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. et McMeekin, T.A.** 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. Int J Food Microbiol **23**, 391-404.
- Dalgaard, P. et Koutsoumanis, K.** 2001. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. J Microbiol Meth **43**, 183-96.
- Davey, K.R.** 1991. Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. J Appl Bact **70**, 253-7.
- Delignette-Muller, M.L.** 1998. Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. Int J Food Microbiol **43**, 97-104.
- Delignette-Muller, M.L. et Rosso, L.** 2000. Biological variability and exposure assessment. Int J Food Microbiol **58**, 203-12.
- Delignette-Muller, M.L., Baty, F., Cornu, M. et Bergis, H.** 2005. Modelling the effect of a temperature shift on the lag phase duration of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol **100**, 77-84.

- Dens, E.J. et Van Impe, J.F.** 2001. On the need for another type of predictive model in structured foods. *Int J Food Microbiol* **64**, 247-60.
- Dens, E.J., Bernaerts, K., Standaert, A.R. et Van Impe, J.F.** 2005. Cell division theory and individual-based modeling of microbial lag: part I. The theory of cell division. *Int J Food Microbiol* **101**, 303-18.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Bernaert, H., Van Impe, J.F. et Debevere, J.** 2000. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *Int J Food Microbiol* **58**, 93-106.
- Dodd, C.E. et Waites, W.M. 1992.** Development of microscopic techniques for examining microbial growth *in situ* in food ecosystems. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **21**, 148-54.
- Donachie, W.D.** 1968. Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature* **219**, 1077-9.
- Dufrenne, J., Delfgou, E., Ritmeester, W. et Notermans, S.** 1997. The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic micro-organisms. *Int J Food Microbiol* **34**, 89-94.
- Dykes, G.A.** 1999. Physical and metabolic causes of sub-lethal damage in *Listeria monocytogenes* after long-term chilled storage at 4 degrees C. *C. J Appl Microbiol* **87**, 915-22.

**E**

- Elfwing, A., LeMarc, Y., Baranyi, J. et Ballagi, A.** 2004. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Appl Environ Microbiol* **70**, 675-8.

**F**

- Faleiro, M.L., Andrew, P.W. et Power, D.** 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int J Food Microbiol* **84**, 207-16.
- Fonnesbech Vogel, B., Huss, H.H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. et Gram, L.** 2001. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing meth. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2586-95.
- Francis, G.A. et O'Beirne, G.A.** 2005. Variation among strains of *Listeria monocytogenes*: differences in survival on package vegetables and in response to heat and acid solutions. *Food Control* **16**, 687-94.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. et Debevere, J.** 2002. Effect of low temperature on the individual lag phase and distribution of *Listeria monocytogenes*. "Food Micro 2002", Lillehammer, Norway.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. et Debevere, J.** 2003. Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Lett Appl Microbiol* **37**, 26-30.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. et Debevere, J.** 2005a. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **100**, 41-53.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. and Debevere J.** 2005b. Modelling the effect on environmental parameter (Temperature, pH & aw) on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Act Hort* **674**, 39-46.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. et Debevere, J.** 2005c. Effect of the environmental parameters (temperature, pH & aw) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* in press.

**G**

- Gay, M., Cerf, O. et Davey, K.R.** 1996. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14°C. *J Appl Bacteriol* **81**, 433-438.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Cenens, C. et Van Impe, J.F.** 1998. Application of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled food products. *Int J Food Microbiol* **44**, 49-68.
- Gibson, A.M., Bratchell, N. et Roberts, TA.** 1988. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int J Food Microbiol* **6**, 155-78.
- Gnanou Besse, N., Dubois Brissonnet, F., Lafarge, V. et Leclerc, V.** 2000. Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* **89**, 944-50.
- Gnanou Besse, N.** 2002. Influence of various environmental parameters and of detection procedures on the recovery of stressed *L. monocytogenes*: a review. *Food Microbiol* **19**, 221-34.
- Gnanou Besse, N. et Colin, P.** 2004. Enumerating *Listeria monocytogenes* in food: a problem of low number. *J Rapid Meth Aut Microbiol* **12**, 83-105.
- Gnanou Besse, N.** 2004. Effet de la taille de l'inoculum et de la composition de la population initiale sur la croissance de *Listeria monocytogenes*. Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne.

**H**

- Harrison, W.A., Peters, A.C. et Fielding, L.M.** 2000. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* colonies under modified atmospheres at 4 and 8 degrees C using a model food system. *J Appl Microbiol* **88**, 38-43.
- Herbert, K.C. et Foster, S.J.** 2001. Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and the role of known and novel components. *Microbiology* **147**, 2275-84.
- Hill, C., Cotter, P., Sleator, R.D. et Gahan, C.G.M.** 2002. Bacterial stress response of *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *Int Dairy J* **12**, 273-83.
- Hills, B.P. et Wright, K.M.** 1994. A new model for bacterial growth in heterogeneous systems. *J Theor Biol* **168**, 31-41.
- Hornbaek, T., Brocklehurst, T.F. et Budde, B.B.** 2004. The antilisterial effect of *Leuconostoc carnosum* 4010 and leucocins 4010 in the presence of sodium chloride and sodium nitrite examined in a structured gelatin system. *Int J Food Microbiol* **92**, 129-40.

**J**

- Jorgensen, F., Stephens, P.J. et Knochel, S.** 1995. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bact* **79**, 274-281.
- Jorgensen, F., Panaretou, B., Stephens, P.J. et Knochel, S.** 1996. Effect of pre- and post-heat shock temperature on the persistance of thermotolerance and heat shock-induced proteins in *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* **80**, 216-224.

**K**

- Knabel, S.J., Walker, H.W., Hartman, P.A. et Mendonca, A.F.** 1990. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. *Appl Environ Microbiol* **56**, 370-6.
- Knabel, S.J.** 2002. Optimized, one-step, recovery-enrichment broth for enhanced detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and hot dogs. *J AOAC Int* **85**, 501-4.
- Koch, A. L. 1995.** Bacterial growth and form. Chapman and Hall, New York, N.Y.
- Koppes, L., Meyer, M., Oonk, H., de Jong, M. et Nanninga, N.** 1980. Correlation between size and age at different events in the cell division cycle of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **143**, 1241-52.
- Koutsoumanis, K.P. et Sofos, J.N.** 2004a. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiol* **21**, 415-22.
- Koutsoumanis, K.P. et Sofos, J.N.** 2004b. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions. *Lett Appl Microbiol* **38**, 321-6.
- Koutsoumanis, K.P. et Sofos, J.N.** 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and  $a_w$  limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **104**, 83-91.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A. et Sofos, J.N.** 2003. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7514-6.
- Kozak, J., Balmer, T., Byrne, R. et Fisher, K.** 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods - incidence in dairy products. *Food Control* **7**, 215-21.
- Kutalik, Z., Razaz, M. et Baranyi, J.** 2005a. Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *J Theor Biol* **232**, 285-99.
- Kutalik, Z., Razaz, M., Elfwing, A., Ballagi, A. et Baranyi, J.** 2005b. Stochastic modelling of individual cell growth usong flow chamber microscopy images. *Int J Food Microbiol*.

## L

- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P. et Thuault, D.** 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int J Food Microbiol* **73**, 219-37.
- Leinster, L.** 1985. Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable product and intermediate moisture food types. Dans : Properties of water in foods, Ed. Simatos, Germany, 309-29.
- Leinster, L.** 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol* **55**, 181-86.
- Linton, R.H., Webster, J.B., Pierson, M.D., Bishop, J.R. et Hackney, C.R.** 1992. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Prot* **55**, 84-87.
- Lou, Y. et Yousef, A.E.** 1996. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *J Food Prot* **59**, 465-71.
- Lou, Y. et Yousef, A.E.** 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1252-5.
- Lunden, J., Autio, T., Markkula, A., Hellstrom, S. et Korkeala, H.** 2003. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *Int J Food Microbiol* **82**, 265-72.
- Luppens, S.B.I., Reij, M.W., van der Heijden, R.W.L., Rombouts, F.M. et Abee, T.** 2002. Development of a Standard Test To Assess the Resistance of *Staphylococcus aureus* Biofilm Cells to Disinfectants. *Appl Envir Microbiol* **68**, 4194-200.

**M**

- Malakar, P.K., Martens, D.E., van Breukelen, W., Boom, R.M., Zwietering, M.H. et van 't Riet, K.** 2002. Modeling the interactions of *Lactobacillus curvatus* colonies in solid medium: consequences for food quality and safety. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3432-41.
- Malakar, P.K., Barker, G.C., Zwietering, M.H. et van't Riet, K.** 2003. Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. *Int J Food Microbiol* **84**, 263-72.
- McDonnell, G. et Russell, A.D.** 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**, 147-79.
- McKellar, R.C., Butler, G., Stanich, K.** 1997. Modelling the influence of temperature on the recovery of *Listeria monocytogenes* from heat injury. *Food Microbiol.* **14**, 617-25.
- McKellar, R.C.** 1997. A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *Int J Food Microbiol* **36**, 179-86.
- McKellar, R.C.** 2001. Development of a dynamic continuous-discrete-continuous model describing the lag phase of individual bacterial cells. *J Appl Microbiol* **90**, 407-13.
- McKellar, R.C. et Knight, K.** 2000. A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **54**, 171-80.
- McKellar, R. C., et X. Lu.** 2004. Primary models. Dans : R. C. McKellar and X. Lu (ed.), Modeling microbial responses in food. CRC Series in contemporary food science, Washington, D.C. p. 151-196.
- McKellar, R.C. et Lu, X.** 2005. Development of a global stochastic model relating the distribution of individual cell and population physiological states. *Int J Food Microbiol* **100**, 33-40.
- McKellar, R.C., Lu, X. et Knight, K.P.** 2002a. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **73**, 127-35.
- McKellar, R.C., Lu, X. et Knight, K.P.** 2002b. Growth pH does not affect the initial physiological state parameter ( $p_0$ ) of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **73**, 137-44.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. et Jewell, K.** 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J Food Microbiol* **92**, 15-33.
- McMeekin, T.A., Olley, J., Ross, T. et Ratkowsky, D.A.** 1993. Predictive microbiology: theory and application. Research Study Press, Taunton, UK.
- Meldrum, R.J., Brockelhurst, T.F., Wilson, D.R. et Wilson, P.D.G.,** 2003. The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10°C. *Food Microbiol* **20**, 97-103.
- Mendonca, A.F. et Knabel, S.J.** 1994. A novel strictly anaerobic recovery and enrichment system incorporating lithium for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk containing background microflora. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4001-8.
- Metris, A., George, S.M., Peck, M.W. et Baranyi, J.** 2002. Effect of sodium chloride and pH on the distribution of the lag times of individual cells of *Listeria innocua*. Conference proceeding: 7ème journées européennes Agro-industrie et méthodes statistiques, Lille 2002.
- Metris, A., George, S.M., Peck, M.W. et Baranyi, J.** 2003. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *J Microbiol Meth* **55**, 821-7.
- Metris, A., Le Marc, Y., Elfwing, A., Ballagi, A. et Baranyi, J.** 2005. Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*. *Int J Food Microbiol* **100**, 13-19.
- Meyer, D.H. et Donnelly, C.W.** 1992. Effect of incubation temperature on repair of heat-injured *Listeria* in milk. *J Food Prot* **55**, 579-582.

- Meyer-Broseta, S., Diot, A., Bastian, S., Rivière, J. et Cerf, O.** 2002. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Int J Food Microbiol* **80**, 1-15.
- Mossel, D.A.** 1983. Essentials and perspectives of the microbial ecology of foods. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **11**, 1-45.
- Miller, A.J., Bayles, D.O. et Eblen, B.S.** 2000. Cold shock induction of thermal sensitivity in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4345-50.
- Mitchell, A.J. et Wimpenny, J.W.** 1997. The effects of agar concentration on the growth and morphology of submerged colonies of motile and non-motile bacteria. *J Appl Microbiol* **83**, 76-84.

## N

- Novak, J.S. et Juneja, V.K.** 2003. Effects of refrigeration or freezing on survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in under-cooked ground beef. *Food Cont* **14**, 25-30.

## O

- O'Driscoll, B., Gahan, C.G. et Hill, C.** 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1693-98.

## P

- Pagan, R., Condon, S. et Sala, F.J.** 1997. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3225-32.
- Parker, M.L., Gunning, P.A., Macedo, A.C., Malcata, F.X. et Brocklehurst, T.F.** 1998. The microstructure and distribution of micro-organisms within mature Serra cheese. *J Appl Microbiol* **84**, 523-30.
- Pascual, C., Robinson, T.P., Ocio, M.J., Aboaba, O.O. et Mackey, B.M.** 2001. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Lett Appl Microbiol* **33**, 357-61.
- Peleg, M.** Microbial survival curves: the reality of flat "shoulders" and absolute thermal death times. *Food Res Int* **33**, 531-38.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F. et Alige, S.** 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **55**, 121-6.
- Poschet, F., Bernaerts, K., Geeraerd, A.H., Scheerlinck, N., Nicolaï, B.M. et Van Impe, J.F.** 2004. Sensitivity analysis of microbial growth parameter distributions with respect to data quality and quantity by using Monte Carlo analysis. *Math Comput Sim* **65**, 231-43.

## R

- Rasch, M.** 2004. Experimental design and data collection. Dans : R. C. McKellar and X. Lu (ed.), Modeling microbial responses in food. CRC Series in contemporary food science, Washington, D.C. p. 63-150.
- Ratkowsky, D.A.** 2004. Model fitting and uncertainty. Dans : R. C. McKellar and X. Lu (ed.), Modeling microbial responses in food. CRC Series in contemporary food science, Washington, D.C. p. 151-196.
- Ravel, J., Knight, I.T., Monahan, C.E., Hill, R.T. et Colwell, R.R.** 1995. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? *Microbiology* **141**, 377-83.
- Reid, G., Bialkowska-Hobrzanska, H., van der Mei, H.C. and Busscher, H.J.** 1999. Correlation between genetic, physico-chemical surface characteristics and adhesion of four strains of *Lactobacillus*. *J Coll Surf B* **13**, 75-81.

- Rijpens, N. et Herman, L.** 2004. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Int J Food Microbiol* **94**, 15-22.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A. et Mackey, B.M.** 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **44**, 83-92.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J. et Mackey, B.M.** 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **70**, 163-73.
- Rørvik, L.M., Caugant, D.A. et Yndestad, M.** 1995. Contamination pattern of *L. monocytogenes* and other *Listeria spp.* In a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *Int J Food Microbiol* **14**, 111-8.
- Rørvik, L.M.** 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *Int J Food Microbiol* **62**, 183-90.
- Ross, T. et Dalgaard, P.** 2004. Secondary models. Dans : R. C. McKellar and X. Lu (ed.), Modeling microbial responses in food. CRC Series in contemporary food science, Washington, D.C. p. 63-150.
- Rosso, L.** 1995. Modélisation et microbiologie prévisionnelle : élaboration d'un nouvel outil pour l'agro-alimentaire. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard – Lyon I.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S. et Flandrois, J.P.** 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl Environ Microbiol* **61**, 610-16.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J. et Veit, P.,** 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *J Food Prot* **59**, 944-949.
- Rudolf, M. et Scherer, S.** 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J Food Microbiol* **63**, 91-8.

**S**

- Smelt, J.P., Otten, G.D. et Bos, A.P.** 2002. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *Int J Food Microbiol* **73**, 207-12.
- Stanley, N.R., Britton, R.A., Grossman, A.D. et Lazazzera, B.A.** 2003. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* **185**, 1951-7.
- Stecchini, M.L., Del Torre, M., Sarais, I., Saro, O., Messina, M. et Maltini, E.** 1998. Influence of structural properties and kinetic constraints on *Bacillus cereus* growth. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1075-8.
- Stecchini, M.L., Del Torre, M., Donda, S., Maltini, E. et Pacor, S.** 2001. Influence of agar content on the growth parameters of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* **64**, 81-8.
- Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M. et Humphrey, T.J.** 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J Appl Microbiol* **83**, 445-55.
- Swinnen, I.A., Bernaerts, K., Dens, E.J., Geeraerd, A.H. et Van Impe, J.F.** 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *Int J Food Microbiol* **94**, 137-59.

**T**

- Taormina, P.J. et Beuchat, L.R.** 2001. Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2555-63.
- Taormina, P.J. et Beuchat, L.R.** 2002. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and

heat. J Appl Microbiol **92**, 71-80.

**Teo, A.Y. et Knabel, S.J.** 2000. Development of a simple recovery-enrichment system for enhanced detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. J Food Prot **63**, 462-72.

**Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A. et Ross, T.** 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. Appl Environ Microbiol **66**, 4979-87.

## U

**Uyttendaele, M., De Troy, P. et Debevere, J.** 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. Int J Food Microbiol **53**, 75-80.

## V

**Vialette, M., Pinon, A., Chasseignaux, E. et Lange, M.** 2003. Growths kinetics comparison of clinical and seafood Listeria monocytogenes isolates in acid and osmotic environment. Int J Food Microbiol **82**, 121-31.

## W

**Wemekamp-Kamphuis, H.H., Karatzas, A.K., Wouters, J.A. et Abeel, T.** 2002. Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. Appl Environ Microbiol **68**, 456-63.

**Whiting, R.C. et Bagi, L.K.** 2002. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol **73**, 291-5.

**Williams, I., Paul, F., Lloyd, D., Jepras, R., Critchley, I., Newman, M., Warrack, J., Giokarini, T., Hayes, A.J., Randerson, P.F. et Venables, W.A.** 1999. Flow cytometry and other techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. Microbiology **145**, 1325-33.

**Wilson, P.D.G., Brocklehurst, T.F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W.T. et Van Impe, J.F.** 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. Int J Food Microbiol **73**, 275-89

**Wimpenny, J.W., Leistner, L., Thomas, L.V., Mitchell, A.J., Katsaras, K. et Peetz, P.** 1995. Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. Int J Food Microbiol **28**, 299-315.

**Wright, K.M., Coleman, H.P., Mackie, A.R., Parker, M.L., Brocklehurst, T.F., Wilson, D.R. and Hills, B.P.** 2000. Determination of mean growth parameters of bacterial colonies immobilized in gelatin gel using a laser gel-cassette scanner.

**Wu, Y., Griffiths, M.W. et McKellar, R.C.** 2000. A comparison of the bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of individual cells of *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol **30**, 468-72.

## X

**Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. et Colwell, R.R.** 1982. Survival and viability of nonculturable *E. coli* and *V. cholerae* in the estuarine and marine environment. Microb Ecol **8**, 313-23.

## Z

- Zaika, L.L., Phillips, J.G., Fanelli, J.S. et Scullen, O.J.** 1998. Revised model for aerobic growth of *Shigella flexneri* to extend the validity of predictions at temperatures between 10 and 19°C. *Int J Food Microbiol* **41**, 9-19.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. et van't Riet, K.** 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1875-81.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C. et van't Riet, K.** 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1094-1101.
- Zwietering, M.H., de Wit, J.C., Cuppers, H.G.A.M. et van't Riet, K.** 1994. Modeling of the bacterial growth with shifts in temperature. *Appl Environ Microbiol* **60**, 204-13.



---

## Title

Variability of individual lag times of *Listeria monocytogenes* as a function of the stress undergone and the re-growth conditions.

---

## Abstract

The contamination level of food products by *Listeria monocytogenes* is usually very low. Moreover, the cells can be stressed by the food processing events or by the environmental conditions encountered in the food industries. At the opposite, predictive growth models are mostly constructed on experiments carried out with a high non stressed inoculum. Our objective was to characterize the variability of individual lag times of *L. monocytogenes* for different physiological states and growth conditions and for several strains.

First, we developed a method to study the individual lag times of immobilized cells of *L. monocytogenes* and we proposed an original method to retrieve individual lag times from detection times in solid and liquid medium.

Afterwards, we showed the influence of the physiological state. The individual lag times of *L. monocytogenes* were determined for cells previously subjected to 22 different stress protocols taken from the conditions encountered by the cells in the environment of the food industries. Then, we observed that the individual lag times were inversely proportional to the growth rate whatever the tested re-growth conditions. Moreover, we observed that the strain variability was small and independent of the origin of the strains. Finally, we found that the best distribution for describing the observed individual lag time distributions was the extreme value distribution (with a fixed shape parameter).

By regrouping all the datasets, the modelling allowed us to retrieve the standard deviation of an individual lag time dataset from its mean and to retrieve the mean from the population lag time.

---

## Keywords

*Listeria monocytogenes*, lag time, variability, stress, physiological state, immobilized cells, modelling, predictive microbiology.

---

---

## Résumé :

Le niveau de contamination des denrées alimentaires par *Listeria monocytogenes* est généralement très faible. De plus, les cellules peuvent être dans un état de stress provoqué par les technologies de fabrication et les conditions environnementales. Les modèles de microbiologie prévisionnelle sont pour la plupart construits sur des données récoltées avec des inoculums forts et dans un état physiologique non stressé. L'objectif de cette étude était de caractériser la variabilité des temps de latence des cellules de *L. monocytogenes* dans différents états physiologiques et conditions de re-croissance et pour plusieurs souches.

Nous avons tout d'abord mis au point une méthode d'étude des temps de latence des cellules de *L. monocytogenes* en milieu solide et proposé une approche originale de détermination des temps de latence cellulaires à partir des temps de détection en milieux liquide et solide.

Ainsi, nous avons pu montrer l'influence de l'état physiologique. Les temps de latence de *L. monocytogenes* ont été déterminés pour des cellules préalablement exposées à 22 protocoles de stress choisis parmi les facteurs écologiques rencontrés par les cellules dans l'environnement des industries agro-alimentaires. Ensuite, nous avons montré que, pour un état physiologique donné, les temps de latences des cellules étaient inversement proportionnel au taux de croissance dans les différentes conditions de re-croissance testées. De plus, nous avons observé que la variabilité entre les souches était modérée et indépendante de l'origine des souches. Enfin, nous avons montré que toutes les distributions des temps de latence cellulaires pouvaient être décrites au mieux par la distribution des valeurs extrêmes (avec un paramètre de forme fixé).

En regroupant l'ensemble des données, la modélisation nous a permis de retrouver l'écart type des temps de latence cellulaires à partir de la moyenne et de proposer une relation permettant l'estimation de la moyenne des temps de latence cellulaires à partir du temps de latence populationnel obtenu avec un inoculum fort.

---

## Discipline :

Microbiologie

---

## Mots clés :

*Listeria monocytogenes*, temps de latence, variabilité, stress, état physiologique, cellules immobilisées, modélisation, microbiologie prévisionnelle.

---

## Intitulé et adresse du laboratoire :

Unité Risque Alimentaire, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général De Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex.

## Intitulé et adresse de l'entreprise :

Arilait Recherches, 42 rue de Châteaudun, 75314 Paris Cedex 09.

---