



Biopréservation et hautes pressions : effet sur les communautés microbiennes

Stabilisation des contaminants bactériens des jambons cuits après traitement haute pression et ajout d'une culture protectrice.

Mots-clés : biopréservation, *Lactococcus lactis*, haute pression, séquençage haut débit, communautés bactériennes.

Auteur : Monique Zagorec¹, Marie Champomier-Vergès², Sandrine Guillou¹, Stéphane Chaillou².

¹ Oniris, INRAE, SECALIM, UMR1014, Nantes, France

² Université Paris Saclay, AgroParisTech, INRA, Institut MICALIS, Jouy En Josas, France

Les communautés bactériennes présentes dans les dés de jambon cuit montrent une certaine diversité : elles peuvent être dominées par des firmicutes ou des protéobactéries, dont parfois des espèces jusque-là non cultivées. Ces communautés répondent différemment au traitement haute pression et à la biopréservation. Néanmoins, la combinaison des deux traitements permet de stabiliser le produit, avec envahissement par la souche protectrice.

Résumé :

Les communautés bactériennes présentes sur le jambon cuit ont été caractérisées. Elles étaient dominées soit par des firmicutes soit par des protéobactéries, dont parfois des espèces jusque-là non cultivées. Leur dynamique après traitement haute pression et ajout d'une culture protectrice a été suivie. Si chaque communauté répond différemment au traitement haute pression et à la biopréservation, la combinaison des deux traitements permet bien de stabiliser le produit, avec un envahissement par la souche protectrice.

Abstract: Stabilization of bacterial contaminants in cooked hams after high-pressure treatment and addition of a protective culture

Bacterial communities present on diced cooked ham were characterized. They were dominated either by Firmicutes or by proteobacteria, with some species that have not yet been cultivated. Their dynamics after high-pressure treatment and addition of a protective culture was monitored. Although each bacterial community reacts differently to the treatments, the combination of high pressure and biopreservation indeed stabilizes the product with overgrowth of the protective culture.

INTRODUCTION

Les produits carnés réfrigérés sont périssables en raison de l'inévitable contamination bactérienne lors des différentes étapes de fabrication et de la croissance bactérienne lors de la conservation. Différents ingrédients ou additifs, comme le sel ou les sels nitrés, outre leur rôle pour les qualités organoleptiques du produit, contribuent à stabiliser le produit. Dans le cas des produits de charcuterie, tels que les jambons cuits, la diminution des quantités de sels nitrés devient nécessaire pour garantir la santé du consommateur. Cette diminution des doses de sels nitrés est susceptible d'augmenter le risque microbiologique dans ces produits. Par ailleurs des solutions alternatives telles que les traitements à haute pression (HP) et la biopréservation (ajout de cultures protectrices) existent.

I. MATERIELS ET METHODES

I.1. Echantillonnage, extraction et stockage des communautés.

Des dés de jambon du commerce ont été collectés et stockés au laboratoire à 4°C. La flore totale et la flore lactique ont été dénombrées à 30°C sur milieu PCA (Plate Count Agar) et MRS (Man Rogosa Sharp), respectivement. Lorsque la flore totale atteignait environ 108 UFC/g, les dés de jambon étaient additionnés d'eau peptonée, homogénéisés au stomacher et les mélanges étaient ensuite filtrés pour se débarrasser des débris puis centrifugés pour récolter les culots bactériens. Les bactéries étaient alors resuspendues dans de l'eau peptonée additionnée de glycérol. Ces suspensions bactériennes, obtenues sans culture préalable et représentant donc l'ensemble des contaminants présents au moment de la collecte, étaient aliquotées et congelées directement à -80°C selon la méthode décrite par Rouger *et al.* (2017).

I.2. Extraction des ADN, séquençage et analyses de la diversité bactérienne.

L'analyse de la diversité bactérienne par méthode non-culturelles s'effectue en trois étapes successives. La première consiste à séparer les cellules microbiennes de la matrice jambon par broyage et centrifugation différentielle. Une fois cette étape réalisée, les cellules bactériennes sont lysées par une combinaison d'actions mécanique et enzymatique afin de récupérer l'ADN natif de chacune des cellules. C'est sur ce mélange d'ADN, issu de toutes les espèces bactériennes présentes dans le jambon, qu'une stratégie d'amplification PCR ciblée sur un gène marqueur conservé dans toutes les espèces (en général le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S) est appliquée. Cette troisième étape requiert une analyse computationnelle de l'information obtenue après séquençage des amplicons (des dizaines de milliers de séquences par échantillon). L'analyse computationnelle consiste à agglomérer les séquences similaires à un seuil d'identité pour ne garder qu'un ensemble réduit de séquences représentatives d'un niveau taxonomique choisi (par exemple un seuil d'identité de 97% pour le niveau taxonomique de l'espèce).

II. RESULTATS ET DISCUSSION

Une étude préliminaire par numération sur milieu de culture a montré que le taux de contamination des dés de jambon du commerce variait d'un lot à l'autre. En effet

Dans ce travail nous avons dans un premier temps déterminé la nature des communautés bactériennes présentes sur des dés de jambon par des méthodes non ciblées (sans a priori), c'est-à-dire par séquençage haut débit, sans phase de culture préalable. Ensuite, nous avons recherché l'effet des traitements Hautes Pressions (HP) et de la biopréservation sur ces communautés bactériennes.

Pour ce faire, nous avons stocké les communautés bactériennes, directement extraites de dés de jambon du commerce, pour pouvoir les inoculer dans des dés de jambons paucimicrobiens (préparés de manière aussi aseptique que possible) de manière à obtenir des produits cuits standardisés et proches des conditions réelles. Cette approche nous a permis de suivre la dynamique de ces communautés lors du stockage, après application des traitements.

Ces séquences représentatives, sont ensuite comparées à des bases de données nucléotidiques de gènes 16S connus (la base la plus populaire est la base Européenne SILVA) afin d'assigner une taxonomie à ces séquences. Elles sont alors qualifiées d'unité taxonomique (OTU pour « Operational Taxonomic Unit » en Anglais). Ce processus d'analyse de la diversité est en général considéré comme semi-quantitatif, c'est-à-dire que les espèces majoritaires seront caractérisées par des unités taxonomiques très abondantes (plusieurs milliers de séquences par lot) et celles minoritaires par des unités taxonomiques ne regroupant que quelques séquences.

I.3. Sélection de la souche bioprotectrice

La sélection de la souche protectrice a été faite à partir d'une collection de 63 souches de bactéries lactiques de diverses origines, comprenant plusieurs étapes : i) vérification des critères de sécurité et d'innocuité, ii) action inhibitrice vis-à-vis d'espèces bactériennes sporulantes de *Bacillus* et de *Clostridium*, et iii) résistance et capacité à se multiplier au cours du stockage réfrigéré, après l'application d'un traitement HP de 500 MPa pendant 5 min à 20°C. Une souche de *Lactococcus lactis* a été considérée comme la meilleure candidate pour développer un nouveau traitement combinant HP et biopréservation dans le jambon cuit (Ramaroson *et al.*, 2018).

I.4. Application des traitements

Des dés de jambon paucimicrobiens inoculés à 104 UFC/g à l'aide des communautés microbiennes extraites et stockées à -80°C, ont été mis sous-vide. Après une nuit à 4°C, la souche protectrice *L. lactis* a été inoculée à 107 UFC/g. Les dés de jambon ont ensuite été traités par Hautes Pressions à 500 MPa à 20°C pendant 5 min dans un pilote horizontal de 50 L (ACB, Nantes, France) avec une vitesse de compression de 8 MPa·s⁻¹ et une décompression quasi-instantanée. Les dés de jambon ont ensuite été stockés à 8°C pendant 30 jours pour un suivi des communautés microbiennes.

certaines lots montraient déjà un taux de contamination de l'ordre de 106 à 107 UFC/g après 5 jours de conservation à 4°C tandis que d'autres n'atteignaient que 103 UFC/g après 7

jours. Afin de recueillir les communautés bactériennes avec une densité de population équivalente nous nous sommes donc procuré des échantillons du commerce au plus près de la date de fabrication que nous avons ensuite stockés à 4°C. Les communautés bactériennes ont été récoltées sur des dés de jambon non altérés lorsque la flore totale atteignait environ 108 UFC/g de manière à collecter une population suffisamment importante. Cela nous a permis d'obtenir des échantillons relativement standardisés (~107 UFC/ml) et représentant l'ensemble des communautés bactériennes présentes sur des dés de jambon.

L'analyse des données de séquençage réalisé sur l'ADN extrait des communautés bactériennes de dés de jambon nous a permis de savoir quelles espèces étaient présentes et en quelles quantités relatives. Sur 4 lots étudiés, nous avons observé que le nombre d'unités taxonomiques détectées était relativement faible. En revanche, leur abondance relative variait suivant les lots. Deux des lots étaient dominés par des unités taxonomiques appartenant aux Firmicutes, tandis que les 2 autres renfermaient principalement des Protéobactéries.

Le Tableau 1 montre le détail des unités taxonomiques présentes dans les 4 lots et leur abondance relative. Dans l'un des 4 lots, une unité taxonomique assignée au genre *Vibrio* représentait 57,4% des séquences. Cette unité taxonomique n'a pas été cultivée à ce jour et n'est donc connue que par sa séquence d'ADN présente dans les bases de données.

Les communautés bactériennes de deux des 4 lots ont été utilisées pour réaliser des challenge- tests afin de suivre l'effet de différents traitements. Nous avons choisi les communautés bactériennes des lots 2 et 4 car elles étaient différentes et le lot 4 présentant un *Vibrio* inconnu nous paraissait particulièrement intéressant. Des dés de jambon paucimicrobiens ont été inoculés par les communautés bactériennes puis traités par haute pression et/ou ajout d'une culture protectrice. Les dés de jambon ont ensuite été stockés à 8°C. La dynamique des communautés microbiennes de ces jambons a été suivie par la même méthode de séquençage haut débit et nous avons comparé leur comportement par rapport à des contrôles non traités.

Tableau 1 : Abondance relative (en % du nombre total de séquences) des 20 espèces majoritaires dans les 4 lots de jambon analysés.

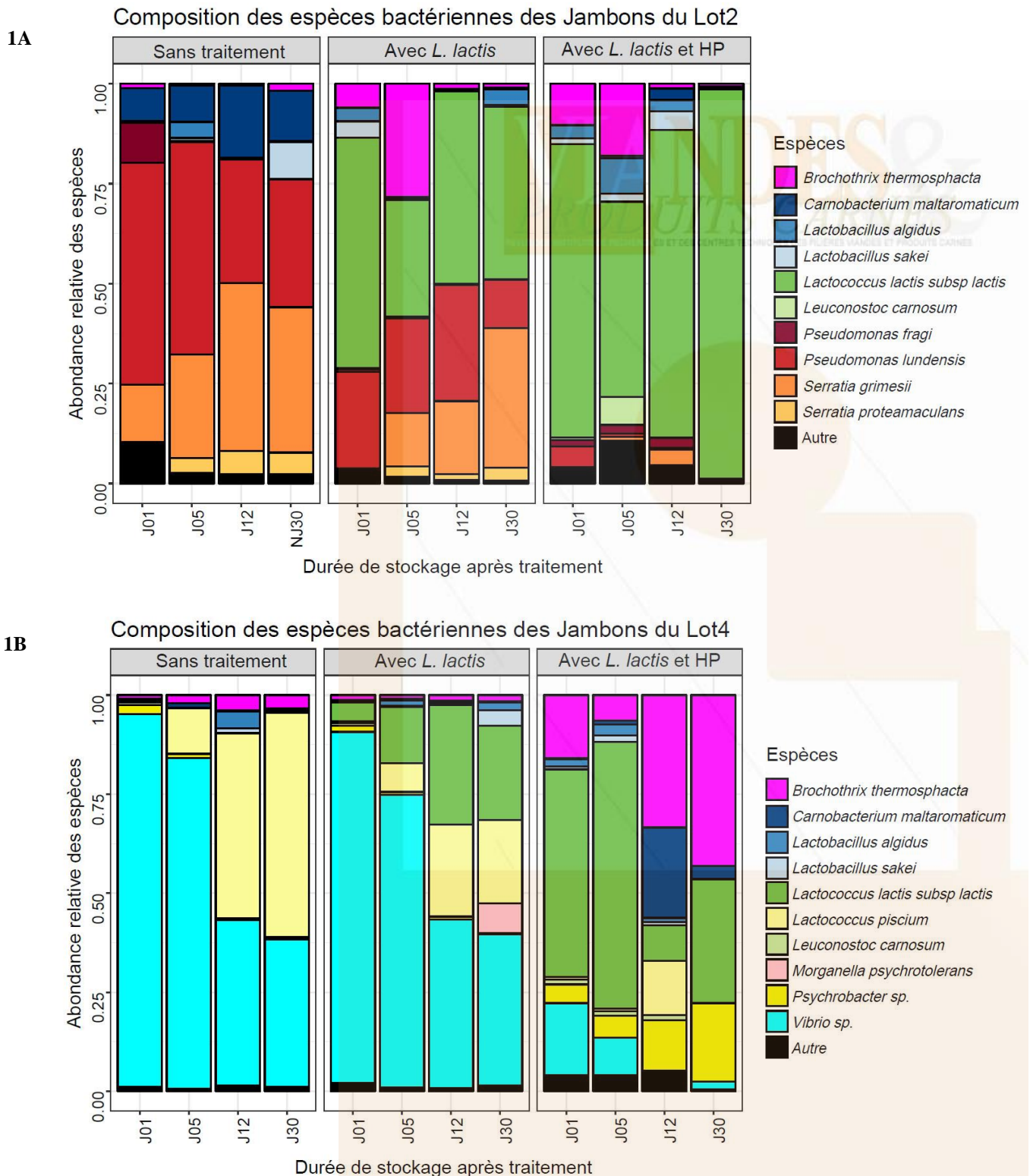
Taxonomie des espèces (unité taxonomique)	LOT1	LOT3	LOT2	LOT4
Actinobactéries				
<i>Glutamicibacter sp.</i> , espèce inconnue	-	-	-	0,8
<i>Arthrobacter sp.</i> , espèce inconnue	-	-	-	0,6
Firmicutes				
<i>Lactobacillus sakei</i>	77,0	55,7	0,3	0,1
<i>Leuconostoc carnosum</i>	19,2	31,8	0,2	0,1
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0,2	0,2	1,8	10
<i>Carnobacterium sp.</i> , espèce inconnue	-	-	0,1	11,4
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	0,1	0,1	8,6	0,4
<i>Lactobacillus algidus</i>	2,9	4,9	0,1	0,7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,1	3,1	0,1	-
<i>Lactococcus piscium</i>	0,1	0,1	0,1	0,5
Protéobactéries				
<i>Pseudomonas lundensis</i>	0,1	1	74,5	0,4
<i>Vibrio sp.</i> , espèce inconnue	-	-	-	57,4
<i>Psychrobacter sp.</i> , espèce inconnue A	-	-	-	11,7
<i>Pseudomonas fragi</i>	0,3	2,7	5,8	0,8
<i>Hafnia alvei</i>	0,1	0,1	7,3	0,1
<i>Psychrobacter sp.</i> , espèce inconnue B	-	-	-	3,9
<i>Serratia grimesii</i>	-	-	0,9	-
<i>Acinetobacter harbinensis</i>	0,3	0,4	-	0,1
<i>Rouxiella sp.</i> , espèce inconnue	-	-	0,6	-
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	-	-	0,1	0,6

Les jambons sont classés selon le type de communautés qu'ils contiennent et les espèces sont classées par phylum et par ordre d'abondance.

Les deux communautés bactériennes se comportaient différemment (Figure 1). Dans le cas du lot 2, la culture protectrice se montrait relativement compétitive puisqu'elle devenait dominante et représentait environ 50% de la population totale, jusqu'à la fin du temps d'incubation (30 jours). La combinaison du traitement HP et de l'ajout de la culture protectrice était encore plus efficace puisque la souche protectrice recouvrait presque entièrement les communautés bactériennes du lot 2, et cela jusqu'à la fin du stockage. En revanche, dans le lot 4, la souche protectrice seule n'arrivait à représenter qu'environ 1/4 de la population bactérienne en fin

de stockage et n'arrivait pas à dominer *Lactococcus piscium*, une espèce potentiellement altérante de la viande. Néanmoins elle semblait compétitive contre le *Vibrio* mentionné ci-dessus. De même, le traitement HP, s'il arrivait à lutter contre *Vibrio*, ne semblait pas efficace dans le temps pour contenir *L. piscium*. La combinaison des deux traitements sur le lot 2 s'est révélée efficace contre *Vibrio* et *L. lactis* mais a néanmoins permis à une autre espèce potentiellement altérante (*Brochothrix thermosphacta*) de dominer en fin de stockage.

Figure 1 : composition des communautés bactériennes de 2 lots de jambon lors de la conservation à 8°C, après ajout d'une souche protectrice et traitement HP.



Les communautés bactériennes ont été déterminées à J+1, J+5, J+12 et J+30. La souche protectrice a été ajoutée à J0 et le traitement HP a été réalisé juste après. Un contrôle sans aucun traitement a été réalisé. Les espèces majoritaires sont représentées par un code couleur.

CONCLUSION

Nous avons montré que la combinaison d'un traitement HP avec l'ajout d'une souche protectrice sur des dés de jambon peut stabiliser le produit durablement lors de la conservation à basse température. Globalement, cette combinaison des deux traitements est plus efficace que chacun des deux pris séparément. Cependant, ces traitements

peuvent être différemment efficaces suivant la nature des communautés bactériennes présentes sur le jambon avant traitement. Cela peut expliquer les résultats parfois contradictoires trouvés dans la littérature quant à l'efficacité de la bioprotection et des traitements hautes pressions pour garantir la qualité sanitaire des aliments carnés. Dans cette

étude nous avons montré que la charge bactérienne et sa composition varient d'un lot à l'autre et qu'un grand nombre de répétitions seraient nécessaires avant de pouvoir conclure sur l'efficacité d'un traitement. Néanmoins la réalisation de challenge tests où sont inoculées des communautés bactériennes identiques permet de réduire le nombre de répétitions nécessaires. En effet, nous avons déjà montré la répétabilité de ce genre d'approche. Il n'en reste pas moins nécessaire de décrire de manière précise la nature et la diversité de l'ensemble des contaminants.

Nous avons également montré qu'une même souche bactérienne protectrice se développe différemment en fonction des communautés bactériennes auxquelles elle est confrontée dans l'écosystème. Au-delà, même si elle est sélectionnée pour des propriétés inhibitrices spécifiques vis-à-vis d'une espèce particulière donnée dont on voudra limiter le développement, elle peut donc en fonction de ces

communautés initiales et de sa compétitivité dans l'écosystème s'avérer efficace pour limiter le développement d'autres espèces non ciblées initialement comme on l'a vu avec *Vibrio*. A l'inverse, ce jeu d'équilibre entre les espèces peut aussi concourir à favoriser le développement d'une espèce indésirable comme illustré ici avec *Brochothrix thermosphacta*. On voit donc qu'il est difficile sur la base d'un critère de prédire une efficacité tout terrain pour une souche protectrice. La clé de la robustesse des technologies de biopréservation passe bien par la combinaison de techniques comme on l'a vu mais également par la recherche de la plus grande homogénéité possible des communautés initiales c'est-à-dire une bonne maîtrise de la connaissance des contaminants et des facteurs qui concourent à leur installation dans les produits carnés.

Bibliographie :

Ramaroson M., Guillou S., Rossero A., Reze S., Anthoine V., Moriceau N., Martin J.-L., Duranton F., Zagorec M. (2018). Selection procedure of bioprotective cultures for their combined use with High Pressure Processing to control spore-forming bacteria in cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, 276, 28-38.

Rouger A., Remenant B., Prévost H., Zagorec M. (2017). A method to isolate bacterial communities and characterize ecosystems from food products: Validation and utilization in as a reproducible chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 38-47.