

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE-BIOLOGIE

N° attribué par la bibliothèque

Année 2008

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Caractérisation de bactéries lactiques
psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la
biopréservation des aliments. Étude physiologique
et moléculaire des mécanismes d'adaptation au
froid

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment

Spécialité : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Sébastien MATAMOROS

Le 7 mars 2008, devant le jury :

<i>Rapporteurs</i>	Mme ORANGE Nicole, <i>Professeur, Université de Rouen</i> M. MALLE Pierre, <i>Chercheur, AFSSA, Boulogne-sur-mer</i>
<i>Directeur de thèse</i>	M. PRÉVOST Hervé, <i>Professeur, ENTIAA, Nantes</i>
<i>Co-directrice de thèse</i>	Mme LEROI Françoise, <i>Chercheur, IFREMER, Nantes</i>
<i>Examineurs</i>	M. FLEURENCE Joël, <i>Professeur, Université de Nantes</i> Mme CHEVALLIER Isabelle, <i>Professeur, ENITA, Clermont-Ferrand</i>
<i>Membre invité</i>	Mme PILET Marie-France, <i>Maître de conférences, ENTIAA, ENVN, Nantes</i>

*A ma famille
A celle qui y a cru depuis le début...*

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, et plus particulièrement Madame Nicole ORANGE, professeur à l'Université de Rouen ainsi que Monsieur Pierre MALLE, chercheur à l'AFSSA de Boulogne-sur-Mer pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie particulièrement Monsieur Hervé PRÉVOST, professeur à l'ENITIAA de Nantes d'avoir été mon directeur de thèse et de m'avoir accueilli dans l'UMR INRA 1014 SECALIM pour y effectuer ce travail, ainsi que pour son soutien scientifique tout au long de ces 3 années.

Je remercie également Madame Françoise LEROI, cadre de recherche au département STAM de l'IFREMER de Nantes pour m'avoir accueilli dans ces locaux et pour avoir été ma co-directrice de thèse. Je la remercie vivement pour ses conseils et ses corrections lors de la rédaction des différents articles de cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Marie-France PILET, maître de conférences à l'ENITIAA et à l'ENV de Nantes pour son encadrement, son soutien et sa patience à tous les moments de l'élaboration de cette thèse.

Je remercie les enseignants chercheurs de l'UMR SECALIM à l'ENITIAA, Madame Bénédicte SORIN, Monsieur Xavier DOUSSET, Monsieur Bernard ONNO et Monsieur Djamel DRIDER pour leurs conseils et leurs encouragements, notamment lors mes participations aux enseignements de travaux pratiques destinées aux élèves ingénieurs de l'ENITIAA.

Je remercie tout le personnel du laboratoire de microbiologie de l'ENITIAA, Isabelle, Martine, Maguy, Sylvie, Sébastien, Zina et Angélique pour leur soutien technique et leur bonne humeur qui font de ce laboratoire ce qu'il est. Je remercie également Madame Frédérique GIGOUT et Monsieur Jean-Jacques JOFFRAUD de l'IFREMER pour m'avoir

supporté, ainsi que Monsieur Marc JÉROME pour ses précieux conseils en biologie moléculaire et Madame Mireille CARDINAL et l'équipe d'analyse sensorielle. Enfin je remercie tout le personnel de l'UMR 1014 SECALIM à l'ENV pour m'avoir accueilli et conseillé pendant les travaux d'électrophorèse bidimensionnelle, et en particulier Monsieur Michel FEDERIGHI, Madame Magali RITZ, Madame Sandrine GUILLOU, Monsieur Albert ROSSERO, Florence et Florence, et encore une fois Marie-France PILET.

Pour finir j'adresse un grand remerciement à l'ensemble des étudiants et post-doctorants de tous ces laboratoires et notamment Amélie, Ségolène, Morgan, Maria, Jitkha, Sergio, Mounir, Karim, Yanath, Emmanuel, Fatima, Baptiste et Antoine ainsi que tous ceux (innombrables) que j'ai croisés au cours de ces années.

Valorisation du travail de thèse

Publications :

- **Matamoros S.**, Pilet M.F., Chevalier F., Prévost H., Leroi F. 2006. Isolation and characterisation of psychrophilic lactic acid bacteria isolated from seafood products. *In* Seafood research from fish to dish – Quality, safety and processing of wild and farmed fish. Ed. Luten J.B., Jacobsen C., Bekaert K., Saebo A., Oehlenschläger J. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.
- **Matamoros S.**, Pilet M.F., Gigout F., Prévost H. and Leroi F. 2007. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Article soumis à* : International Journal of Food Microbiology.
- **Matamoros S.**, Leroi F., Cardinal M., Gigout F., Kasbi Chadli F., Cornet J., Prévost H. and Pilet M.F. 2007. Improving safety and quality of vacuum packed cooked and peeled tropical shrimps and cold smoked salmon using psychrotrophic lactic acid bacteria. *Article soumis à* : Journal of Food Protection.
- **Matamoros S.**, Prévost H., Leroi F., and Pilet M.F. 2008. Growth characteristics and cold adaptation mechanisms of *Lactococcus piscium* EU2241, a psychrotrophic lactic acid bacterium isolated from seafood products. *Article en preparation*.
- Leroi F., Joffraud J.J., Amarita J.C., Arboleya Z., Cruz F., Izurieta E., Lasagabaster A., Martínez de Marañón I., Miranda I., Nuin M., Olabarrieta I., Lauzon H.L., Lorentzen G., Bjørkevoll I., Olsen R., Dousset X., **Matamoros S.**, Pilet M.F., Prévost H. and Skjerdal T. 2008. Hurdle technology to ensure the safety of seafood products. *In* Improving seafood products for the consumer. Ed. Børresen T. *In press*.

Communications orales :

- Matamoros S., Pilet M.F., Chevalier F., Prévost H. and Leroi F. WEFTA 2005 (West European fish technology association), Anvers (Belgique) : Isolation and characterisation of psychrophilic lactic acid bacteria isolated from seafood products.
- Brillet A., Matamoros S., Blanchet-Chevrollier C., Leroi F., Prévost H. and Pilet M.F. WEFTA 2005, Anvers (Belgique) : Selection of non-tyramine producing *Carnobacterium* strains for the biopreservation of cold-smoked salmon.
- Matamoros S., Pilet M.F., Chevalier F., Prévost H. and Leroi F. TAFT 2006 (Trans-Atlantique fisheries technology), Québec (Québec) : Evaluation of psychrophilic lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of seafood products.
- Matamoros S., Leroi F., Prévost H., Chevalier F., Cardinal M. et Pilet M.F. SFM 2007 (Société Française de microbiologie), Nantes (France) : Identification de bactéries lactiques psychrophiles isolées de produits de la mer et évaluation de leur potentiel bioprotecteur.

Communication affichées :

- 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria 2005, Egmond aan Zee : Selection of psychrophilic lactic acid bacteria active against spoilage and pathogenic microorganisms relevant for seafood products.
- First International Symposium on Antimicrobial Peptides Food, Veterinary and Medical Applications 2006, Nantes : Characterization of psychrophilic lactic acid bacteria for the biopreservation of seafood products.
- IUFOST 2006 (International union of food science and technology), Nantes : Biopreservation of lightly preserved seafood products : strategies and perspectives.
- CBL 2007 (Club des bactéries lactiques), Rennes : Comportement d'une bactérie lactique psychrotrophe à différentes températures.

Abréviations

- ABVT : Azote Basique Volatil Total
- AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
- AFNOR : Agence Française de Normalisation
- CAP : Cold Adaptation Protein (protéine d'adaptation au froid)
- CIP : Cold Induced Protein (protéine induite par le froid)
- CSP : Cold Shock Protein (protéine de choc froid)
- DLC : Date Limite de Consommation
- EFSA : European Food Safety Authority (Autorité Européenne de sécurité des aliments)
- FAO : Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)
- GRAS : Generally Recognized As Safe (généralement reconnu sans risques)
- HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide à hautes performances)
- LC-MS/MS : Liquid Chromatography, double Mass Spectrometry (chromatographie liquide et double spectrométrie de masse)
- LH : Long and Hammer
- OFIMER : Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture
- ORF : Open reading frame (phase ouverte de lecture)
- pb : paire de base
- Q RT-PCR : Quantitative Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (PCR quantitative par transcription inverse)
- TMA : Triméthylamine
- TMAO : Triméthylamine Oxyde
- UFC : Unité Formant Colonie

Abréviations des noms de microorganismes :

- *Ac. : Aerococcus*
- *Ae. : Aeromonas*
- *B. : Bacillus*
- *Bx. : Brochotrix*
- *Cb. : Carnobacterium*
- *Cl. : Clostridium*
- *E. : Escherichia*
- *Ec. : Enterococcus*
- *L. : Listeria*
- *Ln. : Leuconostoc*
- *Lb. : Lactobacillus*
- *Lc. : Lactococcus*
- *Oe. : Oenococcus*
- *Pc. : Pediococcus*
- *Ph. : Photobacterium*
- *Sc. : Streptococcus*
- *Se. : Serratia*
- *St. : Staphylococcus*
- *Sw. : Shewanella*
- *Tc. : Tetragenococcus*
- *Vc. : Vagococcus*
- *We. : Weisella*

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1) LES PRODUITS DE LA MER SEMI-PRESERVES.....	4
1.1 <i>La crevette tropicale</i>	5
Commerce et consommation	5
Production	6
Flore d'altération de la crevette.....	7
Flore pathogène de la crevette.....	8
1.2 <i>Le saumon fumé</i>	9
Commerce et consommation	9
La fabrication du saumon fumé.....	10
Evolution de la flore du saumon fumé	12
La flore d'altération du saumon fumé.....	14
La flore pathogène du saumon fumé	15
2) LES BACTERIES LACTIQUES DANS LES PRODUITS DE LA MER.....	17
2.1 <i>Les bactéries lactiques dans l'alimentation</i>	17
Caractères bactériologiques et taxonomiques	17
Rôle des bactéries lactiques dans l'altération des aliments	19
2.2 <i>Les bactéries lactiques dans les produits de la mer</i>	20
Origine des bactéries lactiques dans les produits de la mer : présence chez les poissons vivants	20
Biodiversité de la flore lactique rencontrée dans les produits de la mer.....	22
L'altération des produits de la mer par les bactéries lactiques	25
3) UTILISATION DE BACTERIES LACTIQUES POUR LA BIOPRESERVATION DES ALIMENTS ...	26
3.1 <i>Aspects généraux de la biopréservation</i>	26
La technologie des barrières.....	26
La biopréservation	27
Les bactéries lactiques dans la biopréservation.....	27
3.2 <i>La biopréservation des produits de la mer</i>	30
Utilisation des bactéries lactiques dans la biopréservation des produits de la mer.....	30
La production de bactériocines dans la biopréservation	31
Amélioration de la qualité organoleptiques des produits semi-préservés	32
4) L'ADAPTATION AU FROID CHEZ LES BACTERIES	33
4.1 <i>Effet du froid sur les bactéries</i>	33
Température de croissance et effet du froid sur le métabolisme.....	33
Une clé de l'adaptation au froid : la synthèse de protéines.....	34
Un cas particulier de l'adaptation au froid : les psychrotrophes et psychrophiles.....	37
3.2 <i>Adaptation au froid chez les bactéries lactiques</i>	39
Effet du froid sur la croissance des bactéries lactiques	39
Les protéines induites par le froid	40
Synthèse de protéines de choc froid (CSP) chez les bactéries lactiques	40
Rôle des CSP dans la cryotolérance	42

RESULTATS	44
CHAPITRE I.....	44
Isolement et identification de souches de bactéries lactiques inhibitrices à partir de produits de la mer	
CHAPITRE II	73
Amélioration de la qualité et de la sécurité microbiologique de crevettes cuites décortiquées et de saumon fumé emballés sous vide par utilisation de bactéries lactiques psychrotrophes	
CHAPITRE III	105
Caractéristiques de croissance et mécanismes d’adaptation au froid d’une bactérie lactique psychrotrophe	
DISCUSSION GENERALE	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	143
ANNEXES	160

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Schéma du procédé type de cuisson des crevettes.....	6
Figure 2 : Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (adapté de Dellaglio <i>et al.</i> , 1994).....	18
Figure 3 : Représentation du taux de croissance bactérien en fonction de la température.....	34
Figure 4 : (a) séquence en acides aminés de la protéine CspA de <i>E. coli</i> et (b) structure tridimensionnelle.....	37
Figure 5 : Alignement de séquences protéiques de Csp.....	41
Figure 6 : Electrophorèse sur un gel à 1,5% d'agarose des fragments ITS 16S-23S amplifiés par PCR des isolats des genres <i>Lactococcus</i> et <i>Leuconostoc</i>	69
Figure 7 : Arbre phylogénétique établi sur la base de la comparaison des séquences de gènes d'ARN 16S montrant la relation entre la souche EU2241 et les espèces les plus proches.....	71
Figure 8 : représentation simultanée des échantillons de crevettes emballés sous vide et des descripteurs d'odeurs sur le plan 1-2 de l'analyse en composantes principales.....	102

Tableaux

Tableau 1 : Genres et espèces de bactéries altérantes isolées du saumon fumé.....	13
Tableau 2 : Principaux genres de bactéries lactiques.....	19
Tableau 3 : Bactéries lactiques isolées de produits de la mer et fréquence d'isolement selon les études.....	24
Tableau 4 : Exemples de bactéries lactiques utilisées en biopréservation.....	28
Tableau 5 : Profils de PCR ITS et configuration de l'acide lactique des groupes d'isolats obtenus grâce au spectre d'inhibition.....	70

Introduction

En 1856, Pasteur découvre des microorganismes contaminants, responsables d'un accident de fermentation de jus de betteraves dans une distillerie du Nord de la France. Il vient de découvrir les bactéries lactiques, une classe de microorganismes étroitement liés à l'activité humaine, et qui aujourd'hui encore ne cesse de s'élargir.

Bien que leur rôle soit resté pendant bien longtemps méconnu, les bactéries lactiques sont présentes depuis toujours dans l'alimentation humaine. Des vestiges de peintures et d'outils spécifiques attestent de la connaissance qu'avaient les civilisations du pourtour de la Méditerranée des techniques de fermentation du lait et de la fabrication de fromages. De même indirectement, la fabrication de pain, de bière, les salaisons de produits carnés ou marins et les fermentations de végétaux font intervenir une fermentation lactique qui rend indissociable l'alimentation humaine et les bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques forment un groupe complexe et hétérogène, qui a subi de nombreux remaniements au cours de son existence, depuis les premières observations d'Orla-Jensen dans les années 1920, jusqu'aux méthodes moléculaires d'aujourd'hui. Les dernières modifications majeures remontent aux années 1990, et de nouvelles espèces sont identifiées régulièrement.

Il est aujourd'hui possible de sélectionner, identifier et cultiver des germes pour toute sorte d'usages : alimentaires (starters de fermentation), médicaux (probiotiques) ou biotechnologiques (production de molécules : bactériocines, polysaccharides). Les domaines alimentaires principaux dans lesquels le rôle des bactéries lactiques est reconnu sont les produits laitiers et carnés fermentés, la panification et la vinification. Comme on peut le constater, il s'agit avant tout de méthodes de conservation des aliments ancestrales qui sont maintenant mieux maîtrisées. La biopréservation est une technique dérivée de ses méthodes, qui consiste à inoculer un produit alimentaire avec des souches de bactéries sélectionnées de manière à inhiber la croissance des flores bactériennes indésirables. Cependant, à l'inverse des fermentations classiques elle ne s'accompagne pas d'une importante transformation des caractéristiques organoleptiques.

Cette technique prometteuse s'intègre dans le concept de la technologie des barrières : on soumet le produit non plus à un unique processus de conservation global (comme la pasteurisation ou le séchage), mais à une suite de processus au final peu agressifs pour le produit dont la succession va se révéler impossible à surmonter pour les flores indésirables.

La réfrigération est un élément essentiel de la technologie des barrières, et constitue le mode de conservation principal de nombreux produits faiblement préservés. Dès lors il faut

s'assurer que les bactéries candidates pour la biopréservation soient adaptées aux températures utilisées.

Les produits semi-préservés sont des produits fragiles, dont les qualités microbiologiques et organoleptiques peuvent se dégrader rapidement. Ils ont généralement des temps de conservation courts, malgré une forte valeur ajoutée (par exemple le saumon fumé). L'objectif de ce travail de thèse est d'isoler et de caractériser de nouvelles souches de bactéries lactiques psychrotrophes permettant de ralentir les processus d'altération (dus à l'activité microbienne) et de limiter le développement des bactéries pathogènes. Les applications de biopréservation prévues pour ces souches sont le saumon fumé et les crevettes tropicales décortiquées cuites, deux produits semi-préservés choisis pour leur importance économique en France. Enfin les mécanismes de résistance au froid leur donnant un avantage compétitif sur les souches décrites jusqu'à présent seront étudiés.

Ce projet s'inscrit dans les thématiques de biopréservation développées à l'unité mixte de recherche SECALIM de l'ENITIAA et au département STAM (Sciences et Techniques Alimentaires Marines) de l'Ifremer. Une stratégie de biopréservation basée sur la souche productrice de bactériocine *Carnobacterium divergens* V41 a déjà été développée par ces laboratoires. Ce travail s'intéressait presque exclusivement à la biopréservation du saumon fumé vis à vis du risque lié à *Listeria monocytogenes*. Les recherches menées dans le cadre de cette thèse se sont donc appuyées sur l'expérience acquise en matière de biopréservation, tout en développant des aspects nouveaux tels que l'inhibition des flores altérantes avec une application sur un nouveau produit de la mer, les mécanismes inhibiteurs autre que la production de bactériocine et la croissance à basse température. Enfin ces travaux ont été menés dans le cadre du projet HURDLETECH (hurdle technology including minimal process to ensure quality and safety of convenience seafood) du Projet Intégré européen SEAFOODplus visant à développer de nouvelles technologies de barrières.

Dans un premier temps une collection de bactéries lactiques issues de produits de la mer et présentant des capacités antimicrobiennes a été créée. Les isolats sélectionnés présentaient tous une aptitude à la croissance à basse température. Ces isolats ont été caractérisés et leurs capacités d'inhibition ont été précisées contre des souches représentatives de la flore de contamination des produits de la mer en milieu modèle.

Sept souches ont été retenues et leur potentiel de biopréservation a été testé sur deux produits semi-préservés : la crevette tropicale cuite décortiquée et le saumon fumé. Des analyses microbiologiques et sensorielles ont été effectuées pour déterminer si les souches permettaient

de réduire l'altération des produits, tout en ne provoquant pas elles même de dégradation des caractéristiques sensorielles.

La caractéristique la plus originale de ces bactéries est leur faculté de croissance à basse température, assortie d'une incapacité à pousser à une température supérieure à 30°C (température de croissance normale des bactéries lactiques). Les profils de croissance de certaines souches ont donc été déterminés. Puis des analyses ont été faites au niveau moléculaire pour expliquer les facteurs responsables de cette particularité : analyses protéiques et génétiques.

Etude Bibliographique

1) Les produits de la mer semi-préservés

Les produits de la mer sont des aliments très fragiles, dont les qualités microbiologiques et organoleptiques se modifient rapidement après la capture. Pendant longtemps, la commercialisation du poisson était tributaire de la lenteur des circuits de distribution. Avec le développement des transports, les populations habitant loin du littoral ont eu plus facilement accès à ces produits, permettant le développement de nouveaux marchés tels que les produits semi-préservés, qui attirent de plus en plus l'attention des consommateurs. Comme leur nom l'indique, ces produits n'ont subi qu'une transformation légère, permettant de conserver au mieux leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques. On classe dans cette catégorie les produits salés, séchés, fumés, marinés dont le pH final est supérieur à 5 et le taux de sel inférieur à 6% en phase aqueuse, ainsi que les produits légèrement cuits. On peut citer quelques exemples comme les poissons fumés (principalement le saumon, la truite et le hareng), les poissons marinés (carpaccio de saumon et de truite, filets d'anchois), les poissons salés/dessalés et conservés quelques semaines sous vide à basse température (principalement la morue), les crevettes cuites décortiquées et les salades à base de produits de la mer dont la consommation en France a été multipliée par 2,5 entre 2001 et 2005 en France (données OFIMER). Ces produits sont microbiologiquement sensibles pour plusieurs raisons. Tout d'abord les différentes étapes des processus de fabrication comportent des manipulations importantes, les exposant aux contaminations. De plus les procédés n'incluent pas d'étapes permettant d'éliminer totalement la flore microbienne (endogène ou contaminante). Enfin ces produits sont souvent conservés plusieurs semaines à basse température, permettant le développement de micro-organismes psychrotrophes. Pour finir, la plupart de ces produits sont prêts à consommer et ne requièrent donc pas de cuisson de la part du consommateur, ce qui exige un niveau de vigilance accru vis à vis des contaminations bactériennes.

Parmi les produits concernés, les cas du saumon fumé et de la crevette tropicale, deux produits dont l'importance économique en France est en constante augmentation ces dernières années vont être développés dans les chapitres suivants.

1.1 La crevette tropicale

Commerce et consommation

La production mondiale de crevette est d'environ 4 millions de tonnes (données FAO/Globefish 2004), dont 25% provient de l'élevage. La France est le second pays d'Europe importateur de crevettes, derrière l'Espagne, avec un volume de plus de 100 000 tonnes en 2006 (OFIMER, 2006). Ce volume est stable depuis plusieurs années. Plus de 80% des importations concernent la crevette tropicale, qui arrive sous forme congelée. Le Brésil est le premier fournisseur avec près de 18% du total des importations, suivi de l'Equateur dont l'exportation vers la France est en nette progression. En 2006, la crevette représentait le troisième produit de la mer le plus importé en France, derrière le thon et le saumon. Il reste cependant le premier poste en terme de valeur marchande avec plus de 560 millions d'euros (OFIMER, 2006). Les crevettes tropicales congelées sont principalement destinées à la cuisson et sont ensuite revendues sur glace (57% du volume total), le reste étant vendu congelé (36%) ou cru (7%) (OFIMER, 2001). L'activité de cuisson des crevettes regroupe une vingtaine d'entreprises en France. Le poids des grandes et moyennes surfaces est très fort dans ce secteur, et la plupart des entreprises de transformations travaillent comme prestataires de ces enseignes par le biais d'une rémunération au kilo de crevettes cuites. Près des deux tiers des ventes de crevettes cuites ou congelées se réalisent en grandes surfaces, contre 15% dans les poissonneries et les enseignes spécialisées en produits surgelés. La restauration hors foyer représente 20% du total des ventes (OFIMER, 2001). En Europe, les produits vendus doivent obligatoirement porter les mentions suivantes : nom de l'espèce, mode de production (pêche ou aquaculture) et océan ou pays d'origine (respectivement en cas de pêche ou en aquaculture).

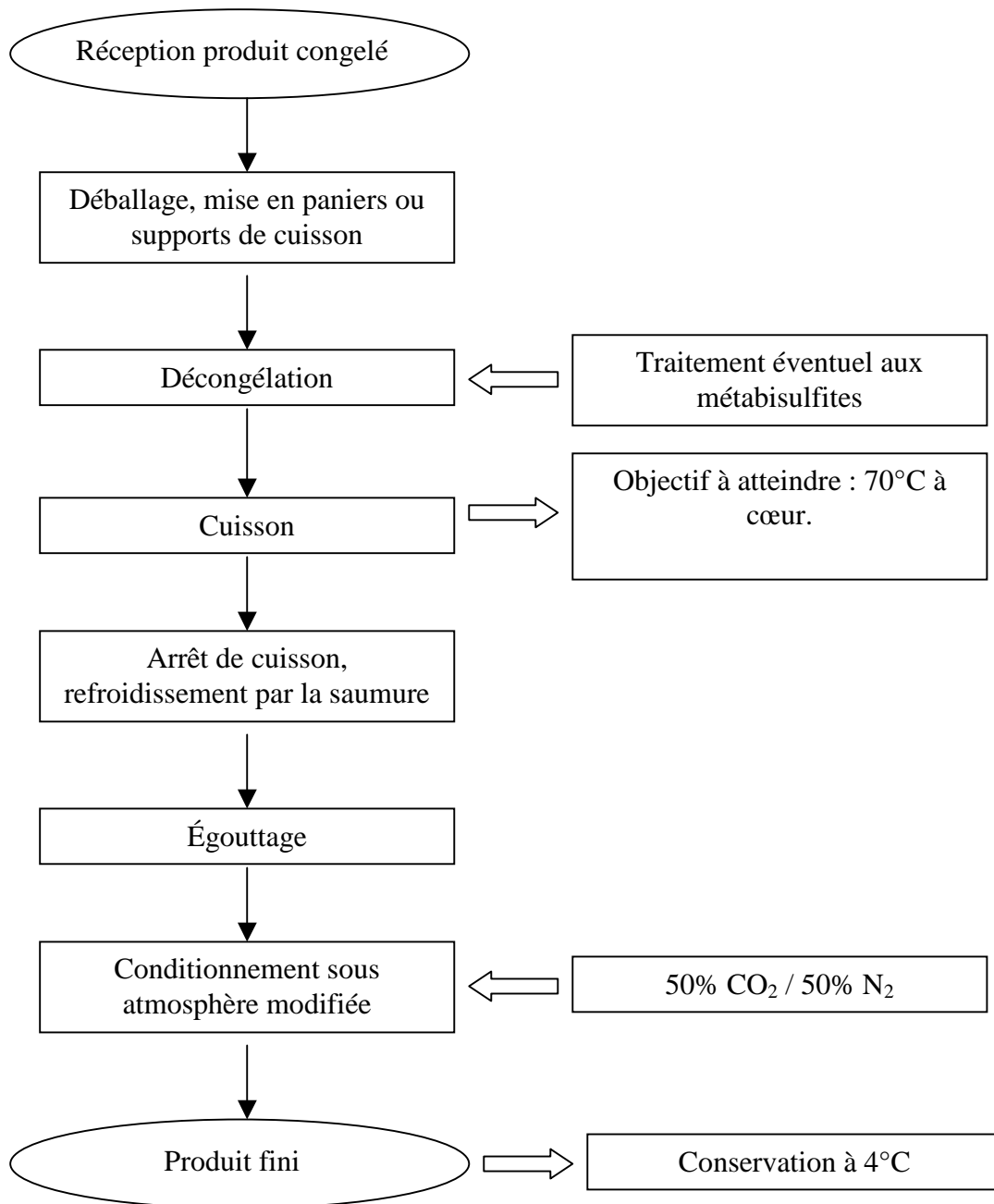


Figure 1 : Schéma du procédé type de cuisson des crevettes.

Production

La plus grosse partie des crevettes importées en France sont congelées, crues et entières. Il n'existe pas de règles strictes à suivre pour la cuisson des crevettes, chaque entreprise disposant de son propre procédé. Cependant il s'agit d'un traitement simple, pour lequel les différences sont assez mineures. Un diagramme de process standard est présenté en figure 1. Il faut soigneusement contrôler la contamination microbologique, en particulier après la

cuisson. La qualité de l'eau en particulier doit être irréprochable, sous peine de contamination du produit. La première étape consiste à décongeler les produits. Cette étape est généralement réalisée dans un bain d'eau de mer décontaminée à température ambiante, auquel il est possible d'ajouter des métabisulfites pour empêcher le noircissement des crevettes lié à une action enzymatique produisant de la mélanine. La durée de cette étape est variable mais elle est en moyenne d'une dizaine de minutes. Les crevettes sont ensuite placées dans des paniers métalliques qui seront plongés dans le bain de cuisson. Celle-ci se déroule en eau douce ou salée (20%) chauffée à une température de 90 à 100°C. En 2 à 5 minutes, les crevettes atteignent une température à cœur supérieure à 70°C. Elles sont ensuite refroidies dans un bain de saumure, égouttées et conditionnées.

Flore d'altération de la crevette

La flore de la crevette est complexe et demeure encore largement méconnue à l'heure actuelle. De plus, la majorité des études parues à ce jour portent sur la flore de la crevette nordique, dont les importations sont minoritaires en France.

La durée de conservation d'une crevette tropicale entière sur glace est d'environ 6 jours. La flore d'altération est alors principalement composée de bactéries aérobies à Gram-négatif telles que *Pseudomonas fragi* et *Shewanella putrefaciens* (Al-Dagal & Bazaraa, 1999). La conservation sous vide des produits de la mer entraîne une réduction notable du nombre de *Pseudomonas* (bactéries aérobies), mais la croissance de *Sw. putrefaciens* n'est pas ralentie. En effet celle-ci utilise le TMAO (Triméthylamine N-Oxyde) pour la respiration anaérobie. On note également dans ce type de produit une forte présence de *Photobacterium phosphoreum* due au fait que cette bactérie utilise aussi le TMAO, et que sa croissance est rapide à basse température (Dalgaard *et al.*, 1993). L'emballage sous vide augmente peu la durée de vie des produits de la mer. La conservation sous atmosphère modifiée (augmentation du taux de CO₂ dans l'emballage) permet d'inhiber aussi bien les bactéries du genre *Pseudomonas* que celles du genre *Shewanella*. Ce type de conservation permet d'allonger la durée de vie des produits à base de viande jusqu'à 21 jours, contre 1 à 3 jours à l'air libre (Gram & Huss, 1996). Mais ce phénomène est beaucoup moins marqué pour les produits de la mer du fait de la différence de composition du produit (grande disponibilité du TMAO, utilisé par *P. phosphoreum* pour la respiration anaérobie) et de la flore présente à l'origine (Dalgaard *et al.*, 1993).

La cuisson permet l'élimination d'une partie des micro-organismes présents à l'origine sur le produit, mais il est probable que les barèmes de cuisson (2 min à 71-73°C à cœur) ne suffisent pas pour éliminer la flore présente dans le tractus gastro-intestinal. Par ailleurs, les étapes suivantes de la préparation sont la source d'une importante recontamination. Ainsi en sortie d'usine, sur 7913 échantillons de crevettes arctiques (*Pandalus borealis*) des taux de flore totale inférieurs à 10^3 UFC/g ont été relevés dans 54% d'entre eux, et 70% ont montré des taux de coliformes inférieurs à 1 par gramme (Valdimarsson *et al.*, 1998). La durée de conservation est étroitement dépendante de la température de stockage et du mode de conditionnement (sous air, sous vide ou sous atmosphère modifiée). La durée de vie de crevettes décortiquées cuites passe de 9 jours sous air ou sous vide à 12°C, à 15 jours si elles sont emballées sous atmosphère modifiée. De même, si la température de conservation est inférieure à 8°C, la durée de vie est étendue à 15 jours quel que soit le mode de conditionnement (Rutherford *et al.*, 2007).

En fin de conservation, des taux quasiment équivalents de flore totale psychrotrophe (sur milieu LH à 15°C) et de flore lactique ont été relevés, indiquant un rôle prépondérant des bactéries lactiques dans l'altération de ce produit (Dalgaard & Jorgensen, 2000). Dans les crevettes cuites décortiquées, marinées ou non, des bactéries des genres *Carnobacterium* et *Enterococcus* ont été retrouvées en temps que flore dominante sur des produits altérés (Dalgaard *et al.*, 2003 ; Mejlholm *et al.*, 2005). Les analyses sensorielles réalisées sur des produits marinés naturellement contaminés ont révélé le développement d'odeurs de poisson et de saveurs acides et amères (Dalgaard & Jorgensen, 2000). L'inoculation de cultures pures de *Cb. divergens* et *Cb. maltaromaticum* sur des crevettes emballées sous atmosphère modifiée a provoqué l'apparition d'odeurs aigres, chlorées, maltées et sucrées, ainsi que de taux élevés d'azote volatile et de tyramine (Laursen *et al.*, 2006).

Flore pathogène de la crevette

La crevette cuite est un produit prêt à consommer qui ne requiert pas d'étape finale de cuisson de la part du consommateur. Il faut donc être particulièrement vigilant par rapport aux éventuelles contaminations par des bactéries pathogènes. *Listeria monocytogenes* est une bactérie pathogène dont l'ingestion peut provoquer la listériose humaine, une maladie rare mais dont la létalité est élevée et peut aller jusqu'à 30% en fonction de la dose et de la fragilité

du sujet. Elle est principalement d'origine alimentaire (Hof, 2003). Sa présence dans les produits prêts à consommer réfrigérés est problématique, due à sa nature psychrotrophe. Des investigations menées sur la fabrication des crevettes arctiques (*Pandalus borealis*) décortiquées cuites ont montré une contamination importante des usines et des matières premières par cette bactérie pathogène, mais probablement grâce à l'étape de cuisson aucune souche n'a été retrouvée dans les produits finis (Gudmundsdottir *et al.*, 2006). A l'inverse, Valdimarsson *et al.* (1998) ont constaté la présence de *L. monocytogenes* dans 2% d'échantillons du même type de produit en sortie d'usine. Si cette étude a clairement mis en évidence que les conditions d'hygiène dans les usines semblent déterminantes pour la qualité microbiologique du produit fini, elle a aussi montré que les indicateurs classiques d'hygiène (flore totale sur PCA et entérobactéries) ne sont pas corrélés avec la présence de *L. monocytogenes*. Si ce pathogène est rarement présent dans les échantillons commerciaux de crevettes, sa croissance peut s'y révéler très rapide, surtout en cas de mauvais contrôle de la température de stockage. Ainsi Mejlholm *et al.* (2005) ont montré que dans des crevettes (*Pandalus borealis*) artificiellement contaminées, le taux de *L. monocytogenes* pouvait être multiplié par 100 en 20 à 21 jours à 2°C, 8 à 9 jours à 5°C et 4 à 5 jours à 8°C. De même, si l'emballage sous atmosphère modifiée semble le meilleur moyen de contrôler la croissance de *L. monocytogenes* dans des échantillons de crevettes tropicales décortiquées cuites, le rôle de la température reste prépondérant (Rutherford *et al.*, 2007). Au dessus de 3°C, l'efficacité de l'emballage sous atmosphère modifiée diminue considérablement, ce qui rend nécessaire d'envisager d'autres moyens de limiter la prolifération de ce pathogène pendant les phases de transport et de stockage chez les consommateurs.

1.2 Le saumon fumé

Commerce et consommation

La production mondiale de saumon était de 2 millions de tonnes en 2002, dont 60% provient de l'élevage. La France importe pour sa seule consommation intérieure près de 110 000 tonnes de saumon par an, ce qui en fait le plus gros marché européen à égalité avec le Royaume-Uni (OFIMER, 2004a). Le saumon représente à lui seul 9% du volume de la consommation de poisson en France, avec près de 2 kg par an et par habitant. C'est la deuxième espèce la plus consommée derrière le thon.

Sur l'ensemble de l'Europe en 2003, l'industrie du saumon fumé a utilisé environ 150 000 tonnes de saumon pour produire 85 000 tonnes de produit fini. La France est le premier producteur européen avec près de 23 000 tonnes, devant l'Allemagne, le Danemark et le Royaume-Uni. En France, une vingtaine de sociétés se répartissent la production de saumon fumé et 8 d'entre elles produisent plus de 1000 tonnes par an. Environ 15% de la production est exportée, principalement vers l'Italie et la Belgique.

La France représente derrière l'Allemagne le deuxième marché européen de saumon fumé avec une consommation d'environ 24 000 tonnes (OFIMER, 2004b). Environ 85% de ce volume est produit en France. Si la saisonnalité reste importante (environ 30% des ventes réalisées lors des fêtes de fin d'année), le saumon fumé est devenu un produit de consommation courante grâce à une baisse régulière des prix (OFIMER, 2004b).

Le saumon fumé bénéficie d'une bonne image auprès des consommateurs, apparaissant comme un produit sain et naturel. Cependant l'hostilité de certains consommateurs par rapport à l'élevage et l'aquaculture pourrait entraîner un phénomène de rejet dans le futur. De même les alertes sanitaires, même si elles restent peu nombreuses à l'heure actuelle ont tendance à avoir un fort impact négatif sur les ventes.

La fabrication du saumon fumé

Le fumage de la viande remonte probablement à la préhistoire, et constitue un des plus anciens moyens connus de conservation des aliments. Le fumage du poisson est plus récent (Moyen-Age), mais représente un procédé traditionnel dans les pays du nord de l'Europe (Knockaert, 2002). Le traitement complet comprend trois étapes distinctes : le salage, le séchage et le fumage.

Les poissons saignés et éviscérés sont amenés sur le lieu de transformation où ils sont rincés, étêtés, filetés, parés, désarêtés et parfois pelés. Ces premières étapes sont une source importante de contamination, du fait que les bactéries des ouïes, de la peau et du tractus intestinal peuvent être en contact avec la chair. Le salage des filets au sel sec a pour but d'éliminer une partie de l'eau qui les constitue. Il permet aussi de raffermir les chairs, empêche la décoloration et confère un certain goût au poisson. Les produits français ont généralement une composition finale de 2,5 à 3,5 g de sel pour 100 g de chair et 60 à 65% d'eau (Knockaert, 2002). Une méthode de plus en plus employée consiste à injecter

directement de la saumure dans les filets au moyen de fines aiguilles. Cette méthode permet un gain de poids de 4 à 8%, mais les risques de contamination croisée (aiguilles ou saumure) sont plus élevés. Après 2 à 10h de repos, les produits sont rincés à l'eau claire.

Le séchage s'effectue uniquement avant le fumage à froid. Cette étape permet de continuer la diminution de la teneur en eau. Elle dure environ 4h et permet de retirer des filets environ 1 à 1,5% d'eau par heure (Knockaert, 2002).

Le saumon salé et séché est soumis à l'action de la fumée provenant de la combustion de bois durs tels que le hêtre ou le chêne. En France le saumon est fumé à froid (25°C) par opposition au fumage à chaud (70°C) pratiqué dans d'autres pays. Le fumage est réalisé dans une enceinte thermostatée avec une humidité relative de l'ordre de 60%. Le filet continue donc de se déshydrater pendant qu'il s'imprègne des composés volatils de la fumée. La composition chimique de la fumée est très variable. Plus de 100 composés volatils différents ont été identifiés, notamment des phénols, des alcools, des acides organiques, des composés carbonylés et des hydrocarbures (Cardinal *et al.*, 1997 ; Varlet *et al.*, 2006). Ce sont principalement les phénols qui donnent au produit les arômes typiques (Knockaert, 2002). La durée du traitement peut varier de 2 à 12 h selon le type d'installation et le produit désiré. Les filets sont ensuite tranchés, ce qui représente la plus importante source de contamination après traitement. Les produits sont distribués en l'état (rayon traiteur) ou conditionnés sous vide. La conservation se fait à +2°C avant l'expédition.

La date limite de consommation (DLC) est généralement de 3 semaines. Plus un saumon est salé et fumé, plus les flores naturellement présentes sont inhibées (Leroi *et al.*, 2000). Cependant les teneurs en NaCl couramment appliquées en France n'ont pour seul effet que de ralentir la croissance bactérienne sans l'arrêter. Les produits contiennent souvent moins de 1 mg de phénol pour 100 g de chair, et ces composés sont davantage recherchés pour les caractéristiques organoleptiques qu'ils transmettent au produit plutôt que pour leur effet bactériostatique. Le séchage, le conditionnement sous vide et le maintien du produit à une température inférieure à 4°C participent aussi à la conservation.

Evolution de la flore du saumon fumé

Le saumon fumé est un produit microbiologiquement fragile pour plusieurs raisons :

- son processus de fabrication comporte de nombreuses étapes durant lesquels il est manipulé et exposé aux contaminations (manipulateurs, lames des couteaux ou trancheurs, tapis de convoyage, environnement...)
- le procédé n'inclut pas d'étape bactéricide
- la durée de conservation est suffisamment longue pour permettre la croissance de bactéries psychrotrophes
- il est consommé cru, sans étape finale de cuisson par le consommateur

La flore du saumon fumé a été l'objet de nombreuses études au cours des dernières années (Leroi *et al.*, 1998 ; Truelstrup-Hansen *et al.*, 1998 ; Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Cardinal *et al.*, 2004 ; Olofsson *et al.*, 2007). Il en ressort que la microflore est extrêmement variable selon la matière première, le traitement du produit et l'usine de production. Les principales espèces bactériennes identifiées lors de ces études sont regroupées dans le tableau 1.

Le taux initial de contamination dépend plus fortement de l'usine de production que de l'origine de la matière première (Leroi *et al.*, 1998). Il varie généralement entre 10^2 et 10^5 UFC/g (Truelstrup-Hansen & Huss, 1998 ; Cardinal *et al.*, 2004). La microflore est alors dominée par des germes à Gram-négatif typiques du poisson tels que *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio* ou *Moraxella* (Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Leroi *et al.*, 1998 ; Olofsson *et al.*, 2007).

La conservation du saumon fumé se fait généralement sous vide à des températures comprises entre 2 et 4 °C. Durant cette période la population bactérienne augmente rapidement, et des concentrations de l'ordre de 10^7 à 10^8 UFC/g sont souvent observées après 3 semaines. L'équilibre des populations s'inverse nettement, les bactéries Gram-positives et en particulier les bactéries lactiques dominant généralement la microflore en fin de conservation (Leroi *et al.*, 1998 ; Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Olofsson *et al.*, 2007). Les genres principalement retrouvés sont *Carnobacterium* et *Lactobacillus*. Des entérobactéries telles que *Proteus vulgaris* ou *Serratia liquefaciens* peuvent aussi être présentes en grande quantité (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Rachman *et al.*, 2004). Enfin *Brochotrix thermosphacta*, bactérie

Tableau 1 : Genres et espèces de bactéries altérantes isolées du saumon fumé

Types de bactéries	Références
Bactéries à Gram négatif	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 ; Truelstrup-Hansen & Huss, 1998 ; Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b
<i>Hafnia alvei</i>	Truelstrup-Hansen & Huss, 1998 ; Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b
<i>Proteus (mirabilis, vulgaris)</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Rahnella aquatilis</i>	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998
<i>Serratia liquefaciens</i>	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 ; Truelstrup-Hansen & Huss, 1998 ; Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b ; Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Serratia marcescens</i>	Truelstrup-Hansen & Huss, 1998
<i>Serratia</i> sp.	Olofsson <i>et al.</i> , 2007
<i>Acinetobacter</i> sp.	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Moraxella</i> sp.	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998
<i>Aeromonas</i> spp.	Leroi <i>et al.</i> , 1998 ; Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 ; Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b ; Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Photobacterium (phosphoreum, iliopiscarium)</i>	Gram & Huss, 1996 ; Leroi <i>et al.</i> , 1998 ; Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 ; Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b ; Olofsson <i>et al.</i> , 2007
<i>Vibrio</i> spp.	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 ; Truelstrup-Hansen & Huss, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
Bactéries à Gram positif	
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998 ; Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 ; Truelstrup-Hansen & Huss, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002 ; Rachman <i>et al.</i> , 2004 ; Olofsson <i>et al.</i> , 2007
<i>Carnobacterium (divergens, maltaromaticum)</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998 ; Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998 ; Truelstrup-Hansen & Huss, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002 ; Rachman <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus (alimentarius, casei, coryneformis, curvatus, delbrueckii, farciminis, homohiochii, plantarum, sakei)</i>	Leroi <i>et al.</i> , 1998 ; Truelstrup-Hansen & Huss, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002 ; Rachman <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactococcus</i> sp.	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998
<i>Leuconostoc (carnosum, mesenteroides, gelidum)</i>	Truelstrup-Hansen & Huss, 1998 ; Jorgensen <i>et al.</i> , 2000b
<i>Weisella kandleri</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Listeria (innocua, welshimeri, seeligeri)</i>	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002

typique de l'altération de la viande peut être retrouvée en quantité variable sur le produit (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Olofsson *et al.*, 2007). Le conditionnement sous vide permet d'augmenter la durée de vie du saumon fumé, mais cette augmentation n'est pas aussi importante que celle observée par exemple pour les produits à base de viande (Dalgaard *et al.*, 1993). Ceci s'explique par le fait que les bactéries marines telles que *Shewanella putrefaciens* et *Photobacterium phosphoreum* sont capables d'utiliser l'oxyde de triméthylamine (TMAO) comme accepteur final d'électrons pour la respiration anaérobie (Dalgaard, 1995) et de produire de la triméthylamine (TMA) très malodorante, ainsi que de l'H₂S. Par ailleurs, les bactéries lactiques, dont certaines espèces sont altérantes, se développent bien en conditions anaérobies.

La flore d'altération du saumon fumé

Le rôle des germes les plus fréquemment isolés de produits altérés a été étudié, de manière à comprendre quelles sont les sources de changements organoleptiques néfastes pour le produit. Pour cela, des cultures pures ont été ensemencées sur des produits, et leurs effets sur les odeurs et les composés volatils ont été analysés.

Les bactéries à Gram négatif, si elles font rarement partie de la flore principale d'altération, restent cependant capables d'altérer ce produit. Elles sont capables de produire de la TMA, qui est responsable de l'odeur caractéristique de poisson pourri (Gram & Huss, 1996). Il a été montré que *Se. liquefaciens* était très altérant, dégageant des odeurs aminées, fromage, acide ou caoutchouc, notamment grâce à la production de TMA (Stohr *et al.*, 2001 ; Joffraud *et al.*, 2001). *Ph. phosphoreum* est une espèce fortement altérante sur les poissons frais emballés sous atmosphère modifiée, mais elle semble jouer un rôle plus modéré dans l'altération du saumon fumé. De plus, une grande variabilité selon la souche a été notée (Leroi *et al.*, 1998 ; Stohr *et al.*, 2001). Cependant certaines études établissent une bonne corrélation entre la qualité sensorielle et la production de tyramine et d'histamine, cette dernière n'étant produite dans le saumon fumé que par *Ph. phosphoreum* (Jorgensen *et al.*, 2000a ; Jorgensen *et al.*, 2000b). *Sh. putrefaciens*, germe typique d'altération du poisson frais, et *Vibrio* sp. n'ont jamais été impliqués dans les phénomènes d'altération du saumon fumé, même lorsqu'ils ont été inoculés en grande concentration.

La flore d'altération principale du saumon fumée est composée de bactéries à Gram positif. La faculté des bactéries lactiques à produire de l'acide lactique à partir des sucres présents dans la matrice peut entraîner une chute de pH néfaste pour le produit. Ainsi la présence de culture pures des espèces *Lb. farciminis*, *Lb. sakei* et *Lb. alimentarius* a entraîné une légère acidification, le pH passant de 6,2 à 5,7 après 5 semaines de stockage à 6°C. Pour les produitsensemencés avec les espèces *Cb. maltaromaticum* et *Bx. thermosphacta*, le pH final se situait aux alentours de 5,9 (Stohr *et al.*, 2001 ; Joffraud *et al.*, 2001). Certaines bactéries lactiques sont reconnues comme des germes très altérants car leur croissance rapide leur permet d'y atteindre des taux suffisants pour produire des odeurs putrides et de l'H₂S. Les espèces *Lb. farciminis* et *Lb. sakei* ont aussi provoqué une forte production d'ABVT, mais sans augmentation de TMA, tandis que les espèces *Lb. alimentarius*, *Cb. maltaromaticum* et *Bx. thermosphacta* n'ont montré qu'une faible capacité de production d'ABVT (Stohr *et al.*, 2001). Plus des trois quarts des espèces de *Bx. thermosphacta* testées en milieu jus de saumon ont montré une forte capacité de production d'odeurs altérantes de type fromage et aigre (Leroi *et al.*, 1998). Ces résultats se retrouvent aussi en culture pure sur saumon fumé stérile, avec des odeurs rances, de beurre ou de plastique (Stohr *et al.*, 2001). Cependant elles sont souvent minoritaire par rapport aux bactéries lactiques dans les produits naturellement contaminés avec des taux de 10³ à 10⁵ UFC/g (Truelstrup-Hansen & Huss, 1998), ce qui réduit leur pouvoir altérant. Les bactéries lactiques peuvent aussi jouer un rôle prépondérant dans la production d'odeurs altérantes sur ce type de produit, comme nous le verrons au chapitre 2.

La flore pathogène du saumon fumé

D'après les différentes études menées sur la présence de germes pathogènes dans le saumon fumé, le risque principal provient de bactéries psychrotrophes à Gram positif telles que *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum* (Huss, 1997). Elles proviennent généralement de contamination au cours du processus de fabrication, mais peuvent aussi être présentes sur la matière première (Huss *et al.*, 2000). La présence de *Staphylococcus aureus* a déjà été observée dans le saumon et la truite fumée (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002), mais sa croissance est inhibée par le froid, de même que celle des germes mésophiles tels que les salmonelles et les coliformes. Les espèces pathogènes de *Vibrio* telles que *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* et *Vibrio parahaemolyticus* n'ont jamais été mises en évidence dans le saumon fumé, ce qui s'explique par le fait que ces bactéries sont originaires des eaux chaudes tropicales ou tempérées en fin d'été.

Parmi les différentes espèces de *Cl. botulinum*, seules les souches de types E sont psychrotrophes et susceptibles d'être retrouvées dans les produits de la mer (Huss, 1997). Elles sont capables de produire une neurotoxine responsable du botulisme. La concentration de sel requise pour inhiber la croissance de *Cl. botulinum* est de l'ordre de 5% en phase aqueuse (correspondant à environ 3 g pour 100 g de chair). Cependant la combinaison d'un taux de sel de 3% (phase aqueuse) avec la conservation à basse température (inférieure à 10°C) est suffisante pour contrôler efficacement la croissance de ce pathogène pendant toute la période de conservation (21 jours) (Huss, 1997).

La fréquence de contamination du saumon fumé par *L. monocytogenes* varie considérablement selon les études, allant de 5 à 80% des échantillons analysés (Ben Embarek, 1994 ; Heinitz & Johnson, 1998 ; Jorgensen & Huss, 1998 ; Dauphin *et al.*, 2001 ; Gudmundsdottir *et al.*, 2005). Une étude menée en Australie a montré que les produits de la mer étaient des denrées à haut risques vis à vis de ce pathogène (Sumner & Ross, 2002). Et si aucun cas de listeriose n'a pu être relié directement à la consommation de saumon fumé, les retraits de lots pour cause de contamination sont fréquents (Rocourt *et al.*, 2000). Les souches retrouvées sur les produits finies indiquent que l'origine de la contamination est souvent le procédé de fabrication, même si la matière première est fréquemment contaminée (Huss *et al.*, 2000 ; Dauphin *et al.*, 2001).

De nombreux travaux mettent en évidence le fait que la croissance de *L. monocytogenes* est possible dans les conditions de conservation du saumon fumé (Jorgensen & Huss, 1998 ; Duffes *et al.*, 1999a ; Cornu *et al.*, 2006). Ainsi Brillet *et al.* (2004) ont observé que des souches de *L. monocytogenes* inoculées à 20 UFC/g atteignaient 10^4 - 10^5 UFC/g en 28 jours de conservation à basse température. De même sur des produits naturellement contaminés, 8% des échantillons ont montré un taux de *L. monocytogenes* supérieur à 100 UFC/g en fin de conservation à 5°C (Jorgensen & Huss, 1998).

La réglementation en terme de contamination des produits par *L. monocytogenes* est très variable selon les pays. Certains pays ont une politique préconisant l'absence totale de ce germe dans 25 ou 50 g de produit : Etats Unis, Canada, Amérique du Sud et Italie. En Europe, on tolère jusqu'à 100 UFC/g à la DLC (CE 2073/2005 de la commission Européenne).

2) Les bactéries lactiques dans les produits de la mer

2.1 Les bactéries lactiques dans l'alimentation

Caractères bactériologiques et taxonomiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat. Elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en temps que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire. Une caractéristique commune permet cependant de les unifier en un seul et vaste groupe : leur capacité à fermenter les hydrates de carbone en acide lactique (Dellaglio *et al.*, 1994). Elles partagent en outre un certain nombre de caractéristiques communes, qui forment la base de leur classification. Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulées, anaérobies, catalase négative, oxydase négative. Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC (Muto & Osawa, 1987). Elles sont de métabolisme chimio-organotrophes, ce qui signifie qu'elles utilisent comme source énergétique des substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques (voir figure 2). Elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexes en terme d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucre (Dellaglio *et al.*, 1994).

Le tableau 2 présente les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification et de l'identification. Plus récemment, l'approche moléculaire de la taxonomie, et plus particulièrement l'hybridation ADN-ADN et le séquençage du gène de l'ARNr 16S ont permis d'affiner cette classification. Cela a notamment abouti à la séparation du genre *Streptococcus* en *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus* et *Enterococcus* (Schleifer *et al.*, 1995). De même le genre *Carnobacterium* a été créé pour regrouper des espèces de *Lactobacillus* proches (Collins *et al.*, 1987), et les genres *Tetragenococcus* et *Aerococcus* sont issus du genre *Pediococcus* dont ils forment des lignées phylogénétiques distinctes (Collins *et al.*, 1990). Enfin le genre *Oenococcus* a été créé pour regrouper des bactéries isolées du vin et précédemment classées dans le genre *Leuconostoc* (Dicks *et al.*, 1995).

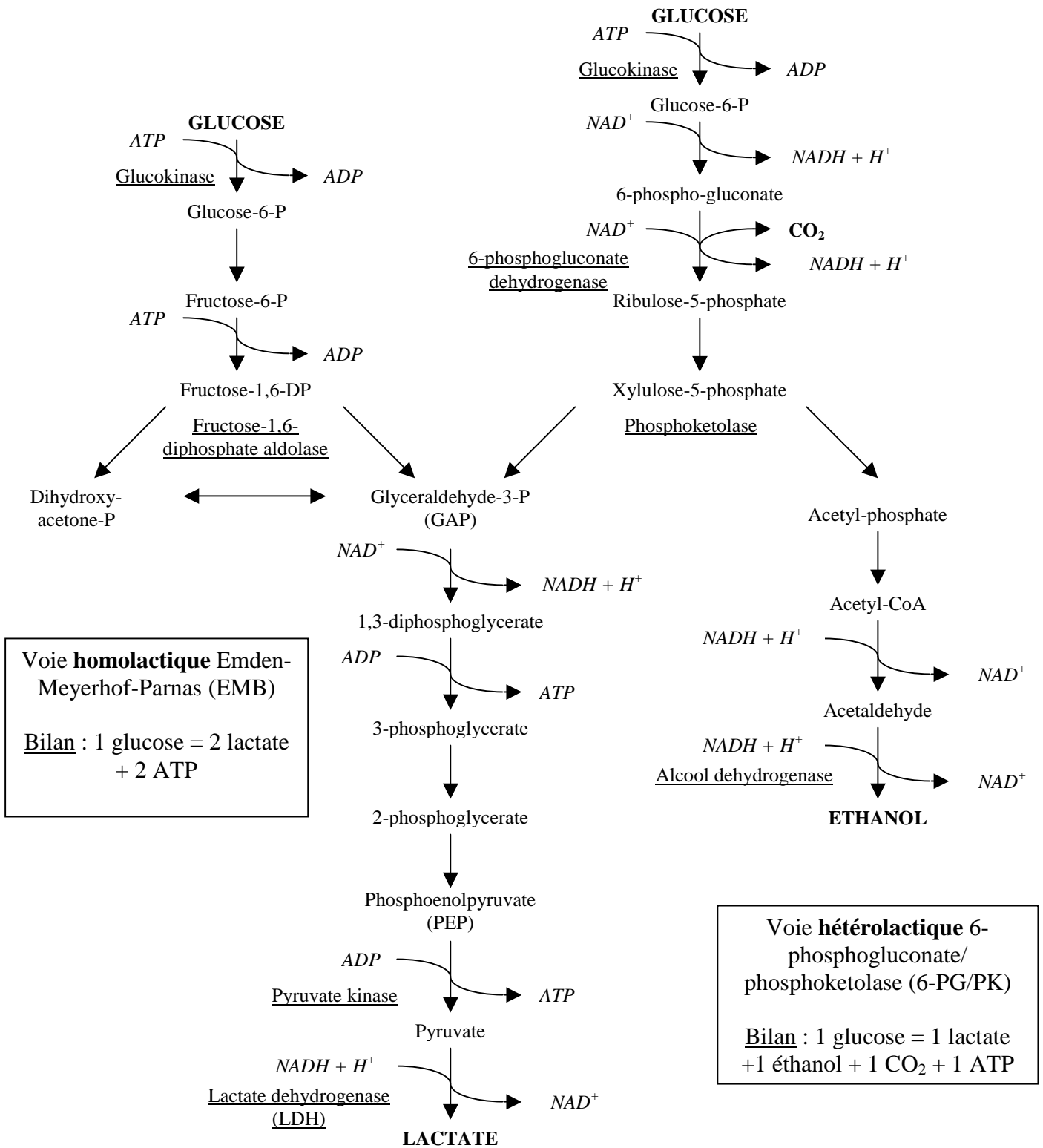


Figure 2 : Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (adapté de Dellaglio *et al.*, 1994).

Tableau 2 : Principaux genres de bactéries lactiques.

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation	Configuration de l'acide lactique	Espèce type
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homofermentaire		<i>Ac. viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaire	L(+)	<i>Cb. divergens</i>
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Ec. faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétéro-fermentaire	D(-), L(+) ou D/L	<i>Lb. delbrueckii</i>
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Lc. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Ln. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	D(-)	<i>Oe. oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaire	D/L ou L(+)	<i>Pc. damnosus</i>
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Sc. salivarius</i>
<i>Tetragenococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Tc. halophilus</i>
<i>Vagococcus</i>	Coques ovoïdes	Homofermentaire	L(+)	<i>Vc. fluvialis</i>
<i>Weissella</i>	Petits bacilles	Hétérofermentaire	D/L ou D(-)	<i>We. viridescens</i>

Rôle des bactéries lactiques dans l'altération des aliments

Les bactéries lactiques sont fréquemment associées de manière positive à l'alimentation humaine, à travers la fermentation d'une grande variété de produits (Ross *et al.*, 2002). Elles sont présentes en temps que flore technologique dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les produits carnés (charcuteries), les produits végétaux (choucroute, pickles, olives fermentées), les levains de panification et les boissons alcoolisées (vins, bières blanches, saké) (Leroy & De Vuyst, 2004). Cependant leur rôle en temps qu'agents altérants est aussi reconnu dans une vaste gamme de produits.

Sur les produits à base de viande, la croissance des bactéries lactiques entraîne l'apparition d'odeurs et de saveurs aigres ou rances (dus à la présence d'acide lactique ou d'acides gras volatils), de substance visqueuse (due à la production de polysaccharides) et de verdissement (dû à la présence de peroxyde d'hydrogène) (Labadie, 1999 ; Vermeiren *et al.*, 2005). Des bactéries lactiques des espèces *Cb. divergens* et *Lb. sakei* ont été retrouvées parmi la flore altérante de viande de bœuf réfrigérée (Ercolini *et al.*, 2006). De même il a été montré que *Lc. mesenteroides* pouvait faire partie de la flore d'altération principale de produits de type jambon (Vermeiren *et al.*, 2005).

Bien que minoritaires par rapport aux levures, les bactéries lactiques participent à la fabrication de certains types de vins et de bières (lambic, bières blanches, et bières acides de fermentation haute) (Derdelinckx *et al.*, 1994) principalement par l'intermédiaire de la fermentation malolactique. Cependant elles peuvent aussi faire partie de la flore d'altération de ces produits. Dans les vins, les phénomènes de "piqûre lactique" (augmentation de l'acidité en fin de fermentation), l'augmentation de la viscosité (due à la production de polysaccharides) et la production de saveurs indésirables ont été reliées à la présence de bactéries des genres *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* (Lonvaud-Funel, 1999). Dans la bière, les genres *Lactobacillus* (principalement représenté par les espèces *Lb. brevis* et *Lb. lindneri*) et *Pediococcus* peuvent être à l'origine d'accidents de fermentation (Sakamoto & Konings, 2003).

Certaines métabolites peuvent être présents sur des produits altérés sans être pour autant détectables au niveau sensoriel, comme par exemple les amines biogènes. Ce sont des composés azotés, dérivés de la décarboxylation de certains acides aminés. Lorsqu'elles sont absorbées en trop grandes quantités, elles peuvent être responsables de maux de tête, hypotension, crampes abdominales, diarrhées et vomissements (Silla Santos, 1996). Leur synthèse dans les aliments est principalement due à la présence de microorganismes spécifiques, dont les bactéries lactiques (ten Brink *et al.*, 1990). De nombreuses études ont mis en parallèle la présence de bactéries lactiques et la production d'amines biogènes dans les fromages (Joosten & Nunez, 1996), le vin (Lonvaud-Funel, 2001), et les produits à base de viande (Masson *et al.*, 1996 ; Suzzi & Gardini, 2003).

2.2 Les bactéries lactiques dans les produits de la mer

Origine des bactéries lactiques dans les produits de la mer : présence chez les poissons vivants

La microflore des produits de la mer dépend de plusieurs facteurs, dont la charge bactérienne de la matière première (ici l'animal vivant : poisson ou crevette). La microflore des poissons est répartie sur les surfaces d'échange avec l'environnement : la peau, les branchies, le mucus et le tractus intestinal. Sauf cas d'infection, le muscle est stérile. Etant directement en contact

avec l'extérieur, la microflore subit directement l'influence de l'environnement : alimentation, température de l'eau, salinité, période de l'année et pollution.

Chez les poissons vivants dans les eaux tempérées, la microflore est dominée par des bacilles psychrotrophes à Gram négatif telles que *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio* et *Aeromonas*. Des proportions variables de bactéries à Gram positif telles que *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Corynebacterium* peuvent aussi être retrouvées (Gram & Huss, 1996). L'influence de l'aquaculture sur la flore des organismes vivants a aussi été mise en évidence, par exemple on observe des taux variables d'entérobactéries et de *Vibrio* sur des crevettes issues de différentes fermes (Mohamed Hatha *et al.*, 2003 ; Koonse *et al.*, 2005 ; Goarant & Merien, 2006).

Des bactéries lactiques ont souvent été isolées de poissons vivants, en général dans le tractus intestinal. Des bactéries du genre *Lactobacillus* ont été retrouvées dans du saumon (*Salmo salar*) (Ringø *et al.*, 2000) et de l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus L.*) (Ringø *et al.*, 1997). Des bactéries du genre *Carnobacterium* ont été isolées elles aussi de saumon (Joborn *et al.*, 1999) et d'omble chevalier, ainsi que de la truite (Pilet *et al.*, 1995 ; Huber *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2007), de la morue et du loup (Ringø *et al.*, 2001). Les espèces de *Carnobacterium* les plus fréquemment retrouvées sont *Cb. divergens* et *Cb. maltaromaticum* (anciennement *Cb. piscicola*). La présence d'autres genres et espèces tels que *Lactococcus piscium* (Williams *et al.*, 1990), *Streptococcus* et *Leuconostoc* (Ringø & Gatesoupe, 1998) a également été rapportée. Récemment, l'identification bactérienne par le séquençage des régions variables V1 et V2 du gène de l'ARN 16S ont permis de mettre en évidence la biodiversité de la flore lactique présente dans le tractus digestif de différents salmonidés (truites et saumons). Si *Cb. maltaromaticum* s'est encore révélée être l'espèce majoritaire de cet écosystème, les genres *Lactococcus* (représenté par l'espèce *Lc. lactis*), *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. sakei* et *Lb. curvatus*) ainsi que *Leuconostoc* (*Lc. mesenteroides*) étaient aussi présents (Balcazar *et al.*, 2007). Enfin des bactéries lactiques des espèces *Lc. lactis* et *Lc. raffinolactis* ont été retrouvées en temps qu'espèces dominantes de la flore intestinale de poissons d'eau douce (carpes) (Hagi *et al.*, 2004).

La plupart des bactéries lactiques retrouvées dans les poissons sont reconnues comme des germes non pathogènes, voire même comme ayant un effet probiotique sur l'animal. Ringø *et al.* (2000) ont par exemple montré que des souches de *Cb. piscicola* isolées du tractus digestif

de poissons d'élevage possédaient des capacités inhibitrices vis à vis de pathogènes du poisson tels que *Aeromonas salmonicida*. A l'inverse, l'espèce *Lactococcus garvieae* est reconnue comme un pathogène du poisson, pouvant entraîner des septicémies fatales (Eldar *et al.*, 1999).

Biodiversité de la flore lactique rencontrée dans les produits de la mer

Les bactéries lactiques ne font normalement pas partie de la flore dominante des poissons frais après abattage, qu'ils soient conservés à l'air libre (sur glace) ou sous vide. Elles sont en effet nettement désavantagées par rapport aux germes psychrophiles à Gram négatif tels que *Pseudomonas* ou *Shewanella putrefaciens* (Gram & Huss, 1996), dont les taux de croissance sont supérieurs. L'emballage des poissons frais sous atmosphère modifiée favorise la croissance des bactéries lactiques, qui sont souvent en plus grande proportion dans ces produits par rapport à ceux conservés sous air, comme par exemple dans le merlu frais (Ordonez *et al.*, 2000), le saumon (Rudi *et al.*, 2004) et la perche tropicale (Lalitha *et al.*, 2005). Cependant sur certaines espèces de poisson comme la morue, l'atmosphère modifiée (CO₂/N₂ à différentes concentrations) ne favorise pas significativement le développement des bactéries lactiques (Dalgaard *et al.*, 1993 ; Corbo *et al.*, 2005). Enfin les bactéries lactiques montrent une très bonne résistance à la congélation, leur permettant de devenir la flore majoritaire de filets de saumon ou de filets d'orphie décongelés conservés sous atmosphère modifiée, au détriment de *P. phosphoreum*. L'espèce la plus fréquemment retrouvée dans ces conditions est *Cb. maltaromaticum* (Emborg *et al.*, 2002 ; Dalgaard *et al.*, 2006).

Des bactéries lactiques peuvent être isolées à partir de différents types de produits de la mer transformés (Mauguin & Novel, 1994), et en particulier de produits légèrement préservés. Cette flore, en général plus importante en fin de conservation, est très variable sur les produits de la mer, et les espèces isolées varient fortement selon les produits et les auteurs (voir tableau 3).

Dans le saumon fumé à froid en fin de conservation, la microflore est largement dominée par les bactéries lactiques, principalement représentées par les genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium* (Leroi *et al.*, 1998 ; Truelstrup-Hansen *et al.*, 1998 ; Paludan-Muller *et al.*, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Tomé *et al.*, 2006). L'analyse par TTGE de différents lots de saumon fumé par Rachman *et al.* (2004) a permis de mettre en évidence une

forte présence de *Lactobacillus curvatus*, ainsi que de *Carnobacterium maltaromaticum* et *Cb. divergens*. Olofsson *et al.* (2007) ont observé un changement dans la flore lactique du saumon fumé emballé sous vide. En début de conservation, celle-ci est dominée par le genre *Carnobacterium*, principalement représentée par l'espèce *Cb. maltaromaticum*. Après 19 jours de conservation à 7°C, le genre *Lactobacillus* et en particulier l'espèce *Lb. sakei* deviennent largement dominants parmi les bactéries lactiques.

La microflore de la crevette reste encore mal connue, et la plupart des études à ce jour ont porté sur les crevettes arctiques (*Pandalus borealis*). La flore lactique des crevettes marinées cuites emballées sous atmosphère modifiée et conservées à température de réfrigération (entre 0 et 8°C) est principalement constituée de l'espèce *Cb. divergens*, avec de faibles quantités de *Lactobacillus curvatus* (Dalgaard *et al.*, 2003). En cas de température de stockage largement supérieure aux recommandations (25°C), une large prédominance de *Enterococcus faecalis* a été observée dans ce produit (Dalgaard & Jorgensen, 2000). Dans les crevettes arctiques (*Pandalus borealis*) décortiquées cuites et emballées sous atmosphère modifiée, 60% de la flore en fin de stockage est constituée de bactéries lactiques de l'espèce *Cb. maltaromaticum* (Mejlholm *et al.*, 2005). De la même manière que sur le saumon, la congélation du produit n'affecte ni la vitesse de croissance ni les niveaux finaux de flore lactique (Mejlholm *et al.*, 2005).

Tableau 3 : Bactéries lactiques isolées de produits de la mer et fréquence d'isolement selon les études.

* : (+++) : flore majoritaire ; (++) : flore minoritaire ; (+) : isolement exceptionnel.

Produit	Référence	Genres/Espèces
Saumon frais emballé sous atmosphère modifiée	Emborg <i>et al.</i> , 2002	<i>Cb. maltaromaticum</i> (++)*
	Rudi <i>et al.</i> , 2004 Mauguin & Novel, 1994	<i>Cb. maltaromaticum</i> (+++), <i>Cb. divergens</i> (+++), <i>Lactococcus</i> spp. (+++), <i>Ln. mesenteroides</i> (+), <i>Carnobacterium</i> spp. (++)
Filets de cabillaud sous atmosphère modifiée	Mauguin & Novel, 1994	<i>Lactococcus</i> spp. (+++), <i>Ln. mesenteroides</i> (+), <i>Carnobacterium</i> spp. (++)
Filets de lieu sous atmosphère modifiée	Mauguin & Novel, 1994	<i>Lactococcus</i> spp. (+++), <i>Carnobacterium</i> spp. (++)
Lieu noir emballé sous atmosphère modifiée	Rudi <i>et al.</i> , 2004	<i>Cb. maltaromaticum</i> (++) , <i>Cb. divergens</i> (++)
Crevettes	Al-Dagal & Bazaraa, 1999	<i>Streptococcus</i> spp. (+)
Crevettes marinées emballées sous atmosphère modifiée	Dalgaard <i>et al.</i> , 2003	<i>Ec. faecalis</i> (++) , <i>Cb. divergens</i> (++)
	Mejlholm <i>et al.</i> , 2005	<i>Cb. maltaromaticum</i> (+++)
Saumon fumé emballé sous vide	Leroi <i>et al.</i> , 1998	<i>Cb. maltaromaticum</i> (+++), <i>Lb. farciminis</i> (++) , <i>Cb. divergens</i> (+), <i>Lb. sakei</i> (+), <i>Lb. alimentarius</i> (+)
	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998	<i>Cb. maltaromaticum</i> (+++), <i>Cb. divergens</i> (+), <i>Lactobacillus</i> spp. (++) , <i>Lactococcus</i> spp (+)
	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002	<i>Cb. maltaromaticum</i> (+++), <i>Lb. sakei</i> (++) , <i>Lb. curvatus</i> (++) , <i>Lb. homohiochii</i> (+), <i>Lb. plantarum</i> (+), <i>Lb. delbrueckii</i> (+), <i>Lb. casei</i> (+), <i>Leuconostoc</i> spp. (+), <i>Ec. faecalis</i> (+), <i>Weissella kandleri</i> (+)
	Rachman <i>et al.</i> , 2004	<i>Lb. curvatus</i> (+++), <i>Cb. maltaromaticum</i> (++) , <i>Cb. divergens</i> (++) , <i>Lb. sakei</i> (+)
Saumon fumé emballé sous atmosphère modifiée	Olofsson <i>et al.</i> , 2007	<i>Lb. sakei</i> (+++), <i>Lb. curvatus</i> (+), <i>Carnobacterium</i> sp. (+), <i>Cb. maltaromaticum</i> (+)
	Paludan-Muller <i>et al.</i> , 1998	<i>Cb. maltaromaticum</i> (+++), <i>Cb. divergens</i> (+), <i>Lactobacillus</i> spp. (++) , <i>Lactococcus</i> spp (+)
Truite fumée emballée sous vide	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002	<i>Cb. maltaromaticum</i> (+++), <i>Lb. sakei</i> (++) , <i>Lb. curvatus</i> (++) , <i>Lb. homohiochii</i> (+), <i>Lb. plantarum</i> (+), <i>Lb. delbrueckii</i> (+), <i>Lb. casei</i> (+), <i>Leuconostoc</i> spp. (+), <i>Ec. faecalis</i> (+), <i>Weissella kandleri</i> (+)
	Lyhs <i>et al.</i> , 1998	<i>Lactobacillus</i> spp. (+++), <i>Leuconostoc</i> spp. (++) , <i>Carnobacterium</i> spp. (+), <i>Enterococcus</i> spp. (+)
Hareng fumé emballé sous vide	Gancel <i>et al.</i> , 1997	<i>Lactobacillus</i> spp. (++)
Thon fumé sous vide	Mauguin & Novel, 1994	<i>Lactococcus</i> spp. (+++), <i>Carnobacterium</i> spp. (++) , <i>Ln. mesenteroides</i> (+)
Morue salée sous vide	Mauguin & Novel, 1994	<i>Lactococcus</i> spp. (+++),
Surimi sous vide	Mauguin & Novel, 1994	<i>Ln. mesenteroides</i> (+)

L'altération des produits de la mer par les bactéries lactiques

Un certain nombre d'études ont mis en évidence le fait que des niveaux élevés de flore lactique peuvent être retrouvés sur des produits altérés.

Dans les crevettes cuites décortiquées, marinées ou non, des bactéries des genres *Carnobacterium* et *Enterococcus* ont été retrouvées en temps que flore dominante sur des produits altérés (Dalgaard *et al.*, 2003 ; Mejlholm *et al.*, 2005). Les espèces les plus représentées sont *Cb. maltaromaticum*, *Cb. divergens* et *Ec. faecalis* avec une nette prédominance des deux premières à basse température, et des niveaux plus élevés de *Ec. faecalis* à 15-25°C (Dalgaard *et al.*, 2003). Les analyses sensorielles réalisées sur des produits marinés naturellement contaminés ont révélé le développement d'odeurs de poisson et de saveurs acides et amères sur des produits dont la flore était dominée par des bactéries lactiques (Dalgaard & Jorgensen, 2000). Pour préciser le rôle exact de ces bactéries dans l'altération des produits, des tests d'inoculation en culture pure sur produits stériles ou très propres ont été réalisés. Sur des crevettes arctiques (*Pandalus borealis*) emballées sous atmosphère modifiée des taux de 10⁵ UFC/g de *Cb. divergens* et *Cb. maltaromaticum* ont provoqué l'apparition d'odeurs aigres, chlorées, maltées et sucrées, ainsi que des taux élevés d'azote volatil et de tyramine (Laursen *et al.*, 2006). Sur le même type de produit, Mejlholm *et al.* (2005) ont observé l'apparition de faibles odeurs de chlore en présence de cultures pures de *Cb. maltaromaticum*. Cependant cette espèce a révélé un pouvoir altérant bien plus important lorsqu'elle est inoculée en co-culture avec *B. thermosphacta* (germe également présent dans les crevettes) conduisant à l'apparition d'odeurs aigres, de chien mouillé et de chlore typiques du produit naturellement altéré (Mejlholm *et al.*, 2005 ; Laursen *et al.*, 2006). La nature exacte de l'interaction entre ces deux espèces reste cependant à déterminer.

Dans le saumon fumé, la production d'odeurs caractéristiques d'altération (souffrées, acides, beurre et plastique) a été reliée à la présence de souches de *Lactobacillus sakei* et *Lb. farciminis* (Stohr *et al.*, 2001 ; Joffraud *et al.*, 2001). De plus, une forte corrélation a été démontrée entre la quantité de lactobacilles et la quantité d'azote basique volatil total d'une part (ABVT) et l'altération du produit d'autre part (Leroi *et al.*, 2001). La production de fortes odeurs d'altération lors de l'inoculation de *Lb. sakei* LKE5 (5.10⁶ UFC/g de saumon), une souche ayant des capacités d'inhibition de *L. monocytogenes* a été relevée sur du saumon

fumé (Nilsson *et al.*, 1999). A l'inverse des taux élevés de *Cb. maltaromaticum* ont été détectés dans le saumon fumé mais ces souches inoculées sur le produit en culture pure n'ont pas montré de capacité d'altération après 4 semaines de conservation (Paludan-Muller *et al.*, 1998). Le rôle des bactéries lactique dans cette matrice est donc complexe. Les lactobacilles semblent jouer un rôle majeur dans l'altération du produit, mais celui-ci varie fortement selon les espèces et les souches rencontrées. De plus il semble que certaines flores d'altération bénéficient d'un effet de synergie en présence d'autres espèces n'ayant aucune capacité d'altération en culture pure : la co-inoculation de souches de *Cb. maltaromaticum* avec *Bx. thermosphacta* ou *Vibrio* sp. sur du saumon fumé a résulté en une altération plus importante que celle observée avec chacun des germes séparément. De plus, les odeurs perçues en analyse sensorielle sont différentes selon que les souches sont inoculées seules ou en co-culture (Laursen *et al.*, 2006 ; Joffraud *et al.*, 2006). Ces caractéristiques rendent difficiles la prévision de l'altération et l'identification de souches ou d'espèces typiques de l'altération du saumon fumé.

Les bactéries lactiques ont aussi été retrouvées en temps que flore majoritaire d'échantillons altérés de truite fumée emballée sous vide, avec une prédominance des genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* (Lyhs *et al.*, 1998).

3) Utilisation de bactéries lactiques pour la biopréservation des aliments

3.1 Aspects généraux de la biopréservation

La technologie des barrières

Certaines techniques de conservation suffisent à elles seules à préserver un aliment pour une durée satisfaisante. Dans le cas de la pasteurisation ou de l'appertisation, la majorité des flores présentes sur le produit est détruite par la chaleur, et le conditionnement hermétique empêche une recontamination ultérieure. De même le salage ou le séchage modifient de façon radicale le produit (taux de sel supérieur à 15-20%, aw très basse...), ce qui retarde la croissance des flores susceptibles d'entraîner une altération. Cependant ces techniques s'accompagnent d'une

transformation importante du produit. De plus en plus de consommateurs préfèrent aujourd'hui des produits moins fortement préservés, ce qui permet de retrouver des qualités organoleptiques plus proches du produit d'origine. Une approche permettant d'obtenir une bonne conservation des aliments sans les soumettre à des transformations trop marquées est l'utilisation de la technologie des barrières (Leistner, 2000). Il s'agit d'appliquer successivement plusieurs procédés ralentissant la croissance des microorganismes. Chacun n'a que peu d'effet sur les qualités organoleptiques du produit, mais n'est pas suffisante en soi pour obtenir une bonne conservation. C'est alors la succession de ces techniques qui va permettre d'obtenir une inhibition satisfaisante. Les techniques les plus couramment utilisées sont la température (augmentation : cuisson modérée ; diminution : réfrigération), l'activité de l'eau, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, l'ajout de conservateurs (nitrates, sulfates, sorbate...) et la biopréservation (Leistner, 2000).

La biopréservation

La biopréservation consiste à inoculer sur un produit des souches bactériennes sélectionnées, de manière à inhiber la flore indésirable qui pourrait s'y trouver, sans modifier les caractéristiques organoleptiques de ce produit (Rodgers, 2001). La biopréservation fait partie des techniques qui peuvent être appliquées dans le cadre de la technologie des barrières. Elle peut être utilisée sur des produits légèrement préservés, sur des produits frais emballés sous atmosphère modifiée, ou sur des produits ayant subis une cuisson rapide.

Différents mécanismes entrent en jeu lors de la biopréservation. L'inhibition des flores indésirables par les bactéries bioprotectrices peut être due à la compétition nutritionnelle lors de la croissance, à la présence de certains produits du métabolisme ou à la production de bactériocines (Helander *et al.*, 1997). L'ajout de bactériocine purifiée directement sur un produit alimentaire, parfois considérée comme une forme de biopréservation (Stiles, 1996) se rapproche d'avantage de l'ajout d'additifs conservateurs. A l'heure actuelle, seule la nisine est autorisée pour ce genre de traitement.

Les bactéries lactiques dans la biopréservation

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation. De nombreuses études ont montré leur potentiel dans toutes sortes de produits alimentaires (voir

tableau 4). Certaines bactéries lactiques peuvent se développer rapidement dans les produits réfrigérés et emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyle et bactériocines) et elles sont généralement reconnues sans risques dans l'alimentation. De surcroît, elles disposent auprès des consommateurs d'une image naturelle et bénéfique pour la santé, due à leur présence dans des produits laitiers et aux effets probiotiques de certaines souches (pour revue, voir Stiles, 1996 et Guinane *et al.*, 2005).

Tableau 4 : Exemples de bactéries lactiques utilisées en biopréservation.

Espèce	Produit d'origine	Activité inhibitrice	Type d'activité	Essais	Référence
<i>Ec. faecium</i>	Fromage	<i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Alvarado <i>et al.</i> , 2005
<i>Lc. lactis</i>	Fromage	<i>Listeria</i>	Bactériocine	Fromage	O'Sullivan <i>et al.</i> , 2006
<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i>	Germes de luzerne	<i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> et <i>Salmonella</i>	Bactériocine	In vitro	Kelly <i>et al.</i> , 1996
	Produits végétaux prêts à consommer		Acidification et bactériocine	In vitro	Wilderdyke <i>et al.</i> , 2004
<i>Ln.</i> <i>mesenteroides</i>	Salade de chou, maquereaux fumés	<i>Listeria</i>	Bactériocine	In vitro	Kelly <i>et al.</i> , 1996
<i>Lb. casei</i>	Légumes	<i>Ae. hydrophilia</i>	Bactériocine	Salade composée	Vescovo <i>et al.</i> , 1997
<i>Lb. plantarum</i>	Choucroute Bière	<i>Listeria</i> <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	Acidification Bactériocine	Radis Salami	Wilson <i>et al.</i> , 2005 Todorov <i>et al.</i> , 2007
<i>Lb. sakei</i>	Charcuterie	<i>Listeria</i> , <i>Brochotrix</i>	Inconnu	Jambon	Vermeiren <i>et al.</i> , 2004
<i>Lb. curvatus</i>	Charcuterie	<i>Listeria</i> , <i>Brochotrix</i>	Inconnu	Jambon	Vermeiren <i>et al.</i> , 2004

Parmi les composés inhibiteurs issus du métabolisme des bactéries lactiques on peut citer les acides lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines. Les acides organiques sont les produits directs de la fermentation. Leur libération dans le milieu entraîne un abaissement du pH qui ralentit la croissance bactérienne. Ainsi Wilson *et al.* (2005) ont démontré que l'inhibition de *L. monocytogenes* dans des produits végétaux par une souche de *Lb. plantarum* était due à la production d'acide lactique. Cependant dans certains

produits une forte diminution du pH peut être considérée comme un signe d'altération. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est produit en présence d'oxygène sous l'action d'enzymes telles que la NADH oxydase, la pyruvate oxydase ou la superoxyde dismutase. Les bactéries lactiques ne disposant pas de catalase pour le réduire, ce composé s'accumule dans le milieu. Son potentiel d'oxydation élevé lui permet d'altérer les acides nucléiques et d'oxyder les lipides, entraînant une inhibition des microorganismes. Le diacétyle est un produit de la fermentation du citrate. Il est produit principalement par les bactéries des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Son action aromatique est recherchée dans certains fromages tel que le Gouda. Son activité inhibitrice est en général peu importante, due à la faible quantité présente dans les produits.

Les bactériocines sont des composés protéiques antimicrobiens produits par les bactéries. Ce sont des petits peptides qui sont produits par le ribosome sous forme mature ou sous forme d'un précurseur nécessitant une étape de maturation enzymatique ultérieure. On les distingue des antibiotiques, qui sont eux des produits secondaires du métabolisme assemblés par des réactions multi-enzymatiques. L'effet bactéricide est généralement dû à la formation de pores dans la membrane plasmique de la cellule cible (Jack *et al.*, 1995). Leur spectre d'action est souvent limité aux bactéries de genres ou d'espèces proches de celui de la bactérie productrice, mais leur efficacité contre les bactéries pathogènes susceptibles de se retrouver dans les aliments est incontestable, par exemple contre *L. monocytogenes* (Jack *et al.*, 1996) ou *Clostridium botulinum* (Rodgers *et al.*, 2003).

Les bactériocines sont classées en 3 groupes selon leur structure :

- Les bactériocines de classe I sont dénommées les lantibiotiques. Ce sont des petits peptides (moins de 5kDa) qui subissent une modification post-traductionnelle et qui contiennent des acides aminés modifiés tels que la lanthionine. On y retrouve par exemple la nisine.
- La classe II est elle-même subdivisée en trois sous-classes : IIa, IIb et IIc. Tous les peptides compris dans cette classe sont petits (environ 10 kDa), thermorésistants et ne subissant pas de modification post-traductionnelle. Les bactériocines de classe IIa sont des peptides à activité anti-listeria avec une partie N-terminale comprenant une séquence conservée du type Tyr-Gly-Asn-Gly-Val et un pont disulfure. Leur pI est compris entre 8 et 10. Les bactéries lactiques sont les principaux producteurs de bactériocines de classe IIa. Le peptide de référence de cette classe est la pédiocine

(Cleveland *et al.*, 2001 ; Drider *et al.*, 2006). Les bactériocines composées de deux peptides forment le groupe IIb. Enfin le groupe IIc comprends les bactériocines à un seul peptide ne rentrant pas dans les catégories précédentes.

- La classe III comprend les gros peptides (plus de 30 kDa) thermosensibles, sur lesquels peu d'informations sont encore disponibles.

Actuellement la seule bactériocine autorisée en temps qu'additif alimentaire est la nisine produite par *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Au sein de l'Union Européenne la nisine (E234) est autorisée comme agent de conservation dans les aliments tels que les fromages affinés et les fromages fondus, dans certains puddings, ainsi que dans la crème caillée et le mascarpone (directive 95/2/CE). Cependant, l'ajout d'additifs est interdit dans certains produits comme le saumon fumé. Les restrictions concernant l'ajout de bactéries vivantes dans les aliments ont été discutées par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, www.efsa.europa.eu). Il a été proposé de mettre en place un système appelé présomption conditionnelle d'innocuité (Qualified Presumption of Safety, QPS), prenant en compte les connaissances scientifiques accumulées sur un type de microorganisme afin de décider d'autoriser ou non son introduction dans l'alimentation. Ce concept est très proche de celui utilisé aux Etats-Unis (GRAS).

3.2 La biopréservation des produits de la mer

Utilisation des bactéries lactiques dans la biopréservation des produits de la mer

Les produits de la mer transformés et conditionnés sont des produits dont la qualité microbiologique est difficile à maîtriser, et qui présentent généralement une forte présence de bactéries lactiques. Ces deux éléments y rendent possible le développement de la biopréservation.

La majorité des essais a porté sur l'inhibition de *L. monocytogenes*, en particulier dans le saumon fumé. Wessels & Huss (1996) ont montré une inhibition de ce pathogène sur des tranches de saumon fumé par une souche de *Lc. lactis* productrice de nisine. Cependant l'absence de croissance de la souche bioprotectrice à 5°C réduit son efficacité aux cas de rupture de la chaîne du froid. Les souches de *Carnobacterium* sont particulièrement adaptées à la biopréservation du saumon fumé : elles poussent à 5°C, leur pouvoir inhibiteur est

largement démontré et elles ont peu d'impact sur les qualités organoleptiques des produits. Une réduction de 4 à 5 log du taux de *L. monocytogenes* sur des tranches de saumon emballées sous vide a été constaté en présence de *Cb. piscicola* à 10^6 UFC/g à 5°C comparé au témoin non ensemencé (Nilsson *et al.*, 1999). Une souche de *Lb. sakei* productrice de bactériocine a montré un effet bactériostatique sur ce même produit. La bactérie bioprotectrice inoculée à un taux de 10^3 UFC/g a permis de maintenir le niveau de *L. monocytogenes* (inoculée à la même concentration) à 10^4 UFC/g pendant 4 semaines à 10°C (Katla *et al.*, 2001). Yamazaki *et al.* (2003) ont montré un effet bactéricide d'une souche de *Cb. piscicola*, qui a permis de réduire la charge du pathogène de 3 log. Brillet *et al.* (2004) ont montré que trois souches de *Cb. divergens* et *Cb. piscicola* productrices de bactériocines avaient une activité antibactérienne (milieu modèle) sur toutes les souches d'une large collection de *L. monocytogenes* isolées de saurseries françaises. La souche *Cb. divergens* V41 s'est montrée particulièrement efficace pour prévenir *in situ* la croissance d'un cocktail de *L. monocytogenes* : dans des échantillons de saumon fumé conservés à 8°C co-inoculés avec 20 UFC/g de *L. monocytogenes* et 10^5 UFC/g de *Cb. divergens* V41, le taux de *L. monocytogenes* n'a pas augmenté en 4 semaines alors que dans un témoin ne contenant que *L. monocytogenes*, celle-ci a atteint un taux de 10^4 UFC/g (Brillet *et al.*, 2004). *Cb. divergens* V41 à haute concentration ne modifie pas les qualités organoleptiques du produit (Brillet *et al.*, 2005) ce qui en fait un bon candidat pour une application industrielle. Enfin des souches de *Lb. casei* et *Lb. plantarum* inoculées en co-cultures (10^6 UFC/g chacune) se sont révélées plus efficaces que lorsqu'elles étaient inoculées séparément. Les essais pratiqués contre *Listeria innocua* (une espèce ayant les mêmes propriétés de croissance que *L. monocytogenes*) ont montré une réduction de 3,2 log après 30 jours de stockage à 4°C (Vescovo *et al.*, 2006).

La production de bactériocines dans la biopréservation

L'addition de bactériocine purifiée dans du saumon fumé a aussi montré une inhibition de *L. monocytogenes*, mais moins efficace qu'avec la souche productrice (Katla *et al.*, 2001). Sur le même produit inoculé avec 10^3 UFC/g de *L. monocytogenes*, la bactériocine produite par la souche *Cb. divergens* V41 a permis de maintenir le taux de pathogène au même niveau pendant 21 jours à 4°C, ce qui montre une efficacité équivalente à la co-inoculation avec la souche productrice (inoculée à 10^5 UFC/g). Cependant à 8°C la souche productrice s'est montrée plus efficace que la bactériocine purifiée, avec une différence d'inhibition de *L. monocytogenes* d'environ 3 log (Duffes *et al.*, 1999a).

En règle générale, il semble qu'une forte proportion des bactéries lactiques retrouvées sur les produits faiblement préservés ait des capacités d'inhibition. Ainsi 41,4 et 14,4% des bactéries lactiques issues de saumon fumé testées respectivement par Tomé *et al.* (2006) et Duffes *et al.* (1999b) se sont montrées capables d'inhiber *L. innocua*.

La production de bactériocine est souvent le facteur principal d'inhibition. Une inhibition de 6 log d'une population de *L. monocytogenes* a été observée avec une souche de *Cb. piscicola* productrice de bactériocine, alors qu'elle n'était que de 3 log avec un mutant non producteur de bactériocine (Nilsson *et al.*, 2004). De même sur du saumon fumé stérile, la souche productrice de bactériocine *Cb. divergens* V41 a permis d'inhiber totalement la croissance de *L. monocytogenes* tandis que le mutant non producteur de bactériocine n'avait aucun effet (Richard *et al.*, 2003). Peu d'études ont été réalisées sur la biopréservation par des bactéries lactiques non productrices de bactériocines. On considère généralement que le principal mécanisme mis en cause dans le cas d'une inhibition en absence de bactériocine est l'acidification du milieu par l'acide lactique (Wilson *et al.*, 2005). Néanmoins Nilsson *et al.* (2005) ont montré que l'inhibition de *L. monocytogenes* par des souches de *Cb. piscicola* non productrices de bactériocines était possible grâce à la compétition nutritionnelle, principalement par déplétion du glucose dans le milieu de culture.

Amélioration de la qualité organoleptiques des produits semi-préservés

Si les études sur l'inhibition des bactéries pathogènes par des bactéries lactiques sont nombreuses, peu d'essais ont été menés en revanche sur les flores d'altération et les qualités sensorielles des produits de la mer. Cependant il a été montré que l'addition de bactériocine purifiée (nisine Z) ou de surnageant de culture de *L. lactis* permettait d'allonger significativement la durée de vie d'échantillons de crevettes marinées, tout en réduisant les flores à Gram positif (Einarsson & Lauzon, 1995). De même l'inoculation de souches de *Carnobacterium* a permis d'accroître significativement la durée de conservation de saumon fumé emballé sous vide (Leroi *et al.*, 1996). Cette technologie peut aussi se révéler intéressante pour le poisson frais emballé sous atmosphère modifiée : des essais menés par Altieri *et al.* (2005) ont montré que la présence de souches de *Bifidobacterium bifidum* a entraîné une diminution des flores indicatrices de l'altération de filets de carrelet. Les résultats

d'inhibition maximum ont été obtenus en interaction avec de l'huile essentielle de thym, dans des produits conservés sous atmosphère modifiée.

Les caractéristiques de croissance à basse température sont rarement prises en compte lors de la sélection de bactéries bioprotectrices. Ce critère est pourtant essentiel car les produits semi-préserverés sont généralement conservés à 4°C.

4) L'adaptation au froid chez les bactéries

4.1 Effet du froid sur les bactéries

Température de croissance et effet du froid sur le métabolisme

Les températures cardinales de croissances sont des caractéristiques qui définissent le comportement des bactéries selon la température. On définit ainsi la température optimale de croissance, à laquelle le taux de croissance de la bactérie est maximum, la température maximale de croissance et la température minimale de croissance. Lorsqu'on se rapproche des températures limites de croissance, le comportement des bactéries se modifie. On observe un ralentissement progressif de la croissance, puis un arrêt complet pouvant être accompagné de la mort cellulaire du microorganisme (voir figure 3).

Selon la loi d'Arrhenius, la vitesse de réaction d'une transformation non catalysée dépend directement de la température du milieu. La vitesse de réaction k s'exprime par la fonction $k = A^0 \cdot \times e^{E_a/RT}$ avec : A^0 : facteur de fréquence (s'exprime dans la même unité que k) ; E_a : énergie d'activation (kJ mol^{-1}) ; R : constante des gaz parfaits ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$) ; T : température en Kelvins. Les réactions catalysées du métabolisme étant influencées de la même manière par la température, il y a une relation directe entre la température et la vitesse de croissance des bactéries. Une variation de 10°C divise généralement la vitesse d'une réaction enzymatique par 2 ou 3. La croissance bactérienne à faible température est donc par conséquent plus difficile, et nécessite des stratégies d'adaptation pour faire face à cette diminution de la vitesse de réaction (Feller & Gerday, 1997).

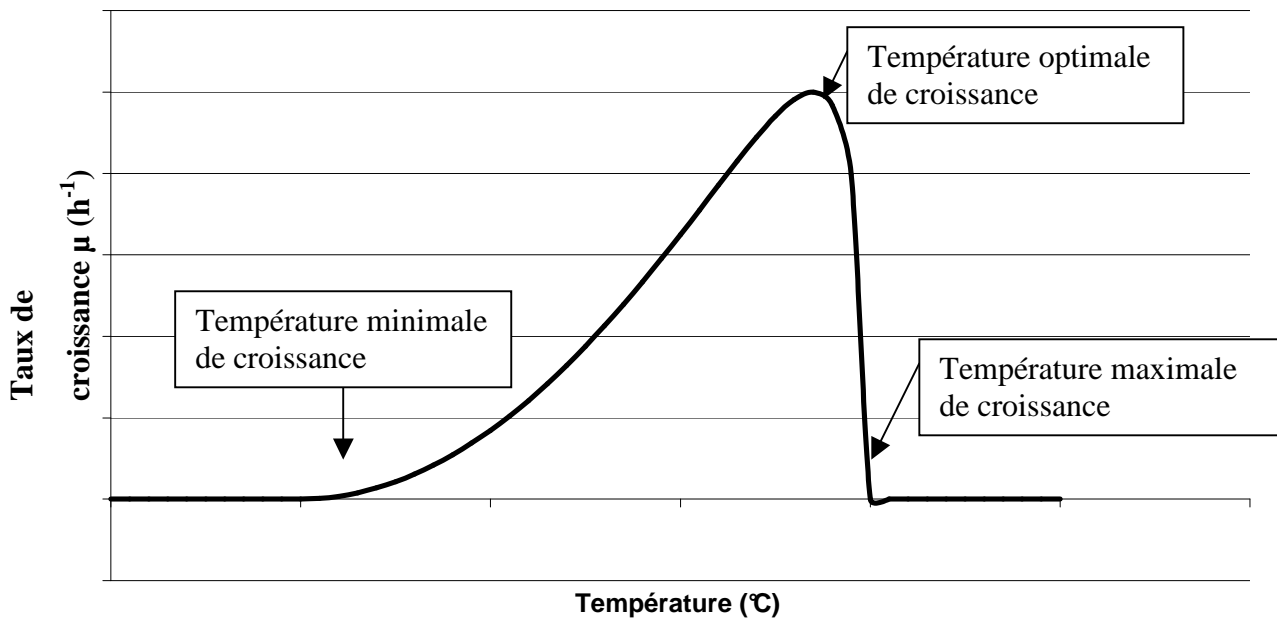


Figure 3 : Représentation du taux de croissance bactérien en fonction de la température.

En cas de changement brutal de la température (choc froid), les problèmes majeurs auxquels la cellule bactérienne se retrouve confrontée sont : la diminution de la fluidité membranaire, qui réduit l'efficacité des fonctions liées à la paroi (échanges actifs, signalisation, excréation...) ; la stabilisation des structures secondaires de l'ADN et de l'ARN qui affecte l'efficacité de la transcription, la traduction et la réplication (Yamanaka *et al.*, 1998) ; une diminution de l'efficacité du repliement des protéines, et donc un ralentissement de la vitesse de réaction enzymatique.

Une clé de l'adaptation au froid : la synthèse de protéines

Une stratégie employée par les bactéries confrontées à une baisse rapide de température consiste en la synthèse de protéines spécifiques, destinées à améliorer l'efficacité des processus métaboliques de la cellule. Ces protéines sont appelées cold induced proteins (CIP) ou protéines induites par le froid (Hebraud & Potier, 1999). Elles ont une grande variété de fonction, comme par exemple promoteurs d'autres protéines, régulateurs de la transcription et de la traduction, protéines de résistance générales au stress ou d'amélioration de la dégradation des matières carbonées (Horn *et al.*, 2007). Parmi ces protéines, celles qui sont synthétisées en plus grand nombre sont une famille de petits peptides d'un poids moléculaire

d'environ 7 kDa. Ces protéines identifiées pour la première fois chez *E. coli* par Jones *et al.* (1987) ont été appelées protéines de choc froid, ou cold shock proteins (CSP). Ces CSP sont retrouvées chez un grand nombre de bactéries, comme par exemple *B. subtilis* (CspB^B) ou *Lc. lactis*. De plus, ces protéines montrent un taux d'identité d'environ 40% avec le domaine choc froid des protéines humaines YB-1 et la famille de protéines eucaryotes Y-box (Yamanaka *et al.*, 1998).

Parmi les 9 protéines de la famille des CSP identifiées chez *E. coli*, CspA est celle qui est le plus fortement exprimée après un choc froid : elle représente dans ces conditions à elle seule 13% de la production totale de protéines de la cellule. Le mécanisme inducteur de cette surproduction est très simple et particulièrement ingénieux : l'ARN messager de la protéine est très instable à 37°C, avec une demi-vie estimée à 12 secondes (Fang *et al.*, 1997), mais sa stabilité augmente radicalement quand la température diminue, avec une demi-vie d'environ 20 minutes à 15°C (Yamanaka *et al.*, 1998). Une caractéristique commune aux gènes de CSP induites par un choc froid est la présence d'une longue séquence non traduite en région 5' de l'ARNm (untranslated region : 5'-UTR). Cette région est riche en structures secondaires, et est supposée jouer un rôle important dans la stabilisation des ARNm (Phadtare, 2004). Le rythme de synthèse de cette protéine ralentit lorsque la cellule est adaptée à son nouvel environnement. Parmi les autres protéines identifiées, la production des CspB, CspG et CspI est elle aussi fortement augmentée en cas de choc froid. Les protéines CspC et CspE quant à elles sont constitutives de la cellule, et la protéine CspD est induite en cas de stress nutritif, en général quand la croissance de la bactérie arrive en phase stationnaire (Horn *et al.*, 2007). Les protéines de cette famille possèdent vraisemblablement des fonctions similaires, et sont capables de se substituer les unes aux autres pendant la phase d'adaptation au froid. En effet des mutants de *E. coli* possédant des délétions multiples de gènes de *csp* (*cspA* + *cspB*, *cspA* + *cspG*, *cspB* + *cspG*, *cspA* + *cspI* ou *cspA* + *cspB* + *cspG*) n'ont pas montré d'augmentation de la sensibilité au froid. Cependant une délétion simultanée de ces 4 gènes a conduit à un phénotype sensible au froid (Xia *et al.*, 2001).

Chez *B. subtilis* trois protéines appartenant à la même famille ont été identifiées : CspB, CspC et CspD (Graumann *et al.*, 1996 ; Kunst *et al.*, 1997). La production de CspB et CspC est augmentée par un choc froid ou par le passage en phase stationnaire. Des essais de multi suppression ont montré que la production d'au moins une Csp était nécessaire pour assurer la viabilité de la cellule en condition optimale de croissance (Graumann *et al.*, 1997). Le rôle de

ces protéines en temps que chaperonnes des ARN messagers est maintenant clairement établi (Graumann & Marahiel, 1999). Elles permettent ainsi de maintenir l'efficacité de la transcription. Si des protéines de cette famille ont été identifiées chez de nombreuses autres bactéries à Gram positif ou négatif, aucun homologues n'a cependant été mis en évidence chez les archaea et les cyanobactéries (Phadtare, 2004).

A basse température les structures secondaires (épingles à cheveux) des ARN se stabilisent, ce qui ralentit fortement la transcription. De plus le mouvement des ribosomes le long des ARN se trouve gêné par ces structures, ce qui diminue la vitesse de traduction des protéines. Les protéines de la famille des Csp servent de chaperonnes pour les ARN en déstabilisant ces structures secondaires (Phadtare, 2004). La protéine CspA possède deux structures qui sont particulièrement importantes : les motifs RNP1 (KGFGFI) et RNP2 (VFVHF). Les acides aminés aromatiques (indiqués en jaune dans la figure 4) situés dans ces motifs semblent participer à la fixation de la protéine sur les brins d'ADN et d'ARN (Jiang *et al.*, 1997). Ce rôle a été mis en évidence chez *B. subtilis* en montrant que la substitution d'un résidu (phenylalanine remplacé par un alanine) situé dans le motif RNP1 ou RNP2 de CspB entraînait une perte de la capacité de fixation à l'ADN (Schröder *et al.*, 1995).

D'autres mécanismes sont mis en place par la cellule bactérienne pour s'adapter au froid. Pour remédier à la perte de fluidité membranaire, les bactéries ont recours à trois stratégies différentes : augmenter la proportion d'acides gras insaturés dans la membrane, raccourcir la longueur des chaînes lipidiques ou changer la conformation de iso à ante-iso (Phadtare, 2004). Chez *B. subtilis*, le mécanisme de désaturation est induit par un choc froid, vraisemblablement grâce à des histidine kinases liées à la membrane (Sakamoto & Murata, 2002). A haute température les bactéries synthétisent des protéines de choc chaud qui vont aider au repliement des protéines et éliminer les peptides abîmés. De la même manière, à basse température, un système de d'aide au repliement des protéines (trigger factor – TF) a été mis en évidence chez *E. coli* après un choc froid (Kandror & Goldberg, 1997). Enfin, toujours chez *E. coli*, une élévation de la concentration intracellulaire en trehalose a été remarquée lors d'un choc froid. Cependant, le rôle de ce sucre dans l'adaptation au froid n'est pas encore éclairci (Kandror *et al.*, 2002).

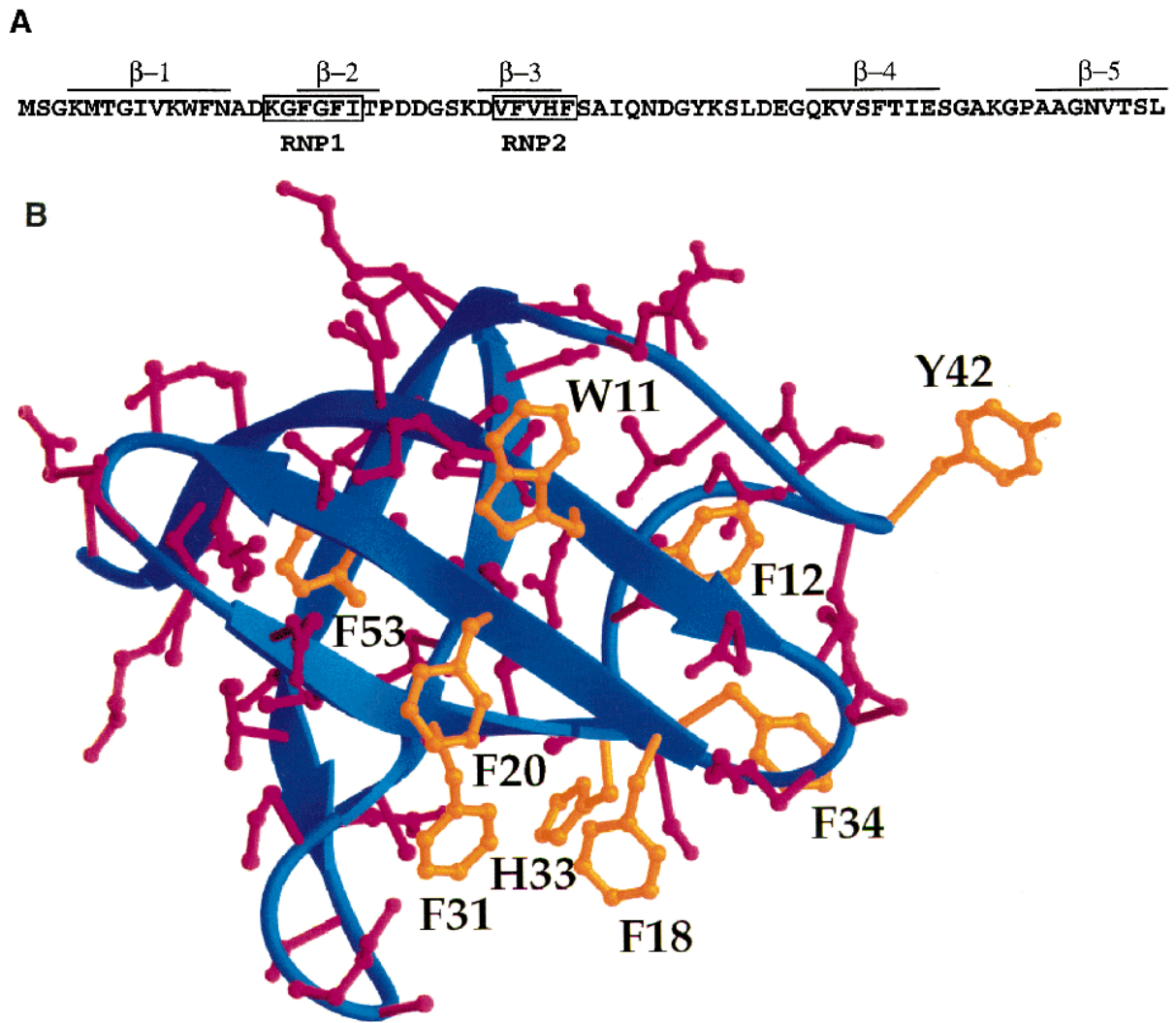


Figure 4 : (a) séquence en acides aminés de la protéine CspA de *E. coli* et (b) structure tridimensionnelle.

Les feuilletts β sont surlignés et les motifs RNP1 et RNP2 sont entourés (a). Les feuilletts β sont colorés en bleu et les résidus aromatiques en jaune (b) (Yamanaka *et al.*, 1998).

Un cas particulier de l'adaptation au froid : les psychrotrophes et psychrophiles

Chaque espèce bactérienne peut être définie par ses températures cardinales de croissance : minimale, optimale et maximale. En fonction de cette plage de température, on peut classer les bactéries en différentes catégories : thermophiles (croissance à haute température), mésophiles (croissance à température moyenne : entre 20 et 37°C) et psychrophiles. Cette dernière catégorie peut être subdivisée en deux : les psychrophiles *sensu stricto* dont la température maximale de croissance est de 20°C et l'optimale se situe en dessous de 15°C ; et

les psychrotrophes (parfois appelés psychrotolérants) dont la température optimale se situe entre 20 et 30°C et qui sont capables de se développer à 0°C (Morita, 1975).

La majorité des études sur l'adaptation au froid des bactéries s'est portée sur des bactéries mésophiles telles que *E. coli* ou *B. subtilis*. Cependant les études plus récentes menées sur les bactéries psychrotrophes et psychrophiles a permis de mettre en évidence certains mécanismes qui leur sont propres (Hebraud & Potier, 1999). Une stratégie d'adaptation de ces bactéries consiste à synthétiser des protéines plus flexibles que leurs homologues mésophiles, notamment au niveau du site actif. Ainsi Kulakova *et al.* (2004) ont montré que le remplacement d'un acide aminé (Glycine) situé près du site actif d'une estérase de *Psychrobacter* sp. par un autre résidu (Proline) permettait d'en augmenter la thermostabilité : le temps d'inactivation passait de 16 min à 40°C pour l'enzyme non modifiée à plus de 11 h pour l'enzyme modifiée. Cette modification s'accompagnait aussi d'une diminution de la vitesse de réaction à basse température. La souplesse structurelle qui caractérise les enzymes des bactéries adaptées au froid leur permet de réaliser les changements de conformation nécessaires à la catalyse en requérant une quantité d'énergie moins importante. Certaines enzymes se caractérisent ainsi par une indépendance totale de leur vitesse de réaction par rapport à la température. Elles sont appelées enzymes parfaitement évoluées (Feller & Gerday, 1997 ; Hebraud & Potier, 1999). La conséquence de cette rigidité diminuée des enzymes psychrophiles est une thermolabilité beaucoup plus prononcée que chez leurs homologues mésophiles, qui peut expliquer la faible résistance à la chaleur des bactéries psychrotrophes et psychrophiles.

De la même manière chez les bactéries adaptées au froid les protéines spécifiques (CIP et CSP) sont synthétisées de manière moins importante par rapport aux protéines de ménage que chez les bactéries mésophiles. De plus il n'y a pas de diminution de la synthèse de ces dernières. Enfin les CIP et CSP peuvent continuer à être synthétisées après la phase d'adaptation de la bactérie. On les appelle alors cold adaptation proteins (Caps) ou protéines d'adaptation au froid (Hebraud & Potier, 1999). Ainsi chez la bactérie psychrotrophe *Aeromonas hydrophila*, la production de 26 protéines a été induite après un choc de 10°C (passage de 30 à 20°C), et 47 après un choc de 25°C (passage de 30 à 5°C). Si certaines de ces protéines ont cessé d'être synthétisées après quelques heures de croissance à basse température, d'autres au contraire ont persisté pendant 21 h montrant bien leur statut de Caps.

Cependant aucune protéine de la famille des CSP n'a pu être mise en évidence dans cette étude (Imbert et Gancel 2004).

3.2 Adaptation au froid chez les bactéries lactiques

Effet du froid sur la croissance des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont généralement décrites comme des microorganismes mésophiles, avec une température optimale de croissance de 30°C (van de Guchte *et al.*, 2002). Leur température maximale de croissance se situe entre 35 et 45°C, et leur température minimale de croissance peut se situer aux alentours de 0°C, en fonction du caractère psychrotrophe ou non de la souche. Un seul exemple de bactérie lactique ne présentant pas de croissance à 30°C a été décrit dans la littérature : il s'agit de *Lactobacillus algidus*, une espèce décrite par Kato *et al.* (2000), isolée de bœuf réfrigéré emballé sous vide.

Les bactéries lactiques sont d'une grande importance dans le domaine de l'agroalimentaire. Les différentes étapes de process auxquelles elles sont soumises, ainsi que les impératifs de conservation les exposent souvent à des températures suboptimales de croissance, voire même des températures potentiellement létales (congélation). Il est donc très important de pouvoir prévoir le comportement de ces bactéries dans les situations de stress froid, aussi bien au niveau de la survie que de la croissance. Cependant il a été observé que la résistance au froid variait fortement en fonction des espèces (van de Guchte *et al.*, 2002).

L'étude de l'adaptation au froid des bactéries lactiques est récente, et s'est principalement concentrée sur des espèces modèles telles *Lc. lactis*. Lorsque des cellules de bactéries lactiques en phase exponentielle de croissance sont exposées à une température suboptimale (20°C sous la température optimale de croissance), elles continuent de se multiplier, mais à une vitesse plus réduite. Chez *E. coli*, après un passage de 37 à 10°C, une période de latence de 4 h est observée pendant laquelle aucune croissance n'a lieu suivie par une reprise de la croissance à un rythme beaucoup plus réduit (temps de génération de 24 h) (Jones *et al.*, 1987). Chez *Lc. lactis*, un passage de 30 à 20°C n'entraîne pas de latence. A 10°C une période de latence de 6 h est observée, suivie par une reprise de la croissance à une vitesse plus faible (Wouters *et al.*, 1999a). Chez *Sc. thermophilus*, la période de latence suivant un choc de 42 à

20°C est de 1 à 2 h (Wouters *et al.*, 1999b). Comme on peut le constater, ce mécanisme est donc grandement variable selon les espèces.

Les protéines induites par le froid

L'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle a permis d'observer les effets d'un choc froid sur le protéome des bactéries lactiques. La production de protéines induites par le froid ou CIP (cold-induced proteins) a été constatée chez *Lc. lactis* (Wouters *et al.*, 1999a), *Sc. thermophilus* (Wouters *et al.*, 1999b) et *Lb. sakei* (Marceau *et al.*, 2004). Respectivement 22, 23, 14 protéines ont été dénombrées. L'identification de plusieurs de ces protéines suggère une implication dans de nombreux aspects du métabolisme tels que la catabolisme des sucres (Hpr, CcpA, β -phosphoglucomutase, G3DPH), la structure du chromosome (homologue de HslA), la signalisation intra-cellulaire (LlrC) et l'adaptation générale au stress (OsmC, MsrA, Ohr, Usp) (Wouters *et al.*, 2000 ; Marceau *et al.*, 2004). Comme chez *E. coli* ou *B. subtilis*, des protéines de choc froid de la famille des CSP ont été détectées parmi les CIP chez les bactéries lactiques. Le nombre de gènes codant pour des CSP varie fortement selon les espèces et les genres (Champomier-Verges *et al.*, 2002).

Synthèse de protéines de choc froid (CSP) chez les bactéries lactiques

Comme chez *E. coli* ou *B. subtilis*, l'étude de l'adaptation au froid chez les bactéries lactiques s'est principalement concentrée sur la synthèse et la régulation des CSP. Chez *Lactococcus lactis* MG1363, la présence de 5 gènes codant pour des protéines fortement similaires aux CSP de *E. coli* a été mise en évidence : CspA, CspB, CspC, CspD et CspE. Une forte homologie (45 à 65%) entre ces protéines et les protéines CspA^E (*E. coli*) et CspB^B (*B. subtilis*) a été observée (voir figure 5). Les motifs de fixation à l'ARN RNP-1 et RNP-2 ont aussi été retrouvés, avec quelques modifications mineures. Ces gènes sont organisés en 3 opérons distincts : le premier composé des gènes *cspA* et *cspB*, le deuxième de *cspC* et *cspD* et enfin le gène *cspE* tout seul. L'étude des ARNm par northern blot a montré que les niveaux d'expression à 10°C des gènes *cspD* et *cspB* augmentent respectivement environ 30 à 40 fois, alors qu'ils n'augmentent que de 10 fois environ pour *cspA* et *cspC*. L'expression de *cspE* reste constante en cas de choc froid (Wouters *et al.*, 1998). L'analyse du protéome par électrophorèse 2D a révélé une sixième protéine : CspF. Au total, les protéines CspB, CspD, CspE et CspF représentent près de 10% de la quantité totale de protéines après un choc froid

(Wouters *et al.*, 1999a). La désactivation des gènes *cspA*, *cspB* ou *cspE* chez la même souche a montré que l'absence des protéines correspondantes ne change pas la vitesse de croissance à température optimale ni le temps de latence. Ce phénomène s'explique probablement par la présence des autres CSP qui compensent l'absence des protéines dont les gènes sont désactivés. Ainsi la production de CspE et CspC augmente chez la souche *cspA*- et *cspB*-, tandis que la production de CspC et CspD compense la perte simultanée des gènes *cspA*, *cspB* et *cspE* (Wouters *et al.*, 2001).

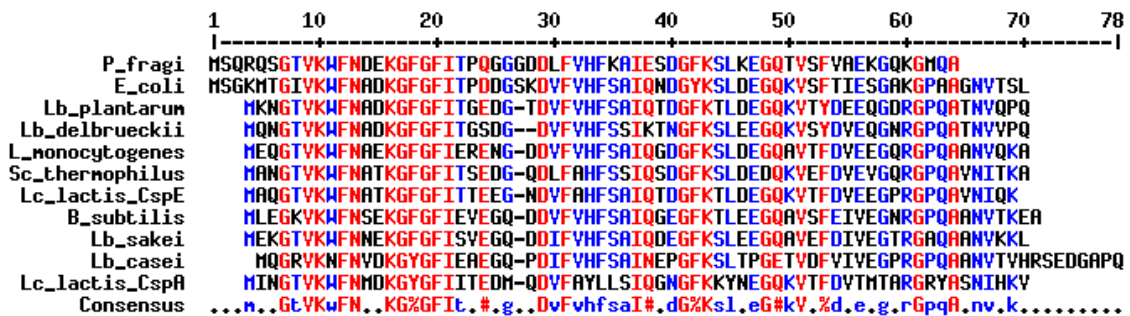


Figure 5 : Alignement de séquences protéiques de Csp.

Le rôle des CSP en temps que promoteur d'autres protéines d'adaptation au froid a aussi été démontré chez *Lc. lactis*. Chez la souche MG1363 dont les gènes CspA, CspB et CspE ont été désactivés, 4 protéines de type CIP (LlrC, une homologue de Hsla et 2 protéines non identifiées) ont été peu ou pas surexprimées après un choc froid à 10°C (Wouters *et al.*, 2001).

Chez *Lactobacillus sakei* 23K, une stratégie de croissance à basse température a été utilisée, permettant de mettre en évidence par électrophorèse bidimensionnelle 17 protéines dont les niveaux d'expression différaient de ceux à 30°C, 14 étant surexprimées et 3 sous-exprimées (Marceau *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter qu'aucune protéine de type CSP ne faisait partie des protéines identifiées. Chez *Lb. delbrueckii*, 2 gènes de CSP (*cspA* et *cspB*) ont été identifiés, et l'un d'entre eux (*cspA*) est fortement surexprimé après un choc froid de 17 ou 27°C. Cependant le gène *cspB* n'est pas induit par le froid. Les deux protéines déduites des séquences identifiées possèdent les motifs RNP1 et RNP2, indiquant leur nature de chaperonnes à ARN (Serror *et al.*, 2003). De même chez *Lb. plantarum*, trois gènes codant pour des protéines de type CSP (CspL, CspP et CspC) ont été identifiés et leur rôle dans l'adaptation au froid a été caractérisé (Mayo *et al.*, 1997 ; Derzelle *et al.*, 2003). Chez *Lb.*

casei, un mutant *cspA*- a montré une diminution de son taux de croissance de plus de 20 et 50% respectivement à 37°C (température optimale de croissance) et 20°C. Cette diminution revient à environ 40% à des températures de 15 et 0°C. Cette protéine semble donc très impliquée dans les processus métaboliques, aussi bien à température optimale que suboptimale (Sauvageot *et al.*, 2006).

Chez la bactérie thermophile *Sc. thermophilus*, la présence de 6 gènes codant pour des protéines de la famille des CSP a été mise en évidence. La production de 5 d'entre elles est induite par un choc froid à 20°C tandis que le niveau d'expression de la dernière (CspD) ne varie pas en fonction de la température. Un choc froid de 42 à 10°C a entraîné une faible induction de la production de CSP, beaucoup moins important qu'à 20°C. Cette différence s'explique probablement par la nature thermophile de la bactérie, qui ne lui permet pas de supporter des températures trop basses. La protéine la plus fortement exprimée (CspA) est déjà présente en quantité importante à 42°C, et voit son expression augmenter près de 3 fois après 4h de choc froid à 20°C, représentant à elle seule près de 9% de la quantité totale de protéines. Trois autres protéines (CspB, CspC et CspD) sont déjà exprimées à 42°C (Wouters *et al.*, 1999b).

Rôle des CSP dans la cryotolérance

Le transport et la conservation des ferments lactiques passent très souvent par la congélation. Celle-ci peut être létale pour la cellule, entraînant une perte d'efficacité du ferment. Il est donc très important de pouvoir prévoir le comportement des bactéries congelées afin de standardiser les ferments et d'optimiser la survie des cellules. Les bactéries lactiques résistent naturellement de façon efficace à la congélation. Une corrélation a été établie entre cette résistance et la croissance préalable des souches à une température suboptimale, par exemple chez *Lc. lactis*, *Lb. helveticus*, *Pc. pentosaceus* et *Sc. thermophilus* (Kim & Dunn, 1997 ; Wouters *et al.*, 1999a).

Si un lien existe vraisemblablement entre la cryotolérance et les CSP, celui-ci n'est pas encore complètement élucidé à l'heure actuelle. Il a été démontré que la protéine CspD de *Lc. lactis* MG1363 permettait une meilleure survie à la congélation lorsqu'elle était surexprimée. Cependant, aucune corrélation directe n'a pu être formulée entre les niveaux d'expression des gènes de Csp et les taux de survie de la bactéries (Wouters *et al.*, 1999a). Enfin la

désactivation des gènes *cspA* et *cspB* dans cette souche n'a pas entraîné d'augmentation de la mortalité lors de la congélation. Mais la désactivation de *cspE* en plus des deux gènes précédent a réduit environ 10 fois l'efficacité du traitement d'adaptation. Ce phénomène peut s'expliquer par l'absence combinée de CspE, une réduction de la quantité totale de CSP ainsi que la diminution de la production de certains CIP (Wouters *et al.*, 2001). Chez *Lb. plantarum*, la surexpression du gène *cspP* a permis d'augmenter environ 4 fois la survie de la bactérie après 5 ou 6 cycles de congélation/ décongélation par rapport à la souche témoin. A l'inverse la surexpression des gènes *cspC* et *cspL* n'a pas permis de constater d'augmentation de la survie (Derzelle *et al.*, 2003). Chez *Lb. casei*, la désactivation du gène *cspA* n'entraîne pas de diminution de la survie à la congélation (Sauvageot *et al.*, 2006).

Résultats

Chapitre I

Isolement et identification de souches de bactéries lactiques inhibitrices à partir de produits de la mer

Publication 1 :

Matamoros S., Pilet M.F., Gigout F., Prévost H., Leroi F. 2006.

Isolation and characterisation of psychrophilic lactic acid bacteria isolated from seafood products.

In Seafood research from fish to dish – Quality, safety and processing of wild and farmed fish. Ed. Luten J.B., Jacobsen C., Bekaert K., Saebo A., Oehlenschläger J. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.

(voir annexe I)

Publication 2 :

Matamoros S., Pilet M.F., Gigout F., Prévost H. et Leroi F.

Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria.

Article soumis à *International Journal of Food Microbiology*

Introduction

Des bactéries lactiques présentant des propriétés antibactériennes ont été isolées à plusieurs reprises de produits de la mer variés tels que la truite fraîche (Pilet *et al.*, 1995), le surimi (Yamazaki *et al.*, 2003) ou encore le saumon fumé (Duffes *et al.*, 1999b). Peu de travaux se sont penchés sur l'inhibition de la flore d'altération de ces produits, ainsi que sur la croissance des souches bioprotectrices à basse température. Dans le but de les utiliser pour la biopréservation de produits de la mer, une nouvelle sélection de bactéries lactiques a été réalisée à partir de ces mêmes produits en utilisant des critères de sélection différents : l'absence de croissance à 30°C et la capacité d'inhiber des souches de bactéries susceptibles d'être présentes sur les produits de la mer, aussi bien pathogènes qu'altérantes. Pour cela les isolats ont été testés *in-vitro* contre 14 souches cibles et une classification a été réalisée en fonction de leur pouvoir d'inhibition. La croissance à basse température est très importante pour des souches bioprotectrices, car elles vont devoir se développer dans des produits réfrigérés à des températures de 2 à 5°C. Cependant cette caractéristique est rarement prise en compte lors de la sélection de bactéries inhibitrices. Les isolats ont également été identifiés par des méthodes moléculaires, leur capacité de production d'amines biogènes testée et leur résistance à différents antibiotiques analysée. Enfin la croissance de 2 isolats a été caractérisée à différentes températures, de manière à confirmer leur caractère psychrotrophe.

Principaux résultats

La recherche de bactéries lactiques a été réalisée sur 51 produits commerciaux prélevés 10 jours avant ou 10 jours après leur date limite de consommation. Des étalements sur boîtes de Pétri de milieu Elliker et des conditions de culture en anaérobiose ont été choisis pour cette analyse de manière à ne sélectionner que des bactéries lactiques. La température d'incubation des boîtes de Pétri était de 8°C afin de favoriser la sélection de bactéries psychrotrophes. Les boîtes présentant un nombre satisfaisant de colonies (entre 10 et 50) ont été recouvertes avec une double couche de gélose molle (1% d'agar) contenant une des souches cible suivantes : *L. monocytogenes* (EU2160), *St. xylosus* (DSMZ 20029), *Pseudomonas* group I (EU2189) et *Se. liquefaciens* (EU2196). 132 colonies présentant une capacité d'inhibition contre au moins une des ces souches cibles ont été isolées et un test de croissance à 15 et 30°C a été réalisé pour valider leur caractère psychrotrophe. 54 d'entre eux (41%) se sont révélées capables de pousser à 15°C mais pas à 30°C. 2 isolats qui ne présentaient pas les caractéristiques phénotypiques des bactéries lactiques (Gram positive, catalase négative et oxydase négative) ont été rejetés. 52 isolats ont donc finalement été sélectionnés et intégrés à la collection du programme HURDLETECH sous les numéros EU2213 à EU2265.

Le spectre d'inhibition de ces 52 isolats a été testé contre 14 souches cibles représentatives des flores pathogène et d'altération des produits de la mer. La technique utilisée était la même que lors de la première sélection : les isolats ont été cultivés sur gélose Elliker, puis les colonies ont été recouvertes d'une couche de gélose molle contenant une souche cible. Chaque souche cible a été testée séparément et la taille du halo d'inhibition a été mesurée. Les isolats ont ensuite été regroupés selon la taille des halos en utilisant la classification hiérarchique de Ward avec la méthode de la distance Euclidienne au carré. Cette classification a permis de mettre en évidence 7 groupes possédant chacun des caractéristiques d'inhibition différentes, ainsi qu'un huitième groupe contenant les souches possédant les potentiels d'inhibition les plus faibles. Un isolat a été choisi dans chaque groupe pour la suite des expériences, à l'exception du groupe 8. Le séquençage de la totalité du gène de l'ARNr 16S a été réalisé pour les 7 isolats, ce qui a permis d'identifier 3 d'entre eux comme faisant partie de l'espèce *Leuconostoc gelidum* (EU2213, EU2247 et EU2262), 2 *Lactococcus piscium* (EU2229 et EU2241) (renommés ultérieurement *Lactococcus* sp. en attendant l'appellation définitive de la nouvelle espèce), 1 *Lactobacillus fuchuensis* (EU2255) et 1 *Carnobacterium alterfunditum*

(EU2257). Les tests d'activité réalisés avec le surnageant de culture des 7 isolats contre les 14 souches cibles ont permis de montrer que *Ln. gelidum* EU2247 produisait un composé peptidique anti-microbien, probablement une bactériocine actif contre *L. monocytogenes* et *Lb. farciminis*. Le mécanisme d'inhibition des autres isolats n'a pas été élucidé.

Des caractères sécuritaires pour l'utilisation de ces souches en alimentation humaine ont été testés. Aucun isolat n'est capable de produire de l'histamine ou de la tyramine. Tous les isolats se sont révélés sensibles à la présence des antibiotiques suivants : chloramphénicol, tétracycline et érythromycine sauf l'isolat *Lactococcus* sp. EU2241 qui a montré une résistance intermédiaire à l'érythromycine. Tous les isolats se sont montrés résistants aux antibiotiques suivants : vancomycine, kanamycine, colistine et acide nalidixique. Ces résistances sont fréquentes parmi les bactéries lactiques et sont généralement considérées comme étant acquises et non transmissibles. Tous ces éléments ont permis de caractériser avec précision les isolats sélectionnés et de démontrer leur innocuité.

La plage de température de croissance des isolats était un des critères de sélection, et a déjà été contrôlée : aucun isolat n'a montré de croissance à 30°C, et tous se développaient de manière satisfaisante à 15°C. Afin de confirmer ce comportement, le profil de croissance en fonction de la température a été réalisé pour 2 souches : *Lactococcus* sp. EU2241 et *Ln. gelidum* EU2247. Les croissances ont été mesurées en milieu liquide en utilisant l'appareil de mesure de densité optique (DO) automatique Bioscreen C. La méthode des dilutions successives a été employée. Elle consiste à mesurer les courbes de croissance de dilutions au 1/2 successives d'une culture et à déterminer le temps de détection, c'est à dire le temps au bout duquel la culture atteint une valeur de DO donnée située dans la phase exponentielle de croissance (en général DO = 0,3) L'intervalle entre chaque temps de détection correspond à un temps de génération, et on peut donc trouver le taux de croissance en exprimant la valeur de l'inoculum de départ de chaque dilution en fonction du temps de détection. Une régression linéaire de cette équation permet de retrouver la valeur du taux de croissance maximal μ_{\max} pour chaque température. L'analyse des taux de croissance a révélé un comportement rarement observé chez les bactéries lactiques. La souche *Ln. gelidum* EU2247 possède un optimum de croissance autour de 20°C, et un maximum entre 26 et 29°C. Les températures optimales et maximales de croissance de la souche *Lc. piscium* EU2241 sont très proches, respectivement 26 et 28°C, ce qui est très inhabituel pour une bactérie lactique.

Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria

S. Matamoros¹⁻², M.F. Pilet¹, F. Gigout², H. Prévost¹ and F. Leroi^{2*}

1: UMR INRA 1014 SECALIM ENVN-ENITIAA, ENITIAA, Nantes, France

2: Département de Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, Nantes, France

*Corresponding author: F. Leroi, Département de Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, Rue de l'Île d'Yeu, BP21105, 44311 NANTES cedex 3, France (e-mail: fleroi@ifremer.fr, Phone: +33 2 40 37 41 72)

Running title: selection of seafood-borne lactic acid bacteria

ABSTRACT

In this study, inhibiting psychrotrophic lactic acid bacteria were isolated and investigated for future use in biopreservation of seafood products. Screening of 5575 colonies isolated from various seafood products resulted in the selection of 132 colonies presenting inhibiting capacities. Among them, 52 isolates showed growth at 15°C but not at 30°C and had LAB characteristics. The inhibition spectrum of the 52 isolates against 14 target strains (Gram-positive and -negative) showed inhibition of typical seafood spoiling and pathogenic bacteria and enabled the separation of seven interesting clusters. Sequencing of the 16S rRNA gene of representative isolates each cluster allowed identification of three *Leuconostoc gelidum*, two *Lactococcus piscium*, one *Lactobacillus fuchuensis* and one *Carnobacterium alterfunditum*. No biogenic amine production was recorded for any of the seven selected isolates. Antibiotic resistance of the isolates revealed sensitivity to chloramphénicol, tetracycline and erythromycine and resistance to vancomycin, kanamycin, colistin and nalidixic acid. These resistances are widely described among LAB and are usually considered as intrinsic and non transferable. Growth rate in function of temperature was tested for one *L. piscium* and one *Ln gelidum* isolate and confirmed their psychrotrophic behavior and their inability to grow at 30°C. One out of seven isolates showed bacteriocin-like activity. The inhibition mechanisms of the other isolates are still unknown but may be due to competition for substrate. Absence of bacteriocin-like component could be a positive point to get rapid authorization for food application in France. This collection of LAB is now ready for testing on products.

Key words: lactic acid bacteria, seafood, inhibition, *Lactococcus piscium*, *Leuconostoc gelidum*, *Lactobacillus fuchuensis*, *Carnobacterium alterfunditum*

INTRODUCTION

Biopreservation is an innovative way of extending the shelf-life of food products and reducing microbial risks. Biopreservation consists in the inoculation of food products by selected bacterial strains able to inhibit the growth of undesirable bacteria (for a review see Rodgers, 2001). Lactic acid bacteria (LAB) are particularly interesting candidates for this technique. Indeed, they are frequently naturally present in food products and are often strong competitors, by producing a wide range of antimicrobial metabolites such as organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl and bacteriocins. They are generally recognized as safe microorganisms (Adams, 1999) and benefit from the healthy image of many dairy products.

Although biopreservation is currently applied in fermented food, there are few examples in unfermented products such as seafood. Some selected microorganisms that have given good results in a model medium are not efficient in seafood because they do not grow in this low-sugar content matrix, are not adapted to a chilled temperature or spoil the product (Wessels and Huss, 1996). Most of the successful studies in marine products have been obtained on the inhibition of *Listeria* spp. by different species of LAB, mainly from the *Carnobacterium* genus (Nilsson et al., 1999; Katla et al., 2001; Yamazaki et al., 2003; Brillet et al., 2004, 2005; Vescovo et al., 2006), which is due to either bacteriocin production (Richard et al., 2003) or competition mechanisms (Nilsson et al., 2005). However, other endogenous pathogenic bacteria, such as *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae*, *Clostridium botulinum*, histamine-producing bacteria, and post-contaminating bacteria, such as *Staphylococcus aureus* or *Salmonella* spp, can be associated with seafood safety and require special attention (Feldhusen 2000; Huss et al., 2000; Sumner and Ross 2002). Moreover, due to their high content of low-molecular weight nitrogenous compounds, their neutral pH and high water activity value, seafood products are also extremely sensitive to microbial spoilage. *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. are the main spoilers of fresh fish products stored in air or under vacuum or modified atmosphere packaging (MAP) (Gram and Huss 1996; Gram and Dalgaard 2002). In lightly preserved fish products (NaCl < 6 % in water phase, pH > 5) like cold-smoked fish, other microorganisms such as LAB, enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta* and *Vibrio* spp. can contribute to spoilage (Jorgensen et al., 2000; Leroi et al., 2001; Stohr et al., 2001; Joffraud et al., 2006). In order to develop the biopreservation technology to improve quality and extend the shelf-life of seafood, the selection of lactic acid

bacteria that show inhibiting properties against both pathogenic and spoilage bacteria at chilled temperatures is necessary.

In this study, a large selection of seafood products was screened for the presence of LAB able to grow at 15°C but not at 30°C and inhibiting at least one out of four target strains (*L. monocytogenes*, *St. xylosum*, *Pseudomonas* sp., *Serratia liquefaciens*). The selected isolates were then tested against fourteen new target strains, Gram-positive and -negative, spoiling and pathogenic bacteria, isolated from marine products. The most promising LABs were identified and their inhibition mechanisms tentatively explained. Growth profile in function of temperature was determined to characterize their psychrotrophic behaviour. Biogenic amines production and antibiotic resistance were tested to ensure the safety of the strains for a future use in biopreservation of seafood products.

MATERIALS AND METHODS

First screening: isolation of inhibiting bacteria from seafood products

Fifty-one samples of twenty-seven different commercial seafood products listed in Table 1 were obtained from different supermarkets (Nantes, France). They were stored at 4 or 8°C and opened for analysis between 10 days before and 10 days after the use-by date. 30 g of each sample were stomached in physiological water (5-fold dilution) (1 g l⁻¹ tryptone [Biokar Diagnostics, Beauvais, France], 8.5 g l⁻¹ NaCl), four successive decimal dilutions were prepared and 0.1 ml of the mother suspension and each dilution were spread on Elliker agar plates (four plates per dilution) (48.5 g l⁻¹ Elliker [Biokar Diagnostics], 15 g l⁻¹ agar [Biokar Diagnostics]). Plates were then incubated in anaerobic condition (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany) at 8°C for 10 to 15 days. At that time, plates presenting between 10 to 15 colonies were selected for a double-layer inhibition test.

Four target strains from the HURDLETECH collection (collection established during the Integrated Project (IP) SEAFOODplus contract No. FOOD-CT-2004-506359) stored at IFREMER (Nantes, France) were selected for the first inhibition test: *L. monocytogenes* (EU2160), *St. xylosum* (DSMZ 20029), *Pseudomonas* group I (EU2189) and *Se. liquefaciens* (EU2196). These strains were pre-cultivated in Brain Heart Broth (37 g l⁻¹ BHB, Biokar Diagnostics) before being diluted and added to molten soft BHB agar (37 g l⁻¹ BHB, 10 g l⁻¹ agar) and then spread on an isolation plate showing growth of 10 to 15 colonies. Plates were then incubated for 24 h at the specific target strain growth temperature (Table 2) in order to obtain a regular lawn. The presence of an inhibition zone was checked visually. Based on the

colony appearance, approximately one out of three colonies per plate showing an inhibition zone was picked up and cultivated in Elliker broth at 15°C. Selected isolates were isolated twice on Elliker agar plate at 15°C, and frozen in Elliker containing 10 % glycerol (Panreac Quimicia SA, Barcelona, Spain) at -80°C.

Table 2: Target strains, culture medium and growth temperature for two successive pre-cultures (72 and 24 h) for double-layer realization

Species	Code*	Medium†	Temperature
<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ10	BHB	37°C
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	EU2206	BHB	20°C
<i>Clostridium sporogenes</i>	ENITIAA	RCM	37°C
<i>Escherichia coli</i>	CIP76.24	BHB	37°C
<i>Lactobacillus farciminis</i>	EU2204	BHB	20°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	EU2160	BHB	20°C
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	EU2183	BHB + 15 g l ⁻¹ NaCl	15°C
<i>Pseudomonas</i> group I	EU2189	BHB	20°C
<i>Psychrobacter</i> spp.	CCUG 42949	BHB	20°C
<i>Salmonella enterica</i>	CIP81.3	BHB	37°C
<i>Serratia liquefaciens</i>	EU2196	BHB	20°C
<i>Shewanella putrefaciens</i>	EU2187	BHB	20°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP76.25	BHB	37°C
<i>Staphylococcus xylosus</i>	DSMZ 20029	BHB	37°C

*: CCUG: Culture Collection, University of Göteborg, Sweden; EU: HURDLETECH collection established during the European SEAFOODplus project, stored at IFREMER, Nantes, France; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France; ENITIAA: collection from ENITIAA, Nantes, France.

† : BHB : Brain Hearth Broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France); RCM medium (Reinforced Clostridium medium, prepared according to Oxoid recommendations): 3 g l⁻¹ yeast extract (Biokar Diagnostics), 10 g l⁻¹ meat extract (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England), 10 g l⁻¹ peptone (Oxoid LTD.), 5 g l⁻¹ glucose (Merck), 1 g l⁻¹ potato starch (La Bovida, Nanterre, France), 5 g l⁻¹ NaCl (Merck), 3 g l⁻¹ sodium acetate (Merck), 0.5 g l⁻¹ cystein hydrochloride (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), 0.5 g l⁻¹ agar (Biokar Diagnostics). The pH was adjusted at 6.9 before autoclaving.

Second screening : selection of psychrotrophic lactic acid bacteria among the inhibiting isolates

The selected isolates were cultivated at 15 and 30°C in Elliker broth in order to check their psychrotrophic characteristic. Growth was monitored visually by checking turbidity after 48 h and one week of culture. Isolates presenting growth at 15°C but no growth at 30°C after one week were selected and tested for three characteristics: Gram, catalase and oxidase tests. Only presumptive LAB i.e. Gram-positive, catalase- and oxidase-negative isolates were selected for further studies.

Third screening: inhibition spectrum of the selected lactic acid bacteria isolates

Research of inhibitory capacities of the selected isolates was enlarged to fourteen spoilage, pathogenic or surrogate target strains relevant to seafood products (listed in Table 2).

Tested LAB isolates were cultivated for 48 h in Elliker broth at 15°C before being spotted onto the surface of Elliker plates (10 µl per spot, six spots per plate) and plates were incubated anaerobically for 10 days at 8°C. A *Lactobacillus curvatus* strain from the IFREMER collection (SF762) that has no inhibiting abilities against the fourteen target strains was included in the experiment as a negative control. The 14 target strains were pre-cultivated in culture medium and temperature conditions specified in Table 2. They were then individually added to 15 ml of the same culture medium containing 10 g l⁻¹ of molten agar. Molten soft agar was then spread onto previously spotted and incubated Elliker plates. After 24 h of aerobic incubation at the target strain appropriate temperature, plates were examined for evidence of inhibition. The size of the inhibition zone was recorded and a score from 0 to 4 was given as follows: 0 for no inhibition, 1, 2, 3 and 4 for an inhibition halo diameter of 1, 2, 3 and 4 cm respectively.

Ward's hierarchical clustering method with squared Euclidian distance was used to separate the 52 LAB isolates into groups according to the size of their inhibition zone for the 14 target strains (Uniwin plus, version 4.01, Sigma plus, Paris, France).

Identification of bioprotective lactic acid bacteria

Molecular methods were used for identification of the LAB isolates. After 48 h of culture, cells were sedimented by centrifugation, washed and re-suspended in T100E buffer (100 mmol l⁻¹ Tris-HCl, 10 mmol l⁻¹ EDTA). Chromosomal DNA was prepared from the suspension using the acetate method (Weisburg et al., 1991).

The sequencing of the 16S rRNA gene of seven selected biopreservative isolates was performed. The primers used for the amplification of the 16S rRNA gene were fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rd1 (5'-TAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). The PCR amplified DNA fragments with primers fd1 and rd1 contained the complete 16S rRNA gene. PCR reactions were performed in a PTC-100 thermocycler in a total volume of 50 μ l containing 1X PCR buffer, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 1 μ g ml⁻¹ DNA, 0.8 μ mol l⁻¹ each primer, 0.2 mmol l⁻¹ (each) dNTP and 2U Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Hitchin, UK). Amplification consisted of a 60 s denaturation step at 94°C, a 60 s annealing step at 56°C and a 60 s extension step at 72°C. The first cycle was preceded by incubation for 5 min at 94°C. After 35 cycles, there was a final 7 min extension at 72°C. Negative controls containing no DNA template were included in parallel. The nucleotide sequence of the amplified 16S rRNA gene was determined with an ABI 370 automated sequencer using the Taq Dye-Deoxy™ terminator cycle sequencing method (Genome Express company, Meylan, France). Anticipated errors of PCR and sequencing reactions were avoided by sequencing both DNA strands. Sequence treatment was performed using the CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) and the invcomp program (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/invcomp_in.pl). Sequences were then compared to databases using the nucleotide-nucleotide BlastN program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Altschul et al., 1997).

RFLP patterns for differentiation of *Ln. inhae* from *Ln. gelidum* species were obtained as described by Kim et al. (2003) using endonuclease BsmAI (Biolabs). DNA from *Ln. gelidum* DSM5578 (DSMZ, Darmstadt, Germany) and *Ln. inhae* DSM 15101 were used for comparison.

Phenotypic tests were carried out as follow: lactic acid production and configuration using the Microzym® system (Biosentec, Toulouse, France) after 48 h of growth in Elliker broth at 15°C, gas production by the modified hot tube method (Dicks and van Vuuren 1987), polysaccharide production on Elliker Petri dishes and API 50CH galleries (Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France) incubated at 15°C for 48 h were performed.

Safety characteristics: biogenic amines production and antibiotics resistance

Histamine and tyramine production was tested for the seven selected isolates. Cultures were grown 72 h in Maijala medium (Maijala, 1993) supplemented with 2 g l⁻¹ of tyrosine or 2 g l⁻¹ of histidine. Standard solutions containing 5 to 1000 μ g ml⁻¹ of pure tyramine or histamine were prepared for calibration curves. 100 μ l of each culture supernatant and standard solution

were dansylated as described by Eerola et al. (1993). Twenty microliters of dansylated solution were analyzed by HPLC (Waters 600E Multisolute Delivery System and Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters, France) on a C18 ODS2 Equisorb column (CIL Cluzeau, France). The gradient elution was carried out as described by Connil et al (2002). Amines were detected by u.v. absorption at 254 nm.

The antibiotic resistance was determined using agar diffusion discs of chloramphenicol, tetracyclin, erythromycin, vancomycin, kanamycin, colistin and nalidixic acid as recommended by the supplier (BioRad, Hercules, CA, USA). Analysis were performed in triplicate.

Characterization of the inhibiting activity

The inhibition mechanisms of the seven selected isolates were investigated. The isolates were grown for 48 h at 15°C in 10 ml of Elliker broth, and culture cell-free supernatants were obtained by centrifugation (18000 g for 10 min). Supernatants were then submitted to different successive treatments: heating for 10 min at 80°C (step 1); adjusting the pH to 6.5 with 0.1 or 1 mol l⁻¹ NaOH (Merck) (step 2); addition of catalase (Merck) to a final concentration of 500 U ml⁻¹; 30 min at 25°C (step 3); addition of proteinase K (Boehringer, Mannheim, Germany) to a final concentration of 0.2 mg ml⁻¹, one h at 37°C (step 4). After each step, 10 μ l of the supernatants was spotted onto soft agar inoculated with one ml of pre-cultivated target strains (Table 2). The plates were then incubated for 24 h at target strain temperature (Table 2) and inhibition zones were recorded.

Temperature growth profile

In order to confirm the psychrotrophic behavior of the selected isolates, maximal growth rate in function of temperature were determined in an automated optical density measurements system Bioscreen C for two isolates: EU2241 and EU2247. Experiments were performed with a modified method of described by Augustin et al. (1999). Isolates were subcultured a 15°C for 24 h (EU2241) or 72 h (EU2247) and then inoculated at 5% (v/v) in modified Elliker medium (20 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 2.5 g/l gelatin, 7.5 g/l lactose, 7.5 g/l glucose, 1.5 g/l sodium acetate, 0.5 g/l ascorbic acid, 20 g/l sodium chloride). Modified Elliker medium was used to prevent polysaccharide production from the *Leuconostoc* isolates. Moreover the salt enhanced the growth of the tested isolates. Eight half-dilutions were prepared from this dilution, and 200 μ l of each of the nine dilutions were placed in the wells of honeycomb sterile plate. The last well of the series was filled with 200 μ l of sterile medium as a negative

control. The plates were placed in the Bioscreen C (Labsystem, Labsystem France SA, Les Ulis, France) and incubated at constant temperature. Incubation temperatures were 0, 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 and 29°C. OD measurements at 600 nm were performed automatically every 20 min after a 20 s shaking and recorded by the software Research Express v1.05 (Transgalactic Ltd., Helsinki, Finland).

The maximum growth rate was calculated by a linear regression method according to equation:

$$\ln(N_i) = k - \mu_{\max} * DT_i$$

With N_i : initial number of cell in the well and DT_i : absorbance detection time in well in mid-exponential phase.

All calculations were done using Matlab software (The Mathworks, Natick, MA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of potentially bioprotective bacteria from seafood products

This study presents the first steps of the selection of inhibiting LAB strains, for a biopreservative strategy of seafood products based on the growth at low temperature. A total of 132 colonies were isolated from the first double layer inhibition test. Many presumptive LAB colonies were obtained from MAP and smoked fish products. This is consistent with previous publications (Leroi et al., 1998; Gonzalez-Rodriguez et al., 2002). With only 15% of the analyzed samples (8 out of 51), the salmon products (fresh MAP salmon and smoked salmon) were the origin of nearly 64 % of the selected isolates (85 out of 132). Cold-smoked salmon has often been found to be a good provider of LAB with antimicrobial properties. Fourteen and 41%, respectively, of the isolates tested from this matrix respectively by Duffes et al., (1999) and Tomé et al., (2006) have shown anti-listerial properties. From the 132 selected isolates, 54 (41 %) were able to grow at 15°C and showed no growth at 30°C. Fifty-two (96 %) out of the 54 psychrotrophic isolates showed typical LAB characteristics, i.e. Gram-positive, catalase-negative and oxydase-negative. The screening of commercial seafood products allowed the selection of 52 inhibiting isolates, presenting LAB characteristics and

Table 1: Number of colonies screened and selected per product

Product name	Colonies covered	Colonies showing inhibition† (%)	Isolated colonies	Selected isolates based on growth temperature‡	Selected isolates based on LAB characteristics§
MAP* salmon	718	151 (21%)	48	39	39
MAP* sea-bream	240	11 (4%)	13	7	5
Cold-smoked salmon	554	221 (40%)	37	5	5
MAP* rough head grenadier	520	24 (4%)	7	3	3
MAP* shrimp	157	26 (16%)	11	0	0
Smoked haddock	217	4 (2%)	4	0	0
Roe cod (tarama)	174	0 (0%)	4	0	0
MAP* whiting	456	14 (3%)	3	0	0
Smoked herring	300	2 (1%)	2	0	0
Smoked shark	476	2 (0,5%)	2	0	0
Sea-bream viscera	184	1 (0,5%)	1	0	0
Red mullet viscera	371	0 (0%)	0	0	0
Smoked tuna fish	368	0 (0%)	0	0	0
Smoked trout	354	0 (0%)	0	0	0
Mackerel viscera	198	0 (0%)	0	0	0
Salmon carpaccio	128	0 (0%)	0	0	0
Smoked mackerel	121	0 (0%)	0	0	0
Herring viscera	39	0 (0%)	0	0	0
Salted cod, Shrimp (fresh) , Roe lumpfish, Roe salmon, Marinated sardines, Anchovy, Mussel, Pickled shell fish, Pickled herring	0	0 (0%)	0	0	0
Total	5575	456 (8%)	132	54	52

*: MAP : modified atmosphere packaging

†: number of colonies showing inhibition of at least one target strain among *Listeria monocytogenes* (EU2160), *Staphylococcus xylosus* (DSMZ 20029), *Pseudomonas* group I (EU2189) and *Serratia liquefaciens* (EU2196). In bracket, percentage of colonies showing an inhibition

‡: isolates able to grow at 15°C but not at 30°C

§: Gram-positive, catalase- and oxidase-negative isolates, able to grow at 15°C but not at 30°C

unable to grow at 30°C or above. All the results concerning the isolation and characterization of these potentially bioprotective bacteria are presented in Table 1. These 52 LAB isolates were added to the HURDLETECH collection under numbers EU2213 to EU2264.

Table 3: Mean inhibitory spectrum of eight clusters of psychrophilic lactic acid bacteria against fourteen target strain (the number represent the mean inhibition halo diameter of the group, in cm). Groups are obtained by the Ward's hierarchichal clustering method.

Cluster*	Representative isolate†	Target strain													
		Gram +							Gram -						
		<i>Cl. sporogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Lact. farciminis</i>	<i>Bx. thermosphacta</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Staph. xylosus</i>	<i>Psychrobacter</i> sp.	<i>Sw. putrefaciens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Ser. liquefaciens</i>	<i>Ph. phosphoreum</i>	<i>Salm. enterica</i>	<i>E. coli</i>
1 (16)	EU2213	4.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	2.0	0.0	0.0	0.0
2 (12)	EU2229	4.0	2.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.3	1.0	3.0	2.0	1.0	0.0	0.0
3 (6)	EU2241	4.0	2.0	1.0	2.0	1.0	0.0	0.0	4.0	4.0	2.0	2.0	3.0	1.0	0.0
4 (9)	EU2247	4.0	1.7	3.0	1.0	0.0	0.0	0.0	4.0	4.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0
5 (2)	EU2255	3.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0
6 (1)	EU2257	2.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	3.0	2.0	1.0	1.0	2.0	0.0	0.0
7 (2)	EU2262	4.0	1.0	1.0	1.0	3.0	0.0	0.0	3.0	4.0	1.0	1.0	1.0	3.0	3.0
8 (5)	N/A	0.0	1.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.4	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0

*: in brackets : number of isolates per cluster.

†: name of the selected representative isolate in the HURDLTECH collection

Inhibition spectrum of the isolates

The aim of this experiment was to differentiate the 52 LAB isolates upon their inhibiting capacities against a wide selection of Gram-positive and Gram-negative, pathogenic and spoiling strains relevant to seafood (later referred to as target strains). Most of the target strains used during the third screening to establish the inhibitory spectrum are commonly reported in seafood products.

Clustering was done to separate the 52 isolates into clusters according to the size of their inhibition zone. The mean inhibitory spectrum of each cluster is presented in Table 3. Eight distinct clusters were formed from this analysis. All clusters contained from one to 16 isolates. Cluster 8 grouped together five isolates showing the weakest inhibiting capacities, including the negative control *Lb. curvatus* SF762. Isolates from this cluster were not further investigated in this study.

All the tested LAB strains showed at least weak inhibition of *L. monocytogenes*. As demonstrated in many studies, this confirms the ability of LAB strains, isolated from various food products, to inhibit *L. monocytogenes* (Budde et al., 2003; Brillet et al., 2005; Alvarado et al., 2005; Wilson et al., 2005; Weiss and Hammes, 2006). As *L. monocytogenes* is commonly found in ready-to-eat foods and lightly preserved seafood products (Ben Embarek, 1994; Huss et al., 2000), it is interesting for a bioprotective strain to have inhibiting capacities toward this particular pathogen.

For each of the seven interesting clusters, the following isolates showing the highest inhibitory effect were chosen for further analysis: EU2213, EU2229, EU2241, EU2247, EU2255, EU2257 and EU2262 (see table 3).

Selection and identification of 7 representative strains

Sequencing of the 16S rRNA gene and comparison with online databanks enabled a more precise identification of these isolates. Isolates EU2213, EU2247 and EU2262 (from clusters 1, 4 and 7 respectively) were identified as *Ln. gelidum* or *Ln. inhae*, both at 99 % identity. RFLP analysis allowed the separation of 2 restriction fragments of approximately 200 and 700 bp. Comparison of these results with RFLP results from *Ln. gelidum* and *Ln. inhae* (Kim et al., 2003) allowed to identify them as part of the *Ln. gelidum* specie. These strains were heterofermentative, produced mainly D(-) lactic acid isomer and had a slimy colony appearance on Elliker agar. Polysaccharide production could be spoiling on some products. But according to the USDA nutrient database (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>) seafood products have a low sugar content so it is unlikely that polysaccharide production will be a problem. Isolates EU2229 and EU2241 (from clusters 2 and 3 respectively) were identified as *Lactococcus piscium* at 99 % identity. They were homofermentative cocci producing mainly the L(+) isomer of lactic acid. Isolate EU2255 from cluster 5 was identified as *Lactobacillus fuchuensis* at 98 % identity and was heterofermentative. Isolate EU2257 from cluster 6 was identified as *Carnobacterium alterfunditum* at 98 % identity and was homofermentative. The sequencing results and phenotypic characteristics of the seven selected isolates are summarized in Table 4.

Table 4: Phenotypic and molecular characteristics of the seven representative LAB isolates

Cluster	Representative isolate	Product	Lactic acid configuration	Polysaccharide production	Fermentation	Identification by sequencing the complete 16S rRNA gene
1	EU2213	MAP salmon	D(-)	Yes	Hetero-fermentation	<i>Leuconostoc inhae/gelidum</i>
2	EU2229	MAP salmon	L(+)	No	Homo-fermentation	<i>Lactococcus piscium</i>
3	EU2241	MAP salmon	L(+)	No	Homo-fermentation	<i>Lactococcus piscium</i>
4	EU2247	MAP salmon	D(-)	Yes	Hetero-fermentation	<i>Leuconostoc inhae/gelidum</i>
5	EU2255	MAP sea-bream	L(+)	No	Hetero-fermentation	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>
6	EU2257	MAP rough-head grenadier	L(+)	No	Homo-fermentation	<i>Carnobacterium alterfunditum</i>
7	EU2262	cold smoked salmon	D(-)	Yes	Hetero-fermentation	<i>Leuconostoc inhae/gelidum</i>

Isolates EU2213, EU2247 and EU2262 all fermented the following sugars in API 50CH galleries : L-arabinose, ribose, D-xylose, glucose, fructose, alpha-Methyl-D-Glucoside, esculin, cellobiose, melibiose, sucrose, trehalose, raffinose, gentiobiose, D-turanose, gluconate and 5-Keto-Gluconate. In addition, isolates EU2213 and EU2247 fermented mannose and maltose. Isolates EU2229 and EU2241 fermented : L-arabinose, ribose, D-xylose, galactose, glucose, fructose, mannose, mannitol, N-Acetyl-Glucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, melezitose, raffinose, gentiobiose, D-turanose, and gluconate. In addition, isolate EU2213 fermented sorbitol and cellobiose, and isolate EU2241 fermented alpha-Methyl-D-Glucoside. Isolate EU2255 fermented : ribose, galactose, glucose, fructose, mannose, N-Acetyl-Glucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, trehalose, gentiobiose, D-tagatose and gluconate. Isolate EU2257 only fermented esculin.

Lactococcus spp. and *Leuconostoc* spp. have already been isolated from seafood products (Mauguin and Novel, 1994; Wilderdyke et al., 2004) although, generally, *Carnobacterium*

spp. and *Lactobacillus* spp. were found dominant among the LAB flora (Leroi et al., 1998; Truelstrup-Hansen et al., 1998; Gonzalez-Rodriguez et al., 2002; Rachman et al., 2004).

Although belonging to genus frequently associated with seafood products, the species identified during this study are not often isolated from seafood products. This may be due to the fact that only psychrotrophic isolates were selected during the screening.

Safety of the selected isolates: biogenic amines production and resistance to antibiotics

Before considering their use for the biopreservation of food products, some safety aspects of the LAB isolates must be investigated. Knowledge of the antibiotic resistance and sensitivity of the strains is recommended (Rodgers, 2001). All of the seven tested strains were found to be sensitive to chloramphenicol, tetracycline and erythromycin except isolate EU2241 which showed intermediate resistance to erythromycin. All isolates were resistant to vancomycin, kanamycin, colistin and nalidixic acid. These resistances are widely described among LAB and are usually considered as intrinsic and non transferable (Mathur and Singh, 2005).

Biogenic amines production in food is often related to the presence of bacteria, including lactic acid bacteria (ten Brink et al., 1990). Seafood products have already been related to the presence of high amounts of biogenic amines (Leisner et al., 1994, Emborg et al., 2002) and biogenic amine production by biopreservative LAB strains have already been reported (Connil et al., 2002; Brillet et al., 2004). The histamine and tyramine production for the seven tested strains was below the detection threshold of $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ meaning that the isolates characterized in this study could be tested in products without risks of biogenic amine production.

Growth profile in function of temperature

Different strategies for the biopreservation of seafood products have already been conducted (Brillet et al., 2004; Altieri et al., 2005) but none of them focused on the cold adaptation of protective strains. The growth rate in function of temperature was tested for two isolates: *Lc. piscium* EU2241 and *Ln. gelidum* EU2247. According to optical density measurements, optimum growth temperature of isolate EU2241 was 26°C with a maximal growth rate of: $\mu_{\text{max}26} = 0.5921 \text{ h}^{-1}$ ($T_{g26} = 1 \text{ h } 11 \text{ min}$). Growth was recorded at 0°C , with a maximal growth rate of: $\mu_{\text{max}0} = 0.0243 \text{ h}^{-1}$ ($T_{g0} = 28 \text{ h } 31 \text{ min}$). The optimum growth temperature of isolate EU2247 was 20°C , with a maximal growth rate of $\mu_{\text{max}20} = 0.4399 \text{ h}^{-1}$ ($T_{g20} = 1 \text{ h } 34 \text{ min}$). Growth was also recorded at 0°C , with a maximal growth rate $\mu_{\text{max}0} = 0.0278 \text{ h}^{-1}$ ($T_g = 24 \text{ h } 56 \text{ min}$). No growth was recorded at 29°C or above. Maximal growth rate in function of temperature is presented in figure 1.

LAB are generally mesophilic organisms, with an optimal growth temperature around 30°C and a maximum between 35 and 45°C. Some LAB have been described as psychrotrophic organisms which means that they are capable of growing till 0°C (van de Guchte et al., 2002). The isolates presented in this study grow well at low temperature and have a maximum growth temperature below 30°C, which is very uncommon among psychrotrophic LAB. In fact, only one LAB isolated from vacuum-packed refrigerated beef and presenting the same characteristic has been identified, *Lb. algidus* (Kato et al., 2000). The interest of selecting bioprotective LAB isolates presenting such characteristic is that they will have an inhibiting effect at chilled storage temperature, making them more competitive against the spoiling flora which generally develops at this temperature. They will not grow at the body temperature (meaning that no growth will occur in the human digestive system). Moreover they will not grow in the conditions used to enumerate total mesophilic bacteria (PCA, 30°C), a count used by many industries as a hygienic criterion, i.e. inoculation with these bioprotective strains will not mask any hygienic problem. Their growth characteristics make them very promising for the biopreservation of refrigerated food products.

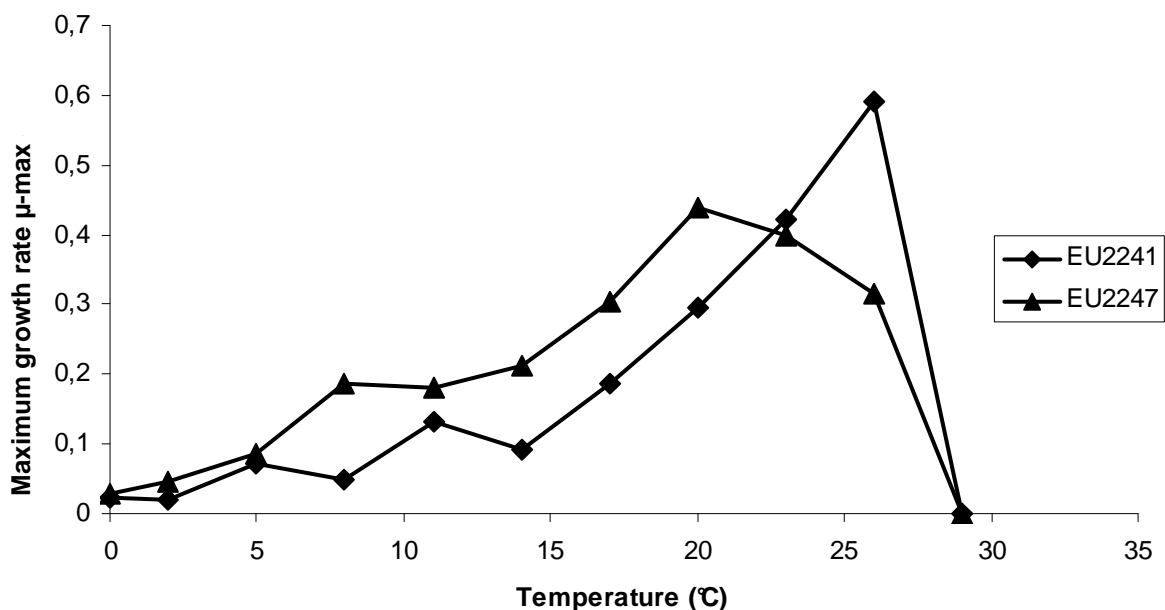


Figure 1: Maximum growth rate μ_{\max} in function of temperature for two LAB isolates, *Lactococcus piscium* EU2241 (◆) and *Leuconostoc gelidum* EU2247 (▲).

Antimicrobial mechanisms of the seven selected isolates

Investigation of the inhibition mechanisms was carried out. For five out of seven isolates tested (EU2213, EU2229, EU2241, EU2255, EU2262), no inhibition zone was recorded when

the untreated supernatant was used. The inhibition recorded in previous screenings seems to be related to the presence of the colony, maybe by strong colony-dependent acidification or nutritional competition. Tests on products will be carried out to ensure that there is no downshift of the sensorial quality induced by these isolates. The culture supernatant of isolate EU2257 showed activity when spotted against *Lb. farciminis*, *Bx. thermosphacta*, *Sw. putrefaciens*, *L. monocytogenes*, *St. xylosus*, *Pseudomonas* sp, *Se. liquefaciens* and *St. aureus*. Heating stopped the activity, i. e. no activity was detected for spots of step 1, 2, 3 and 4. A thermo sensitive compound may be responsible for this inhibition. More investigation are needed to determine the exact nature of this compound. The culture supernatant of isolate EU2247 identified as a *Ln. gelidum* showed activity against *Lb. farciminis* and *L. monocytogenes*. This inhibition did not disappear after heat treatment, pH adjustment and catalase treatment. Addition of proteinase K stopped the activity, suggesting that this isolate produced a bacteriocin-like component. Bacteriocin-like components have already been identified from *Leuconostoc* spp. (Daba et al., 1991; Hastings et al., 1991; Budde et al., 2003). The inhibition spectrum of this type of component is generally restricted to *Listeria* spp. and closely related Gram-positive strains (Jack et al., 1996; Helander et al., 1997; Millette et al., 2004) and it was also noticed in this experiment.

The creation of a collection of lactic acid bacteria strains from seafood products has been successfully carried out. All these 52 isolates share similar characteristics: inhibition of spoiling and pathogenic/surrogate bacteria and psychrotrophic characteristics with absence of growth at 30°C. The identification of seven representative isolates led to different genera and species such as *Ln. gelidum*, *Lc. piscium*, *Lb. fuchuensis* and *Cb. alterfunditum*. To our knowledge, no work has been conducted on their potential application as bioprotective agents of those species in seafood products. Most of the tested strains do not produce bacteriocins, which can be an advantage in obtaining the authorization of use for a human food application. In France (and in Europe), there is no regulation concerning the use of new strains in food; the authorization is delivered case by case by the veterinary or the fraud services (DSV- Direction des Services Vétérinaires or DGCCRF-Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes), based on clear identification of the strains and proof of their efficacy and safety following recommendations from AFSSA (AFSSA, 2002). The production of bacteriocin often implies long work on presumptive resistance mechanisms before the legal authorizations can be obtained. In this study, potentially bioprotective but non-bacteriocin producers LAB strains were investigated. This way, if these

strains are to be used at industrial scale, authorization will be easier to obtain. Inhibiting isolates from group 5 or 7, identified as *Lb. fuchuensis* and *Ln. gelidum* respectively, seems to be particularly interesting as they inhibit most of the pathogenic/surrogate and spoiling strains tested. However, more work is needed to investigate their *in situ* antimicrobial activity, as well as their safety and sensory acceptability for a food application. A combination of different bioprotective LAB could also be a strategy to improve the quality and safety of seafood products. Finally, their growth characteristics in function of temperature is rather uncommon and make them very promising for the biopreservation of chilled seafood products.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Ms Robins for her constructive reading of the manuscript. This work was supported by grants from the EU commission under the Integrated Project (IP) SEAFOODplus contract No. FOOD-CT-2004-506359.

REFERENCES

- Adams, M. R., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 68, 171-178.
- AFSSA, 2002. Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des micro-organismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire – souches nouvelles ou modifiées – applications différentes de souches déjà utilisées.
- Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M. A. and Sinigaglia, M., 2005. Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1294-1302.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Alvarado, C., Garcia-Almendarez, B. E., Martin, S. E. and Regalado, C., 2005. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. *Current Microbiology* 51, 110-115.
- Augustin, J. C., Rosso L., and Carlier V., 1999. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* 38, 137-146.
- Ben Embarek, P. K., 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 23, 17-34.
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Bouttefroy, A. and Leroi, F., 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and

- application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1029-1037.
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M. and Leroi, F., 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 104, 309-324.
- Budde, B. B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A. G., 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology* 83, 171-184.
- Connil, N., Plissoneau L., Onno B., Pilet M. F., Prevost H., and Dousset X., 2002. Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. *Journal of Food Protection* 65, 333-338.
- Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. and Lacroix, C., 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3450-3455.
- Dicks, L. M. T. and van Vuuren, H. J. J., 1987. A modification of the hot-tube method for the detection of carbon dioxide produced by heterofermentative *Lactobacillus* strains. *Journal of Microbiological Methods* 6, 273-275.
- Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P. and Dousset, X., 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 47, 33-42.
- Eerola, S., Hinkkanen R., Lindfors E., and Hirvi T., 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International* 76, 575-577.
- Emborg, J., Laursen B. G., Rathjen T., and Dalgaard P., 2002. Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 92, 790-799.
- Feldhusen, F., 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection* 2, 1651-1660.
- Gonzalez-Rodriguez, M. N., Sanz, J. J., Santos, J. A., Otero, A. and Garcia-Lopez, M. L., 2002. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *International Journal of Food Microbiology* 77, 161-168.
- Gram, L. and Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria--problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 262-266.
- Gram, L. and Huss, H. H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.
- Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E., 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology* 173, 7491-7500.
- Helander, I. M., von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T.-M., 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 8, 146-150.
- Huss, H. H., Reilly, A. and Ben Embarek, P. K., 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11, 149-156.
- Jack, R. W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Wettenhall, R. E., Hickey, M. W. and Coventry, M. J., 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2897-2903.

- Joffraud, J. J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J. S., Léon, S., Gigout, F. and Leroi, F., 2006. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 112, 51-61.
- Jorgensen, L. V., Dalgaard, P. and Huss, H. H., 2000. Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2448-2453.
- Katla, T., Moretro, 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 Microbiology* 18, 431-439.
- Kato, Y., R. Sakala M., Hayashidani H., Kiuchi A., Kaneuchi C., and Ogawa M., 2000. *Lactobacillus algidus* sp. nov., a psychrophilic lactic acid bacterium isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1143-1149.
- Kim, B., Lee, J., Jang, J., Kim, J. and Han, H., 2003. *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1123-1126.
- Leisner, J. J., Millan J. C., Huss H. H., and Larsen L. M., 1994. Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 417-423.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F. and Cardinal, M., 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 111-121.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F. and Cardinal, M., 2001. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology* 90, 578-587.
- Maijala, R. L., 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology* 17, 40-43.
- Mauguin, S. and Novel, G., 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 616-625.
- Mathur, S., and Singh R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review. *International Journal of Food Microbiology* 105, 281-295.
- Millette, M., Smoragiewicz, W. and Lacroix, M., 2004. Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. *Journal of Food Protection* 67, 1184-1189.
- Nilsson, L., Gram, L. and Huss, H. H., 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection* 62, 336-342.
- Nilsson, L., Hansen, T. B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knochel, S., Gram, L. and Gravesen, A., 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* 98, 172-183.
- Rachman, C., Fourier, A., Sy, A., De La Cochetiere, M. F., Prevost, H. and Dousset, X., 2004. Monitoring of bacterial evolution and molecular identification of lactic acid bacteria in smoked salmon during storage. *Lait*, 145-154.
- Richard, C., Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H. and Drider, D., 2003. Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Letters in Applied Microbiology* 36, 288-292.
- Rodgers, S., 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures - a review. *Trends in Food Science & Technology* 12, 276-284.

- Stohr, V., Joffraud, J. J., Cardinal, M. and Leroi, F., 2001. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* 34, 797-806.
- Sumner, J. and Ross, T., 2002. A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 77, 55-59.
- ten Brink, B., Damink C., Joosten H. M., and Huis in 't Veld J. H., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in food. *International Journal of Food Microbiology* 11, 73-84.
- Tomé, E., Teixeira, P. and Gibbs, P. A., 2006. Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. *Food Microbiology* 23, 399-405.
- Truelstrup-Hansen, L., Rontved, S. D. and Huss, H. H., 1998. Microbiological quality and shelf life of cold-smoked salmon from three different processing plants. *Food Microbiology* 15, 137-150.
- van de Guchte, M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D., and Maguin E., 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 187-216.
- Vescovo, M., Gianluigi, S. and Zacconi, C., 2006. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiology* 23, 689-693.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697-703.
- Weiss, A. and Hammes, W. P., 2006. Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold smoked salmon. *European Food Research and Technology* 222, 343-346.
- Wessels, S. and Huss, H. H., 1996. Suitability of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiology* 13, 323-332.
- Wilderdyke, M. R., Smith, D. A. and Brashears, M. M., 2004. Isolation, identification, and selection of lactic acid bacteria from alfalfa sprouts for competitive inhibition of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 67, 947-951.
- Wilson, A. R., Sigee, D. and Epton, H. A., 2005. Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1516-1522.
- Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N. and Montville, T. J., 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection* 66, 1420-1425.

Résultats complémentaires

Afin de confirmer la pertinence du regroupement effectué à partir des résultats du spectre d'inhibition, des analyses taxonomiques ont été entreprises sur l'ensemble des 52 isolats de la collection.

1) Analyses taxonomiques

Les isolats ont été analysés par amplification par PCR de la région intergénique des ARNr 16S et 23S selon la méthode de la PCR ISR (intergenic spacer region) décrite par Kabadjova *et al.* (2002). Les amorces utilisées sont : 16S-2: CTTGTACACACCGCCCGTC et 23S-7: GGTACTTAGATGTTTCAGTTC. Les réactions ont été réalisées dans un volume total de 25 μ l contenant : tampon PCR 1X, 0,05 mmol l⁻¹ de chaque dNTP, 0,4 μ mol l⁻¹ de chaque amorce, 1,5 mmol l⁻¹ de MgCl₂, 1U de *Taq* DNA polymerase (Biolabs, St Quentin en Yvelines, France) et 4 ng μ l⁻¹ d'ADN. Le programme utilisé consiste en : 60 s à 94°C, 75 s à 56°C et 75 s à 72°C, répété 35 fois. Le cycle est précédé par une dénaturation de 5 min à 94°C et se termine par une extension finale de 7 min à 72°C. Les réactions ont été réalisées dans un appareil MasterCycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Les souches de références utilisées étaient : *Leuconostoc mesenteroides* sp *dextranicum* DSMZ 20484 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany), *Leuconostoc inhae* CIP 108-081, *Lactococcus lactis* sp *lactis* CIP 102-975, *Lactococcus piscium* CIP 104-371, (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France) et *Carnobacterium divergens* V41 (collection de ENITIAA). Tous les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose à 1,5% (w/v) et visualisés après coloration au bromure d'éthidium.

La configuration de l'acide lactique majoritaire a été testée pour la totalité des 52 isolats de la collection en utilisant le système de dosage enzymatique Microzym® (Biosentec, Toulouse, France) après 48 h de croissance en milieu Elliker à 15°C.

L'amplification des régions intergéniques des ARNr 16S et 23S par PCR a mis en évidence la présence d'un profil de migration majeur, composé d'un fragment unique d'une taille de 750 pb pour 44 isolats correspondant à l'intégralité des groupes 1, 2, 3, 4 (excepté l'isolat EU2258) et 7. Ce profil était identique à celui obtenu pour les souches de référence *Ln. mesenteroides*

DSMZ 20484, *Ln. inhae* CIP 108-081 et *Lc. piscium* CIP 104-371. Les profils des souches représentatives des groupes 1, 2, 3 et 4 sont présentés en figure 5. Afin de différencier les souches de *Leuconostoc* sp. des souches de *Lactococcus* sp., la configuration de l'acide lactique majoritaire de ces groupes a été comparée. Tous les isolats des groupes 1, 4 (excepté l'isolat EU2258) et 7 produisaient en majorité de l'acide lactique D(-), ce qui signifie que ces isolats appartenaient au genre *Leuconostoc*. A l'inverse, tous les isolats des groupes 2 et 3 produisaient majoritairement de l'acide lactique L(+), et ont donc été identifiés comme faisant partie du genre *Lactococcus*. L'isolat EU2258 du groupe 4 présentait un profil de PCR ISR composé d'un fragment de 650 pb identique au profil de *Lc. lactis* CIP 102-975. Il produisait majoritairement de l'acide lactique L(+) et a donc été inclus lui aussi dans le genre *Lactococcus*. Les isolats des groupes 5, 6 et 8 ont montré des profils de PCR ISR composés de 2 ou 3 fragments, généralement obtenus pour les bactéries des genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium*.

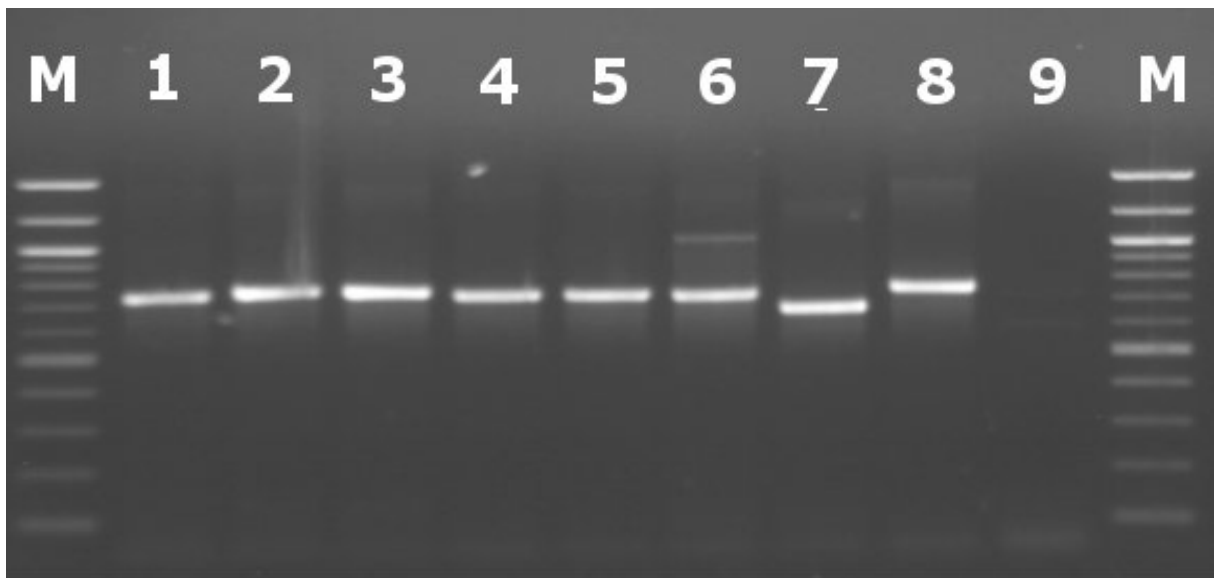


Figure 6 : Electrophorèse sur un gel à 1,5% d'agarose des fragments ITS 16S-23S amplifiés par PCR des isolats des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*.

M : marqueur de poids moléculaire 100 pb; 1 : EU2213, groupe 1, *Ln. gelidum* ; 2 : EU2229, groupe 2, *Lactococcus* sp. ; 3 : EU2241, groupe 3, *Lactococcus* sp. ; 4 : EU2247, groupe 4, *Ln. gelidum* ; 5 : *Ln. inhae* CIP 108-081 ; 6 : *Ln. mesenteroides* DSMZ 20484 ; 7 : *Lc. lactis* CIP 102-975 ; 8 : *Lc. piscium* CIP 104-371 ; 9 : contrôle négatif.

Ces analyses ont permis de mettre en évidence le fait que les isolats regroupés par la méthode du spectre d'inhibition formaient des groupes taxonomiques homogènes comme indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5 : Profils de PCR ITS et configuration de l'acide lactique des groupes d'isolats obtenus grâce au spectre d'inhibition.

Groupe d'inhibition	Nombre d'isolats	Profils ITS	Configuration de l'acide lactique	Genre présumé
1	16	1 fragment de 750 pb	D(-)	<i>Leuconostoc</i>
4	8	1 fragment de 750 pb	D(-)	
7	2	1 fragment de 750 pb	D(-)	
2	12	1 fragment de 750 pb	L(+)	<i>Lactococcus</i>
3	6	1 fragment de 750 pb	L(+)	
4	1	1 fragment de 650 pb	L(+)	
5	2	3 fragments de 600, 750 et 800 pb	L(+)	Indéterminé
6	1	3 fragments de 600, 700 et 750 pb	L(+)	Indéterminé
8	4	Profils variés à 2 ou 3 bandes	D/L ou L	Indéterminé

2) Identification partielle d'une nouvelle espèce bactérienne : *Lactococcus frigens* sp.nov.

Les souches EU2229 et EU2241 isolées du saumon ont d'abord été identifiées comme faisant partie de l'espèce *Lactococcus piscium*. Cependant les profils de croissance des isolats étant très éloignés de ceux décrits pour cette espèce, des analyses taxonomiques complémentaires ont été réalisées. Elles ont révélé que ces souches formaient une nouvelle espèce distincte dont les caractéristiques sont présentées ici.

Les colonies apparaissent après 48h de culture à 20°C sur gélose Elliker. Elles sont petites (0,5 à 1 mm de diamètre), blanches, lisses, rondes et bombées. Les cellules observées au microscope à contraste de phase Olympus CH-2 (Olympus, Tokyo, Japon) après 24h de croissance en milieu Elliker liquide à 15°C sont rondes, seules ou en courtes chaînes (2 à 8 cellules) et immobiles.

Le profil fermentaire de la souche EU2241 a été déterminé par galerie API 50CH (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) incubée 48 h à 15°C. Les tests ont été réalisés en

double. Les sucres fermentés sont : L-arabinose, ribose, D-xylose, galactose, glucose, fructose, mannose, mannitol, N-Acetyl-Glucosamine, amygdaline, arbutine, salicine, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, melezitose, raffinose, gentiobiose, D-turanose, et gluconate. Un profil similaire a été enregistré pour la souche EU2229.

La composition en G+C de l'ADN a été analysée par le Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Germany) selon la technique de Tamaoka & Komagata (1984). La valeur de 38,2% de G+C a été calculée d'après la méthode de Mesbah *et al.* (1989). Elle est légèrement inférieure à la valeur de 38,5 décrite pour la souche type de l'espèce *Lc. piscium* (Williams *et al.*, 1990).

La structure de la paroi cellulaire a été déterminée par DSMZ (Schleifer & Kandler, 1972). La présence d'un peptidoglycane de type A3 α L-Lys_L-Thr_L-Ala a été révélée.

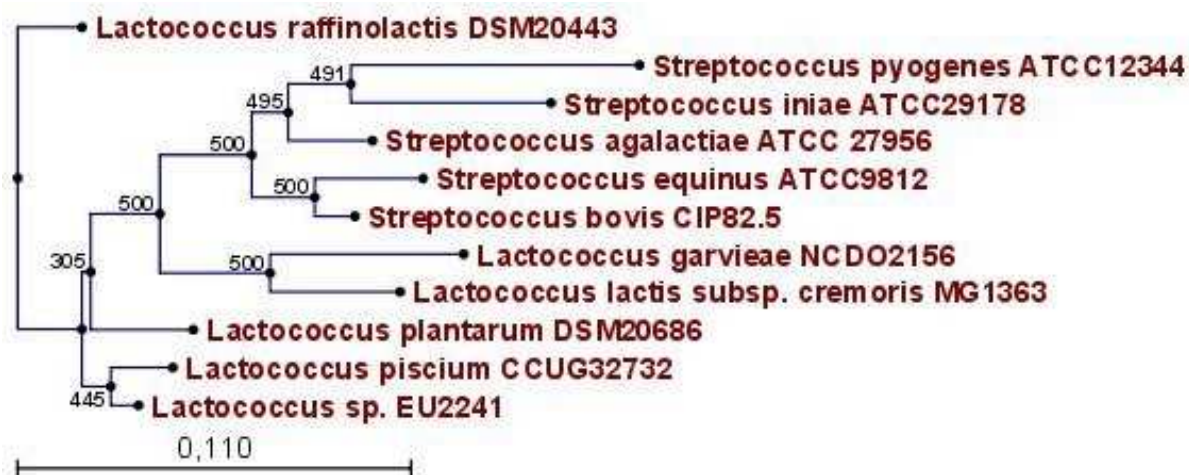


Figure 7 : Arbre phylogénétique établi sur la base de la comparaison des séquences de gènes d'ARN 16S montrant la relation entre la souche EU2241 et les espèces les plus proches.

Les chiffres sur chaque nœud représentent les valeurs de bootstrap.

Le séquençage du gène de l'ARNr 16S a été réalisé sur une portion d'environ 1500 pb selon la méthode décrite précédemment. La séquence a été comparée à la base de données Genbank, et les 10 séquences présentant les taux d'identité les plus élevés ont été alignées (environ 1500 paires de bases). Un arbre phylogénétique a ensuite été construit à partir de cet alignement avec le logiciel CLC Free Workbench 4.0.3 (CLC bio A/S, Aarhus, Denmark) en utilisant la

méthode du plus proche voisin. La fiabilité de la construction a été testée en utilisant une valeur de rééchantillonnage (bootstrap) de 500. Cet arbre est présenté en figure 7.

Les taux d'identité les plus élevés (hors souches non identifiées) ont été obtenus avec les gènes correspondant aux souches de *Lactococcus piscium* CCUG 32732 (99%), *Lactococcus plantarum* DSM 20686 (97%) et *Lactococcus raffinolactis* DSM 20443 (97%). Ces valeurs indiquent clairement que cette souche fait partie du genre *Lactococcus*. Une forte identité a de plus été remarquée entre la souche *Lactococcus* sp. EU2241 et un groupe de bactéries lactiques isolées à partir d'échantillons commerciaux de poulet. Le séquençage du gène de l'ARN 16S de ces souches montre un taux d'identité de 99% avec la souche de référence de *Lc. piscium* CCUG 32732, mais des différences observées lors du typage par RFLP ont conduit à les classer comme nouvelle espèce, pour l'instant non décrite (Vihavainen *et al.*, 2007).

L'hybridation ADN-ADN a été réalisée par DSMZ selon le protocole décrit par De Ley *et al.* (1970) et modifiée par Escara & Hutton (1980). Cette analyse a mis en évidence que l'identité entre la souche EU2241 et la souche de référence de *Lc. piscium* DSM 6634 n'était que de 51%, 25% avec la souche de *Lc. raffinolactis* DSM 20443 et 16% avec la souche de *Lc. plantarum* DSM 20686. Ces valeurs sont bien inférieures à celle de 70% recommandée pour la différenciation d'une nouvelle espèce bactérienne (Wayne *et al.*, 1987).

Dans l'ensemble, les données phénotypiques et moléculaires présentées ici semblent indiquer que la souche *Lactococcus* sp. EU2241 représente une nouvelle espèce. Ces résultats seront confirmés à partir d'une comparaison par AFLP (amplified fragment length polymorphism) des souches représentatives de cette nouvelle espèce et des espèces les plus proches.

Chapitre II

Amélioration de la qualité et de la sécurité
microbiologique de crevettes cuites décortiquées et de
saumon fumé emballés sous vide par utilisation de
bactéries lactiques psychrotrophes

Publication 3 :

S. Matamoros, F. Leroi, M. Cardinal, F. Gigout, F. Kasbi Chadli, J. Cornet, H.
Prévost and M.F. Pilet

Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve safety and quality of vacuum
packed cooked and peeled tropical shrimps and cold smoked salmon

Article en préparation

Introduction

Si de nombreux essais de biopréservation ont porté sur le contrôle du risque de *Listeria monocytogenes* dans les produits de la mer, très peu en revanche ont été menés sur la préservation des qualités organoleptiques et l'inhibition des flores altérantes. Ainsi l'efficacité de souches de *Carnobacterium* productrices de bactériocines a été montrée contre *L. monocytogenes* dans le saumon fumé, mais sans effet sur les qualités organoleptiques du produits (Yamazaki *et al.*, 2003 ; Brillet *et al.*, 2005). Les études réalisées sur la biopréservation des crevettes sont plus rares (Einarsson & Lauzon, 1995) et ont porté exclusivement sur l'utilisation de bactériocines.

L'objectif de la deuxième partie de ces travaux est de tester le comportement de souches de bactéries lactiques bioprotectrices sur deux produits différents : les crevettes cuites décortiquées emballées sous vide et le saumon fumé. Les 7 souches utilisées ont été isolées de produits de la mer et ont toutes montré des capacités d'inhibition en boîte de Pétri contre un large spectre de souches pathogènes et altérantes (voir partie I). Des analyses sensorielles ont été menées pour déterminer si l'inoculation de ces souches conduisait à une augmentation de la durée de conservation des produits, et si les odeurs caractéristiques du produit frais étaient modifiées en leur présence. Le saumon fumé est un produit bien caractérisé au niveau sensoriel. En revanche peu de données sont pour l'instant disponibles sur les crevettes. La création de profils sensoriels et l'entraînement du jury d'analyse sensorielle était donc un objectif essentiel pour le laboratoire de l'IFREMER. Des analyses microbiologiques ont été menées afin d'essayer de corréler les changements sensoriels observés avec les flores indicatrices typiquement utilisées pour contrôler la durée de vie de ces produits : flores totales mésophile et psychrotrophe, entérobactéries et bactéries lactiques. Enfin des tests d'inhibition de bactéries pathogènes ont été effectués sur des crevettes artificiellement contaminées avec des souches de *L. monocytogenes* et *St. aureus* afin de vérifier l'efficacité de ces souches pour préserver la sécurité des produits.

Principaux résultats

Deux lots différents de crevettes ont été utilisés pour les analyses sensorielles : le lot M était composé de crevettes décortiquées et congelées, tandis que le lot U était constitué de crevettes entières congelées. Ces deux lots ont été préparés dans le laboratoire de l'ENITIAA : cuisson, décorticage (pour le lot U), ensemencement des souches de bactéries lactiques par pulvérisation et emballage sous vide. Les échantillons ont ensuite été stockés à 8°C, ce qui est supérieur à la température recommandée pour la conservation de ce type de produit (4°C) mais permet d'obtenir une altération plus rapide. Les analyses sensorielles ont été conduites après 1 et 4 semaines de conservation. Les échantillons de contrôles se sont révélés non altérés après une semaine, et très altérés après 4. Les souches *Leuconostoc gelidum* EU2247 et *Lc. gelidum* EU2262 n'étaient pas altérantes après une semaine de conservation, et ne modifiaient pas les odeurs des crevettes. Une nette amélioration de la durée de conservation a été constatée après 4 semaines pour ces 2 échantillons, jugés non altéré par 82 % des membres du jury d'analyse sensorielle. A l'inverse les échantillons ensemencés avec les souches *Lb. fuchuensis* EU2255 et *Cb. alterfunditum* EU2257 ont été jugés altérés dès la première semaine de conservation. Les souches de *Lactococcus* sp. EU2229 et EU2241 amélioraient la qualité des échantillons sur lesquels elles étaient ensemencées, mais de manière moins importante que les souches EU2247 et EU2262. Enfin la souche de *Ln. gelidum* EU2213 présentait des résultats très variables en fonction des lots : sur le lot M elle a été jugée comme altérante dès la première semaine de conservation, alors que sur le lot U sa capacité de biopréservation a été jugée identique à celle de la souche EU2247. Les analyses microbiologiques n'ont pas permis de mettre en évidence une corrélation entre l'amélioration de la durée de conservation du produit et une variation des flores mesurées.

Les 4 souches présentant les meilleurs résultats ont été sélectionnées pour les essais de biopréservation du saumon : *Ln. gelidum* EU2247 et EU2262, et *Lactococcus* sp. EU2229 et EU2241. Des tranches de saumon fumé ont été ensemencées en suivant le même protocole que précédemment décrit, emballées sous vide et conservées à 8°C pendant 4 semaines. Des analyses sensorielles ont été menées après 2 et 4 semaines de conservation. L'échantillon témoin non ensemencé a été jugé faiblement altéré après 2 semaines de stockage, et fortement altéré après 4 semaines. L'échantillon ensemencé avec la souche *Lactococcus* sp. EU2241 a été jugé non altéré après 2 et 4 semaines de conservation. Les autres échantillons ont tous été

jugés altérés après 2 (souches EU2262 et EU2247) ou 4 semaines de conservation (souche EU2229). A l'inverse des essais sur crevettes, les souches de *Lactococcus* sp. se sont révélées plus efficaces que les souches de *Ln. gelidum* pour la biopréservation du saumon fumé. Ces résultats soulignent l'importance de choisir des souches bioprotectrices en fonction de la matrice alimentaire sur laquelle elles seront utilisées.

Pour les tests d'inhibition de bactéries pathogènes, 2 souches ont été sélectionnées : une souche de *Lactococcus* sp. (EU2241) et une souche de *Ln. gelidum* (EU2247). Elles ont été co-inoculées avec des souches de *L. monocytogenes* et *V. cholerae* ou *St. aureus* sur un lot de crevettes cuites décortiquées et emballées sous vide (lot P). Les deux souches se sont révélées efficaces pour l'inhibition de *L. monocytogenes*, réduisant le taux de 2 log (UFC g⁻¹) environ avec des résultats légèrement meilleurs pour la souche EU2241. Dans les échantillonsensemencés avec *St. aureus*, la présence de la souche EU2241 a permis de réduire significativement la charge bactérienne de 2 log (UFC g⁻¹) environ. L'inhibition produite par la souche EU2247 était légèrement inférieure à 1 log (UFC g⁻¹). La croissance de la souche de *V. cholerae* s'est révélée trop faible pour obtenir des résultats. Ces tests ont mis en évidence une meilleure efficacité de la souche de *Lactococcus* sp. EU2241 pour l'inhibition des bactéries pathogènes.

Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve safety and quality of vacuum packed cooked and peeled tropical shrimps and cold smoked salmon.

S. Matamoros¹⁻², F. Leroi², M. Cardinal², F. Gigout², F. Kasbi Chadli², J. Cornet², H. Prévost^{1*} and M.F. Pilet¹

1: UMR INRA 1014 SECALIM ENVN/ENITIAA, ENITIAA, Nantes, France

2: Ifremer, Département de Sciences et Techniques Alimentaires Marines, Nantes, France

*Corresponding author: Dr. H. Prévost, UMR INRA 1014 SECALIM ENVN/ENITIAA,

ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225, 44322 NANTES cedex 3, France

(e-mail: prevost@enitaa-nantes.fr, Phone: +33 2 51 78 55 24)

Running title: Biopreservation of seafood products

Keywords: biopreservation; sensory analysis; cooked shrimp; cold-smoked salmon; lactic acid bacteria

Abstract

Previously isolated lactic acid bacteria (LAB) from seafood products have been investigated for their capacity to increase the sensory shelf life of vacuum-packed shrimps and cold-smoked salmon (CSS) and to inhibit the growth of three pathogenic bacteria. Two batches of cooked, peeled and vacuum-packed shrimps were inoculated with seven LAB strains separately at an initial level of $5 \log$ (CFU g^{-1}) and their shelf-life was estimated by sensory analysis after 7 and 28 days of storage at $8^{\circ}C$. Two *Leuconostoc gelidum* strains greatly extended the shelf-life of both batches, two *Lactococcus piscium* strains had a moderate effect, two were spoilers (*Lactobacillus fuchuensis* and *Carnobacterium alterfunditum*) and the last one (*Leuconostoc gelidum*) showed highly variable results depending on the batch considered. The four strains showing the best results (two *Ln. gelidum* and two *Lc. piscium*) were selected for the same experiment in CSS. In this product, *Lc. piscium* strains showed better inhibiting capacities, improving significantly the sensory quality at 14 and 28 days of storage. Finally the inhibiting capacities of two strains (one *Ln. gelidum* and one *Lc. piscium*) were tested against three pathogenic bacteria (*Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) by challenge test in shrimps. LAB and pathogenic bacteria were co-inoculated in vacuum packed shrimps and enumerated during 5 weeks on selective medium. The strain *Lc. piscium* EU2241 was able to significantly reduce the number of *L. monocytogenes* and *St. aureus* in the product by 2 decimal logarithms.

Introduction

Among the ready-to-eat (RTE) food, seafood products like cooked and peeled shrimps or smoked fish are gaining more and more attention from consumers. France is Europe's second largest shrimp market after Spain, with 100 000 metric tons imported in 2006 corresponding to the largest import value for seafood products, before salmon (4, 6). Eighty-two percents are raw/frozen tropical shrimps (*Penaeus* spp.) that are cooked by local factories, and distributed either fresh and unpeeled or decorticated and stored in modified atmosphere (3). France is also the first worldwide producer of cold-smoked salmon (CSS) with 26 000 metric tons in 2005 (data from the French Agricultural and Fisheries Ministry). These two kinds of products are distributed under vacuum or modified atmosphere packaging (MAP) at chilled temperature (between 2 and 5°C). In France, preservatives (nitrates, sulfates or sorbate...) can be added to enhance the shelf-life in cooked products but are forbidden in smoked fish. The microflora of these products is complex and seems to be mainly associated to process manipulations. The microbiology of CSS has been extensively studied over the past years. Lactic acid bacteria (LAB) generally dominate the microflora at the end of the storage, but Enterobacteriaceae and *Photobacterium phosphoreum* can also be an important part (11, 19, 26, 33, 44, 53, 54, 42). Their role in the spoilage of the product is still not very clear, but some species like *Lactobacillus sakei* or *Brochotrix thermosphacta* have been demonstrated to be spoilers in pure culture (50). The microbial flora of cooked shrimps is less documented. The dominant Gram-positive flora, mainly constituted of LAB (such as *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp.) and *Brochotrix thermosphacta* has been associated with spoilage (15, 36). In cooked shrimps and CSS, the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* has been frequently isolated (21, 23, 55). This bacteria is able to grow and to reach high levels in products stored between 5 and 8°C (12, 25, 36, 37). Other pathogens such as *Salmonella* spp., *Vibrio* spp and *Staphylococcus* spp. can be found in shrimps, CSS (19, 23, 38, 51) or other RTE foods.

Although LAB are sometimes involved in the spoilage of RTE products, their preservative role is also widely recognized. It is explained by their production of different inhibiting compounds, including lactic acid, hydrogen peroxide, bacteriocins (48) and sometimes by a nutritional competition (40). Therefore LAB are very interesting candidates to be used for the biopreservation of food products (49). Biopreservation is a preservative method that uses the growth of selected microorganisms on a food product to control the undesirable (spoilage or pathogenic) microflora (46). This technology is thought to be used in the context of hurdle

technology, a concept combining several non aggressive preservatives to establish an additive antimicrobial effect, thus improving the safety and the sensory quality of food (31). Most of the studies performed to test the activity of biopreservative LAB in refrigerated meat products (9, 57) and fish products (8, 58) were focused on the activity against *Listeria monocytogenes*. Various genera have been proposed for these applications: *Carnobacterium* mostly in seafood (8), *Lactobacillus* (57) and *Leuconostoc* (9) in meat; *Lactococcus* are already used in dairy products (22, 41) and minimally processed vegetables (27). However, a low number of work concerns the inhibition of spoiling microflora in all these products.

The aim of this study was to evaluate the effect in two seafood products of seven previously isolated LAB strains that have shown inhibiting effect in model medium against a wide range of spoiling and pathogenic bacteria (35). The biopreservative potential as well as their spoiling activity were tested on cooked, vacuum-packed shrimps. Sensory analysis was carried out to determine if the selected strains inoculated on the product enhanced the sensory shelf life, while not being detected by the panelists in unspoiled products. The four strains showing the best sensory analysis results on shrimps were then tested on CSS following the same protocol. Challenge tests with LAB and the pathogenic bacteria *L. monocytogenes*, *V. cholerae* and *St. aureus* were also performed to determine whether the inhibiting activity recorded on agar plates are observed in a product.

Materials and methods

Strains and culture conditions

The seven LAB strains used in this study (*Leuconostoc gelidum* EU2213, EU2247 and EU2262; *Lactococcus piscium* EU2229 and EU2241; *Lactobacillus fuchuensis* EU2255 and *Carnobacterium alterfunditum* EU2257) have been previously selected and identified for their inhibiting capacities against pathogenic and spoiling flora of seafood products (35). These strains are part of the HURDLETECH Collection (Ifremer, Nantes, France) established during the European SEAFOODplus program.

Pathogenic strains used for challenge tests are: *Listeria monocytogenes* EU 2160 isolated from CSS (HURDLETECH collection); *Staphylococcus aureus* CIP 76.25 (Institut Pasteur, Paris, France) and *Vivrio cholerae* RF 184 isolated from raw shrimps (Ifremer, Nantes, France).

LAB and pathogenic strains were stored frozen in Elliker (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) or brain heart broth (Biokar) respectively, containing 10 % (v/v) glycerol (Panreac Quimicia SA, Barcelona, Spain) at -80°C . LAB strains were subcultured twice in Elliker broth at 15°C for 72 h before biopreservative assays. Pathogenic strains were subcultured twice in modified Elliker medium (without sucrose and with a final NaCl concentration of 2%) at 20°C for 24 h before inoculation assays.

Effect of LAB strains on the microbial and sensory quality of vacuum-packed shrimps and cold smoked salmon

Two batches of frozen shrimps were obtained from two different French manufacturers and named batch M and batch U. Batch M (*Penaeus vannamei*) was constituted of farmed, frozen, beheaded and peeled shrimps. They were cooked without previous thawing for 2 min 30 sec in boiling water with 20% salt (w/v). Batch U of wild shrimps (*Penaeus* spp.) were cooked in the same conditions for 4 min 30 sec, then beheaded and peeled. After cooking, both batches were put in melting ice (0°C) supplied with 10% salt for cooling.

Seven inhibiting LAB strains were tested during this experiment. Cells were pelleted and washed in the same volume of physiological water (1 g l⁻¹ tryptone [Biokar], 8.5 g l⁻¹ NaCl) and then diluted 1/20 in physiological water. Each LAB strain was inoculated separately in 500 g of shrimps of each batch by spraying both faces with 2% (v/w) of the diluted culture to obtain an estimated inoculation level of 5 log (CFU g⁻¹). For each batch of shrimps, a control

was prepared by spraying physiological water instead of LAB strain. Shrimps were then vacuum packed using a Multivac A300/16 machine (Hagenmüller, Wolfertschwenden, Germany) and 90µm thick PA/PE bags (Sacpo, St Méen le Grand, France). Each bag contained four to five shrimps, for a total weight of approximately 25 g. Samples were stored at 8°C for 28 days. Microbial analyses were performed at days 1, 7 and 28 and sensory analyses at day 7 and 28.

Farmed Norwegian vacuum-packed CSS freshly processed was bought from a local factory for biopreservation assays. Four LAB strains were tested during this experiment: *Lc. piscium* EU2229 and EU2241, and *Ln. gelidum* EU2247 and EU2262 using the same inoculation method as for the shrimp experiments. Samples were incubated 28 days under the following conditions: one week at 4°C, two weeks at 6°C and one week at 10°C, according to the French producer's recommendations for shelf life validation. Microbial analyses were carried out at days 0, 14 and 28 and sensory analyses were performed at day 14 and 28.

Challenge test for pathogenic flora

Previously frozen, beheaded and decorticated shrimps (*Penaeus vannamei*) were obtained from the same manufacturer as batch M, cooked as described above and named batch P.

Three pathogenic strains (*L. monocytogenes* EU2260, *V. cholerae* RF 184 and *St. aureus* CIP 76.25) were used during this experiment. The cells from three subcultures were washed in physiological water and a volume of *L. monocytogenes* was mixed with the same volume of *V. cholerae*. Six batches of shrimps were inoculated separately as described above with 1% (v/w) by a pathogenic culture (either *St. aureus* alone or a mixture of *L. monocytogenes* and *V. cholerae*), and one hour later with 1% (v/w) of a biopreservative LAB (*Lc. piscium* EU2241 or *Ln. gelidum* EU2247) or physiological water. The different combinations pathogenic/bioprotective bacteria are presented in Table 1. Shrimps were then vacuum packed and stored at 8°C for 4 weeks followed by one week at 20°C.

Table 1: Repartition of cultures inoculated on shrimps of batch P for challenge test against pathogenic flora

Sets of shrimps	<i>L. monocytogenes</i> + <i>V. cholerae</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Lc.</i> <i>piscium</i> EU2241	<i>Ln.</i> <i>gelidum</i> EU2247	Physiological water (negative control)
Set 1	X				X
Set 2	X		X		
Set 3	X			X	
Set 4		X			X
Set 5		X	X		
Set 6		X		X	

Microbiological analysis

At 1, 7 and 28 days of storage, shrimp samples from batches M and U were analyzed for microbiological content. Shrimps were aseptically diluted (1/5) in physiological water and crushed in stomacher 400 (Seward Medical, London, UK) for two minutes. After 25 minutes revivification at room temperature, total mesophilic flora was enumerated on spread plate count agar (PCA) (Biokar), LAB flora on spread Elliker plates (Biokar), total psychrotrophic fish flora on spread Long and Hammer plates (LH, 56) and finally Enterobacteriaceae were determined by pouring 1 ml of dilution in Caso plates (Merck, Darmstadt, Germany) covered with violet red bile glucose agar (VRBG, Oxoid LTD., Basingstoke, England). VRBG and PCA plates were incubated 72 hours at 30°C. LH plates were incubated 5 days at 15°C, and Elliker plates were incubated the same way, but in anaerobic conditions. All experiments were conducted in duplicate.

Pathogenic bacteria were enumerated weekly from batch P. *L. monocytogenes* was enumerated on Palcam agar plates according to NF EN ISO 11290-2 method. *V. cholerae* was enumerated on spread plates of Thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar plates (TCBS agar, Oxoid). *St. aureus* was enumerated on Baird-Parker agar plates (Biokar) according to AFNOR NF V 08-057-2 method. All experiments were conducted in triplicates.

Microbiology of inoculated CSS was analyzed. Just after the inoculation, levels of lactic acid bacteria were enumerated as described above. After 4 weeks of storage, *Lactobacillus* spp., *Brochothrix thermosphacta*, Enterobacteriaceae, total psychrotrophic viable count, yeasts and

moulds were enumerated according to method described by Leroi et al. (34). Total LAB were enumerated on spread Elliker agar plates.

Sensory analysis

The odor of CSS and shrimps was characterized by respectively 10 and 7 trained panelists according to a conventional profile (QDA) (ISO13299, 2003). Odor attributes used for smoked salmon description were selected and presented in previous studies (24, 50). For shrimp odor evaluation, thirteen descriptors were chosen after a procedure of selection of four step: (1) description of four different commercial shrimp samples, air or under vacuum packed; (2) analysis of the frequency of each criteria; (3) discussion with the panel to reach a consensus on attribute selection and definition; (4 training session on four samples stored 0 to 13 days at +4°C, followed by a discussion of the results with the panel.

Sensory sessions were performed in individual testing booths (ISO 8589, 1989) equipped with a computerized system using Fizz 2.30C software (Biosystèmes, Couternon, France). Panelists were required to score each descriptor on an unstructured scale anchored by the term low intensity (0) and high intensity (10). They received eight samples, seven inoculated with a strain and one control, in the case of shrimp; five samples, four inoculated and one control, in the case of CSS. Products were assigned 3 digit numbers, randomized and served simultaneously to the panelists, after 15 min at room temperature. At the end of the evaluation, panelists identified the level of spoilage of each sample: NS: non spoiled; LS: lightly spoiled; SS: strongly spoiled.

Data treatment

Summary statistics (mean, standard deviation, minimum, maximum), analysis of variance and Duncan's multiple range test were performed using Statgraphics Plus 3.1 software (Sigma Plus, Paris, France). The significant statistical level was set at $p < 0.05$. Principal component analysis (PCA) with standardization was performed on the means of the scores for each sensory descriptor. For levels of spoilage (NS, LS, SS) results were treated by a correspondence factorial analysis (CFA). Multivariate data processing was performed with Uniwin Plus 3.02 software (Sigma Plus).

Results

Implantation of inoculated LAB strains in shrimps and cold-smoked salmon

Initial endogenous LAB levels in the three batches of shrimps M, U and P (not inoculated) were below the detection level of 2.7 log (= 500 CFU g⁻¹). In inoculated samples, LAB levels were around 5 to 6 log (CFU g⁻¹) for each strain as expected. At day 7, LAB levels reached 4 log (CFU g⁻¹) in control samples of batches M and U and 7 log (CFU g⁻¹) on batch P whereas levels on all inoculated samples were around 9 log (CFU g⁻¹) indicating that the biopreservative LAB strain was dominant. At day 28, LAB levels in all samples (non-inoculated controls and inoculated samples) were between 8 and 9 log (CFU g⁻¹).

In cold-smoked salmon just after inoculation, LAB flora levels were around 6 log (CFU g⁻¹) as expected on inoculated samples, and around 5.3 log (CFU g⁻¹) for control sample. After 4 weeks of storage, LAB flora determined on Elliker agar was up to 7 log (CFU g⁻¹) in control sample, and between 7 and 8 log (CFU g⁻¹) in all the inoculated samples.

Effect of the inoculated LAB on sensory characteristics of shrimps (batches M and U)

Correspondence factorial analysis performed on the three levels of spoilage allowed to the separation on the first axis (64 % of total information) of strongly spoiled samples (right part of the figure 1) from non-spoiled samples (left part of the figure 1). Non-spoiled (upper part) and lightly-spoiled (lower part) were discriminated on the second axis (36% of the information). Control samples after 7 days of storage are located in the area of non-spoiled samples. Most of the inoculated samples at 7 days are located in the same area, except samples inoculated with strain *Lb. fuchuensis* EU2255 or *C. alterfunditum* EU2257 that were lightly spoiled. After 28 days of storage, control samples are located in the lightly spoiled (batch M) or strongly spoiled (batch U) part of the graph. *Ln. gelidum* EU2247 and EU2262 totally prevented batches U and M from spoilage, samples remaining in the left part of CFA. For batch U, samples inoculated with *Ln. gelidum* EU2213, *C. alterfunditum* EU2257 and in a lesser extent *Lc. piscium* EU2229 and EU2241 were less spoiled than the control. The same strains except EU2213 had also a positive effect on batch M but a little less pronounced probably because the control was not totally spoiled at the time of analysis. *Lb. fuchuensis* EU2255 did not reduce the spoilage whatever the batch considered.

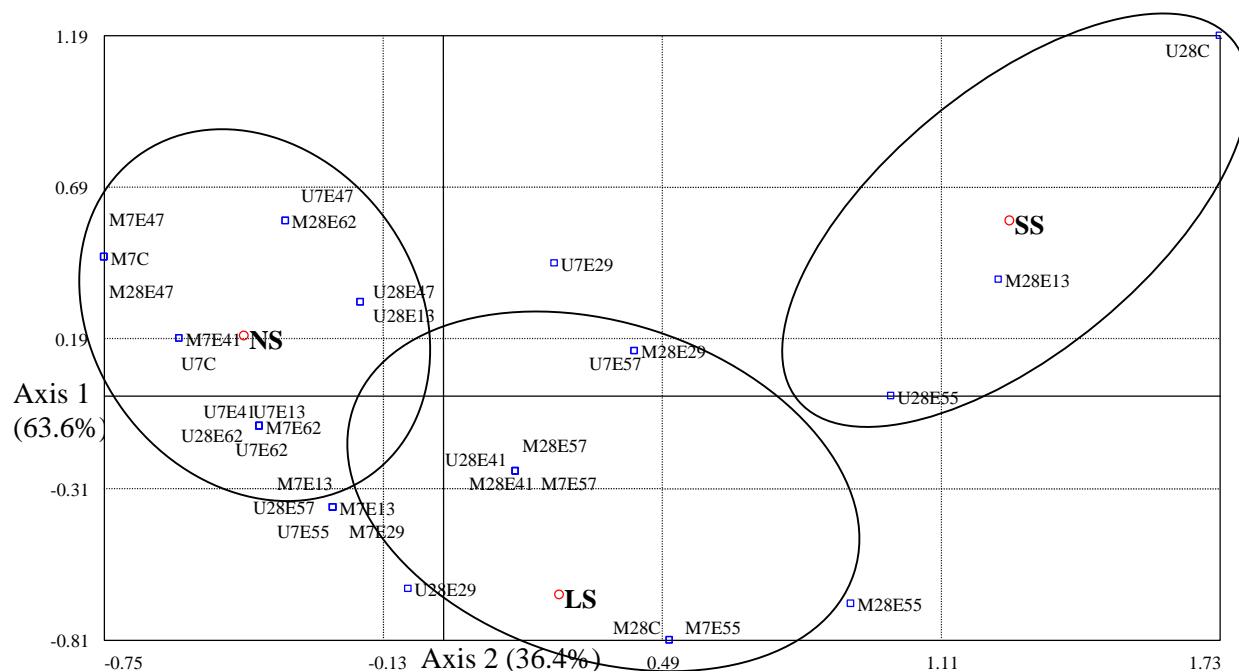


Figure 1: Simultaneous representation of samples and level of spoilage of vacuum-packed shrimps stored at 8°C on plane 1-2 of correspondence factorial analysis. NS: non-spoiled; LS: lightly spoiled; SS: strongly spoiled. Sample nomenclature: M-U: set M or U; 7-28: storage time in days; C: control samples; E13, E29, E41, E47, E55, E57, E62: samples inoculated with strains EU2213, EU229, EU2241, EU2247, EU2255, EU2257 and EU2262 respectively. U28E62: batch U, stored 28 days, inoculated by strain EU2262.

The scores of profiling tests were treated by a standardized principal component analysis and results were validated with analysis of variance and Duncan's multiple range test (data not shown). At day 7, control samples for both batches exhibited typical odors of non-spoiled samples i.e. rice/crustacean, boiled milk and surimi/sulphurous for batch M and rice/crustacean, surimi/sulphurous and roasted for batch U. Samples inoculated with *Lb. fuchuensis* EU2255 and *Cb. alterfunditum* EU2257 both exhibited spoiling odors of dried fish and floor cloth for batch U and M. The other samples were not significantly different from the control i.e. none of the *Lc. piscium* and *L. gelidum* strains produced particular off-odor in this matrix. After 28 days of storage, batch M (not inoculated) was lightly spoiled and characterized by rice/crustacean, yeast and sour/fermented off-odors and batch U (strongly spoiled) by high level of cheese/feet but also cabbage/gas and sour/fermented odors. Dominant sensory descriptor of each sample (control and inoculated) at day 28 are presented in Table 2. Odors in samples inoculated with strains that prevent spoilage were not different

from the respective unspoiled control at day 7. Strains that did not prevent from spoilage exhibited more or less the same off-odors than in naturally contaminated products (day 28) but sometimes particular off-odors such as cabbage/gas and floor cloth were produced (Table 2).

Table 2: Principal odour descriptors related to each inoculated sample of vacuum-packed shrimps from batch M and U after a vacuum storage of 28 days at 8°C.

Inoculated strain	Batch M	Batch U
Control	Rice / crustacean, yeast, sour / fermented	Cheese / feet, cabbage / gas, sour / fermented,
<i>Ln. gelidum</i> EU2213	fruity, cabbage / gas	Rice / crustacean, surimi / sulphurous
<i>Lc. piscium</i> EU2229	sour / fermented, cheese / feet	rice / crustacean, Seaweed / iodine-like
<i>Lc. piscium</i> EU2241	cheese / feet, sour / fermented	Cheese / feet, Floor cloth
<i>Ln. gelidum</i> EU2247	rice / crustacean, boiled milk	rice / crustacean, surimi / sulphurous
<i>Lb. fuchuensis</i> EU2255	cabbage / gas, cheese / feet	cheese / feet, cabbage / gas
<i>Cb. alterfunditum</i> EU2257	rice / crustacean	boiled milk, rice / crustacean
<i>Ln. gelidum</i> EU2262	rice / crustacean, boiled milk	rice / crustacean, surimi / sulphurous

Effect of four inoculated LAB strains on sensory properties of cold smoked salmon

Four strains showing preservative effect on shrimps were selected for an application in CSS. On the same model than the shrimp experiment, the CFA performed on the sensory analysis results allowed the separation of non-spoiled, lightly spoiled and strongly spoiled samples (data not shown). After two weeks of storage, the control sample was lightly spoiled, and strongly spoiled after 4 weeks. Samples inoculated by *Lc. piscium* EU2241 were the only ones scored as non-spoiled by the panel, both after 2 and 4 weeks of storage. *Ln. gelidum* EU2262 did not modify the spoilage level after 2 weeks but totally prevented it after 4 weeks. On the contrary, the sample inoculated by strain *Lc. piscium* EU2229 was non-spoiled after 2 weeks, but was strongly spoiled after 4 weeks. Samples inoculated with *Ln. gelidum* EU2247 were strongly spoiled both at week 2 and 4.

The PCA performed on the scores of profiling tests presents the main odor characteristics for each sample. Figure 2 shows the projection of the sample on the first 1-2 plane. The first axis

(50 % of the information) is mainly characterized by descriptors such as smoke and butter on one side, and cheese/feet, amine, acid/vinegar and sour/fermented on the other side. This component can be considered as an axis of spoilage, as it regroups odors typical of freshly processed CSS on the right side and spoiling off-odors on the left side. Rubber and blue cheese odors on the upper part of the graph and herring on the lower part mainly defined the second component (20% of the information). The characteristic off-odors of the lightly spoiled control at week 2 are rubber and blue cheese. After 4 weeks the control was highly spoiled and characterized by cheese/feet, amine, acid and sour odors. The sample inoculated with *Lc. piscium* EU2241 kept butter and smoke odors (right part of Figure 2) typical from fresh CSS, both at week 2 and 4, indicating a high preservation effect of this strain. At week 4, samples with *Lc. piscium* EU2229 and *Ln. gelidum* EU2247 were similar to the control with strong cheese/feet, amine, acid and sour off-odors. The sample inoculated by *Ln. gelidum* EU2262 was similar to the control at week 2 (rubber and blue cheese) but moved to the lower right part of PCA characterized by herring and smoke odors at week 4.

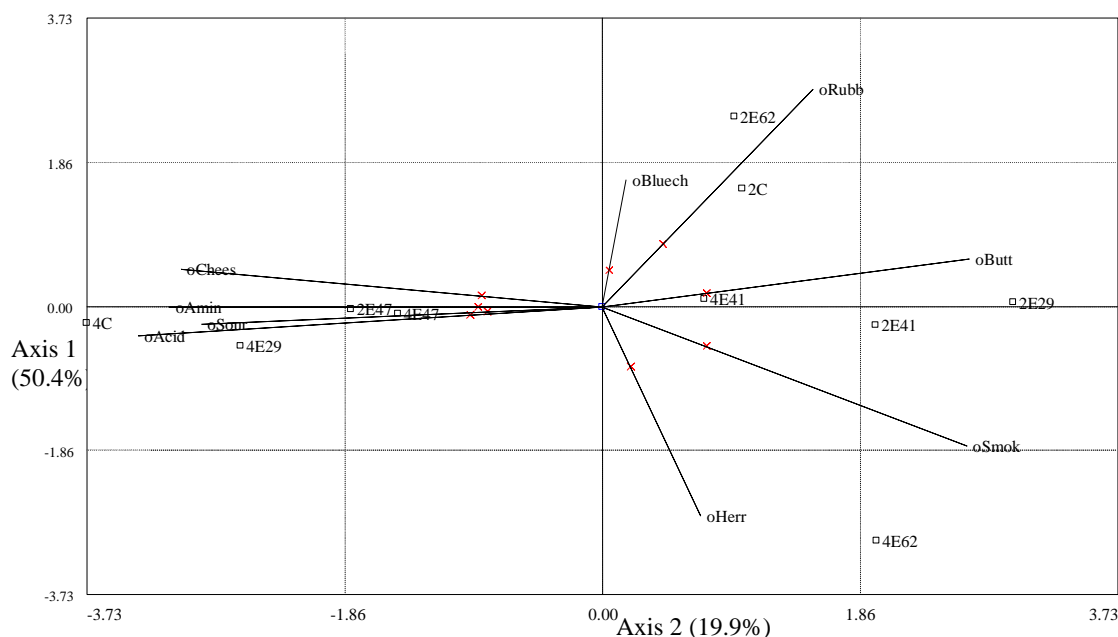


Figure 2: Simultaneous representation of cold-smoked salmon samples and odor descriptors on plane 1-2 of principal component analysis. Sample nomenclature: 2-4: storage time in weeks; C: control samples; E29, E41, E47, E62: samples inoculated with strains EU229, EU2241, EU2247 and EU2262 respectively. 2E41: 2 weeks storage, inoculated by strain EU2241.

Effect of inoculated LAB strains on endogenous flora of vacuum packed shrimps and cold-smoked salmon

At the beginning of the experiment, total mesophilic flora level in control sample of batch U was around 3.5 log (CFU g⁻¹), total psychrotrophic flora enumerated on LH agar was above 5.7 log (CFU g⁻¹) and Enterobacteriaceae levels was inferior to detection threshold of 1.7 log (= 50 CFU g⁻¹). The same results were recorded for control sample of batch M, except total mesophilic flora that was inferior to the detection threshold of 1.7 log (= 50 CFU g⁻¹). After 7 days of storage, total mesophilic flora on vacuum packed shrimps revealed no differences between control and inoculated samples for batches U and M (approx. 3-4 log (CFU g⁻¹), mean of 2 experiments), except for samples inoculated with *Lb. fuchuensis* EU2255, where count was 4 log (CFU g⁻¹) higher than in control. After 28 days of storage, total mesophilic flora in all samples reached 8 log (CFU g⁻¹), and no significant differences could be detected between control and inoculated samples. Due to unexpected rapid growth of psychrotrophic flora, counts were unreadable after 7 days of storage on LH agar. After 28 days of storage, all inoculated samples showed a level of psychrotrophic flora around 9 log (CFU g⁻¹), dominated by the bioprotective strains as their growth was possible on LH and they reached the same numbers on Elliker agar. Total psychrotrophic counts in control M and U were significantly lower ($p < 0.05$) by one log. After 7 days of storage, Enterobacteriaceae levels in batch M were above 5.7 log (CFU g⁻¹). In batch U, Enterobacteriaceae levels in all samples (control and inoculated) were around 4 log (CFU g⁻¹). After 28 days of storage, Enterobacteriaceae levels in all samples were approximately of 8 log (CFU g⁻¹). No differences were observed after 7 or 28 days of storage between Enterobacteriaceae levels in control and inoculated samples for each batch, except for samples inoculated with strain *Cb. alterfunditum* EU2257 where they were approximately 2 log (CFU g⁻¹) inferior to all other samples. However this inhibition could not be correlated with a sensory improvement of the product.

Microbial analyses were performed to evaluate the effect of inoculated LAB strains on the microflora of naturally contaminated CSS. After 4 weeks of storage, total psychrotrophic count reached 9 log (CFU g⁻¹). This psychrotrophic flora was probably mainly constituted of marine Gram-negative psychrotrophic bacteria, for which no specific culture medium is available, as all the other counts were far inferior : *Brochothrix thermosphacta* was below the detection threshold of 2.7 log, Enterobacteriaceae, count on Rogosa agar, total LAB and yeasts reached 4.5, 5.6, 6.4 and 7.1 log (CFU g⁻¹) respectively.

Although inoculated LAB strains can be enumerated on LH, their count on Elliker were always lower than total psychrotrophic count, and it was possible to observe an inhibitory

effect of the protective culture. Total psychrotrophic counts were lowered by approximately one log in samples inoculated with *Ln. gelidum* strains (EU2247 and EU2262) and 2 logs in samples inoculated with *Lc. piscium* strains (EU2229 and EU2241). Three inoculated LAB strains (*Lc. piscium* EU2229 and EU2241 and *Ln. gelidum* EU2247) totally inhibited the growth of Enterobacteriaceae, keeping them under the detection threshold of 1.7 log (= 50 CFU g⁻¹), whereas 7.1 log (CFU g⁻¹) were detected in the sample inoculated with strain *Ln. gelidum* EU2262, indicating a synergetic effect of this strain. An inhibition of yeasts by more than 2 logs was detected in the inoculated samples, excepted with *Lc. piscium* EU2241. A reduction of more than one log of Rogosa agar count was observed in samples inoculated with *Lc. piscium* strains. This medium supports the growth of bacteria from the genus *Leuconostoc*, so no conclusions can be made from the 2 samples inoculated with *Ln. gelidum* strains.

Effect of two biopreservative LAB strains on inoculated pathogenic bacteria in shrimps

Challenge tests against pathogenic bacteria were conducted for 2 biopreservative strains: *Lc. piscium* EU2241 and *Ln. gelidum* EU2247. *L. monocytogenes* levels at inoculation time were 2.6 ± 0.2 log (CFU g⁻¹) (figure 3a). After 7 days of storage, levels of *L. monocytogenes* on control sample and sample inoculated with strain *Ln. gelidum* EU2247 were equivalent whereas level on sample inoculated with strain *Lc. piscium* EU2241 was 2 log lower ($p < 0.05$). After 3 weeks of storage, *L. monocytogenes* levels reached their maximum 9.5 ± 0.05 log (CFU g⁻¹) and then remained constant. *L. monocytogenes* counts in co-inoculated samples were significantly reduced ($p < 0.02$) by 2 log compared to control sample, with a slightly better efficacy for strain *Lc. piscium* EU2241 and this reduction lasted till week 5.

St. aureus levels at inoculation time were 3.4 ± 0.3 log (CFU g⁻¹) (figure 3b). After one week of storage, the pathogen strain was inhibited by 1 log ($p < 0.01$) by *Lc. piscium* EU2241. Although mesophilic, *St. aureus* grew rapidly in control and reached 8.1 ± 0.6 log (CFU g⁻¹) at week 3 and then entered in stationary phase. After 3 and 4 weeks *St. aureus* count was reduced by both LAB strains, difference between control and inoculated sample being maximum with *Lc. piscium* EU2241 (2 log, $p < 0.02$). The temperature shift during the 5th week of storage induced an increase of the *St. aureus* levels in the samples inoculated with LAB strains which reached the same level than in the control.

V. cholerae counts at inoculation time were $2,0 \pm 0.3$ log (CFU g⁻¹). After 1, 3 and 4 weeks of storage at 8°C, no vibrio was detected on any sample. During week 5, after one week of temperature shift at 20°C, a rapid growth of more than 6 logs was noticed. The effect of LAB

could not be recorded as the level of vibrio was much higher than anticipated in control and inoculated samples, and the dilutions used for enumeration were inappropriate.

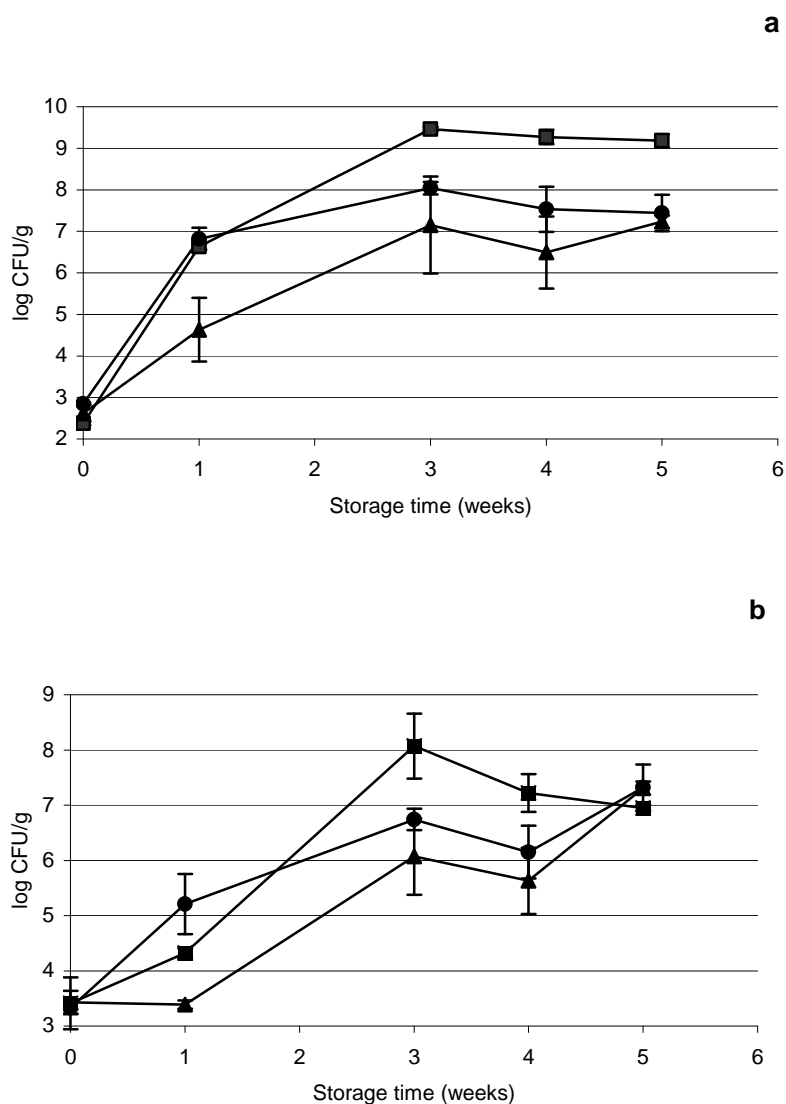


Figure 3: Evolution of *Listeria monocytogenes* (a) and *Staphylococcus aureus* (b) inoculated alone (■) or co-inoculated with LAB strains *Lactococcus piscium* EU2241 (▲) or *Leuconostoc gelidum* EU2247 (●) in vacuum-packed shrimps stored at 8°C. Error bars represent standard deviation.

Discussion

The LAB strains tested in this work were isolated from seafood products, and have shown promising inhibitory activity in Petri dishes (35) and liquid medium (unpublished data)

against various pathogenic and spoiling Gram-positive and Gram-negative strains. However, these capacities had to be tested in a food matrix in order to determine the interest of the strains for biopreservation processes. Sensory analysis on VP shrimps was performed at day 7, when control was supposed to be non spoiled and growth of bioprotective LAB high enough to test their spoilage potential. Then analysis was performed at days 28 when controls were spoiled to test the efficiency of LAB to delay the shelf-life.

Microbial counts (total psychrotrophic flora on LH medium, Enterobacteriaceae and LABs) in non-inoculated shrimps are consistent with data found in other studies (14, 15, 36, 37) or slightly higher (30). The endogenous LAB was the dominant flora at the end of the storage period in control samples. Although in a minority at the beginning of the experiment, Enterobacteriaceae grew on shrimps and reached 8 log (CFU g⁻¹) and 9 log (CFU g⁻¹) in control samples at day 28. Mejlholm et al. (2007) (37) have not found such level but products analyzed were different (cold-water shrimp packed under modified atmosphere) and that might explain those differences.

All the bioprotective inoculated LAB grew well on vacuum-packed shrimps and CSS at 8°C and rapidly reached 9 log (CFU g⁻¹), making them the dominant flora during the first weeks of storage. At the end of the storage, LAB levels on inoculated samples were 1 log (CFU g⁻¹) higher than in non-inoculated samples.

Leuconostoc gelidum were the best bioprotective strains tested in shrimps: two of the three tested strains (EU2247 and EU2262) totally prevented the spoilage apparition up to 28 days of storage for both batches U and M. This is a serious extension, considering that the shelf-life of this type of product is generally less than 2 weeks. Moreover, the panelists did not detect the presence of the strains, as no difference was observed at day 7 between control (non spoiled) and inoculated samples while LAB count was around 8 log (CFU g⁻¹). Strains from the genus *Leuconostoc* have already shown promising results for the biopreservation of meat products (9) but to our knowledge it has never been demonstrated in seafood products. Biopreservation assays with *Bifidobacterium breve* have been performed (1) in raw peeled shrimps, but no significant effect of the inoculated cultures on the shelf-life could be demonstrated. One *Leuconostoc* strain (EU2213) did not prevent spoilage of batch M. Variable spoiling effect among species and even strains is common (13, 33). However this strain extended shelf-life of batch U. Differences between batches may be due to variation in the spoiling microflora composition that still need to be identified.

Except for the rice/crustacean odor, characteristic odors for fresh and spoiled products varied depending on batches: boiled milk and surimi/sulphurous for freshly processed batch M, yeast

and sour/fermented when it was spoiled, surimi/sulphurous and roasted for freshly processed batch U and cheese/foot and cabbage/gas when it was spoiled. Few other sensory analysis data are available for shrimps. Laursen et al. (30) and Mejlholm et al. (37) have shown results quite similar to those presented in this study in terms of shelf-life for cold-water MAP shrimps. However the off-odors were different described at wet dog/ chlorine like and sour. The two *Lc. gelidum* EU2247 and EU2262 that extended the shelf-life didn't modify the characteristic odors of fresh shrimps. On the contrary, the most spoiled samples (inoculated with *Lb. fuchuensis* EU2255) released strong cabbage/gas of off-odors that were not detected in naturally contaminated products. Such odors have already been identified for many *Lactobacillus* strains in seafood products (50, 52). Unexpectedly, *Lb. fuchuensis* grew on PCA at 30°C which also makes this strain rejected for a biopreservative application as total endogenous mesophilic flora is a major indicator of hygienic quality during processing. *Cb. alterfunditum* EU2257 produced floor cloth and dried fish off-odors in both batches of shrimps after 7 days of storage. Laursen et al. (30) have observed that inoculation of shrimps by *Cb. divergens* or *Cb. maltaromaticum* strains at similar levels than in this study led to sensory rejection of the samples. However, the off-odors were slightly different (chlorine like). The spoiling status of *Carnobacterium* species varies according to studies and is still discussed (29). In naturally contaminated CSS for instance, high levels of *Carnobacterium* can be retrieved on non-spoiled products (19, 43) and did not lead to the spoilage when inoculated in CSS (8, 43, 50).

Four LAB strains (2 *Leuconostoc* and 2 *Lactococcus*) were selected for the same kind of experiment in CSS. After 14 and 28 days, strain *Lc. piscium* EU2241 had a strong preservative effect, with 2/3 of the panelists judging the sample non-spoiled and 1/3 lightly spoiled after 28 days whereas the control sample was considered as strongly spoiled. The other *Lc. piscium* strain (EU2229) also had a biopreservative effect at 14 days, that didn't last at day 28. Specific odors of samples inoculated with *Lactococcus* strains were typical of fresh product (butter, smoke), as can be found in the literature (32, 24). Few *Lactococcus* strains have been tested for the biopreservation of seafood products. In the study of Wessel and Huss (59) concerning *Lc. lactis* more emphasis was given to the bacteriocin production and the inhibition of *L. monocytogenes*. The two *Ln. gelidum* strains tested in this experiment were less effective to prevent the spoilage of the product. Biopreservative strategies have been conducted on cold smoked salmon (7, 17, 39, 60) but mostly against pathogenic bacteria such as *L. monocytogenes*. Concerning spoilage, most of the studies showed no protective effect of

the inoculated LAB strains on the product (8, 43) except one with a *Carnobacterium* spp. strain (32).

The comparison of the sensory analysis results of the two experiments (vacuum packed shrimps and CSS) suggests a strong incidence of the matrix on the biopreservative capacities of the strains: the *Ln. gelidum* strains were more protective than the *Lc. piscium* on vacuum packed shrimps, whereas opposite results were observed on CSS. The influence of the endogenous flora may also be predominant, as different results for different batches of the same products have already been observed (this study, 32). This suggests that biopreservative strategy should be designed specifically for each kind of product and even each factory.

In both studied products (vacuum packed shrimps and CSS), off-odors production was totally prevented for 28 days of storage at 8°C to 10°C when protective strains were used. However, it was not possible to correlate the sensory improvement with the microbiological analyses, despite the fact that specific spoiling flora strongly related with shelf-life were enumerated: enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta* and *Lactobacillus* (34). This lack of correlation has already been observed in CSS (19, 32). This is also consistent with the fact that spoilage of lightly preserved fish products such as CSS and shrimp is due to complex association of microorganisms (24, 30) and that no simple quality indicator is available for this kind of products. Einarsson et al. (18) have shown that purified bacteriocins (nisin Z and cell-free supernatant of *L. lactis* SIK-83) allowed extending significantly the shelf-life and in some cases correlation between sensory shelf-life and bacterial numbers (total mesophilic flora on PCA, incubated at 22 and 30°C) was observed.

Challenge tests were performed to investigate the ability of the selected strains to inhibit specific pathogenic strains. *L. monocytogenes* is a pathogen often associated with RTE foods and seafood (5, 23, 45). *Vibrio* species are a recurrent problem of the aquaculture industry in tropical water (20, 28). *Staphylococcus aureus* is a common post-contamination pathogen that can be found in shrimps. In case of temperature breakdown of the cold-chain, biopreservation may be a solution to inhibit the rapid growth of pathogens (36). *L. monocytogenes* and *St. aureus* strains inoculated on shrimps during this study grew well on the product but not *V. cholerae*. Vibrios are mesophilic strains that grow slowly at 4 or 8°C and biopreservation may only be necessary in case of a cold chain failure, as illustrated by the revivification of *V. cholerae* after 1 week at 20°C. The two biopreservative strains used in this experiment were *Lc. piscium* EU2241 and *Ln. gelidum* EU2247. *L. monocytogenes* was inhibited by the presence of both LAB strains. The maximum difference with the control sample was obtained with *Lc. piscium* and was around 2 log after 3 to 5 weeks. Matamoros et al. (35) have tested

the bacteriocin production of those strains amongst a collection of 14 spoiling and pathogenic bacteria isolated from seafood and shown that *Lc. piscium* EU2241 was not a producer whereas *Ln. gelidum* EU2247 (for which inhibition was less important) produced a bacteriocin active against *L. monocytogenes*. It is generally admitted that the bacteriocin production plays a major role in the inhibition of *L. monocytogenes* (16) and other pathogens (47) and inhibition of *L. monocytogenes* by bacteriocin producing LAB strains is well documented (2, 7, 39, 59). Inhibition in seafood matrix by a non bacteriocin producer has been more rarely demonstrated (40). Authorization for applying a bacteriocin producing LAB in a food matrix is much more complex than for a non-producer, so *Lc. piscium* EU2241 is a good candidate for biopreservation application. An inhibition of *St. aureus* was also recorded for both strains and was not due to a bacteriocin (35). A difference of 2 log after 3 and 4 weeks was observed between control samples and biopreserved samples. Inhibition of *St. aureus* strains has already been demonstrated in agar diffusion assays by *Lc. lactis*, *Enterococcus faecium* and *Ec. mundtii* strains producing bacteriocins isolated from seafood products (10). To our knowledge, this type of inhibition had never been demonstrated before in seafood products.

This study has shown the potential of five psychrotrophic LAB strains for the biopreservation of seafood products. These strains were from the *Ln. gelidum* and *Lc. piscium* species. Concerning pathogenic bacteria, we have demonstrated the ability of the protective LAB strains to inhibit the growth of *L. monocytogenes* and *St. aureus*. Inhibition could be due to bacteriocin production for *Ln. gelidum* EU 2247 but other mechanisms seem to be involved for *Lc. piscium* EU2241. The psychrotrophic LAB have shown biopreservative abilities against both pathogenic strains and spoilage, which had never been reported in seafood products. The use of these strains alone or in combination with other LAB strains like *Cb. divergens* V41 showing higher antilisterial effect (7) give interesting perspectives for the development of biopreservation technology in RTE seafood products.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the EU commission under the Integrated Project (IP) SEAFOODplus contract No. FODD-CT-2004-506359.

References

1. Al-Dagal, M. M. and W. A. Bazaraa. 1999. Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. *J. Food Prot.* 62(1): 51-56.
2. Alvarado, C., B. E. Garcia-Almendarez, S. E. Martin, and C. Regalado. 2005. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. *Curr. Microbiol.* 51(2): 110-115.
3. Anonymous. 2005. Le marché des crevettes. Office d'intervention dans le secteur des pêches et de l'aquaculture (OFIMER), France.
4. Anonymous. 2006. Commerce extérieur des produits de la pêche et de l'aquaculture. Office d'intervention dans le secteur des pêches et de l'aquaculture (OFIMER), France.
5. Ben Embarek, P. K. 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 23(1): 17-34.
6. Boisset, K. 2007. FAO GLOBEFISH, Shrimp Market Report - October 2007 - Europe. Available at <http://www.globefish.org/index.php?id=4300>.
7. Brillet, A., M. F. Pilet, H. Prevost, A. Bouttefroy, and F. Leroi. 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 97(5): 1029-1037.
8. Brillet, A., M. F. Pilet, H. Prevost, M. Cardinal, and F. Leroi. 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 104(3): 309-324.
9. Budde, B. B., T. Hornbaek, T. Jacobsen, V. Barkholt, and A. G. Koch. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *Int. J. Food Microbiol.* 83(2): 171-184.
10. Campos, C. A., O. Rodriguez, P. Calo-Mata, M. Prado, and J. Barros-Velásquez. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* 39: 356-364.
11. Cardinal, M., H. Gunnlaugsdottir, M. Bjoernevik, A. Ouisse, J.-L. Vallet, and F. Leroi. 2004. Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from

- European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Res. Int.* 37: 181-193.
12. Cornu, M., A. Beaufort, S. Rudelle, L. Laloux, H. Bergis, N. Miconnet, T. Serot, and M. L. Delignette-Muller. 2006. Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models. *Int. J. Food Microbiol.* 106(2): 159-168.
 13. Dalgaard, P. 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int. J. Food Microbiol.* 26(3): 319-333.
 14. Dalgaard, P. and L. V. Jorgensen. 2000. Cooked and brined shrimps packed in a modified atmosphere have a shelf-life of > 7 months at 0°C, but spoil in 4-6 days at 25°C. *Int. J. Food Sci. Tech.* 35: 431-442.
 15. Dalgaard, P., M. Vancanneyt, N. Euras Vilalta, J. Swings, P. Fruekilde, and J. J. Leisner. 2003. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 degrees C and 25 degrees C. *J. Appl. Microbiol.* 94(1): 80-89.
 16. Drider, D., G. Fimland, Y. Hechard, L. M. McMullen, and H. Prevost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(2): 564-582.
 17. Duffes, F., F. Leroi, P. Boyaval, and X. Dousset. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* 47(1-2): 33-42.
 18. Einarsson, H. and H. L. Lauzon. 1995. Biopreservation of Brined Shrimp (*Pandalus borealis*) by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2): 669-676.
 19. Gonzalez-Rodriguez, M. N., J. J. Sanz, J. A. Santos, A. Otero, and M. L. Garcia-Lopez. 2002. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int. J. Food Microbiol.* 77(1-2): 161-168.
 20. Gopal, S., S. K. Otta, S. Kumar, I. Karunasagar, M. Nishibuchi, and I. Karunasagar. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 102(2): 151-159.
 21. Gudmundsdottir, S., B. Gudbjornsdottir, H. Einarsson, K. G. Kristinsson, and M. Kristjansson. 2006. Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants. *J. Food Prot.* 69(6): 1304-1311.

22. Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J. Appl. Microbiol.* 98(6): 1316-1325.
23. Heinitz, M. L. and J. M. Johnson. 1998. The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *J. Food Prot.* 61(3): 318-323.
24. Joffraud, J. J., M. Cardinal, J. Cornet, J. S. Chasles, S. Léon, F. Gigout, and F. Leroi. 2006. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 112(1): 51-61.
25. Jorgensen, L. V. and H. H. Huss. 1998. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 42(1-2): 127-131.
26. Jorgensen, L. V., H. H. Huss, and P. Dalgaard. 2000. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 89(6): 920-934.
27. Kelly, W. J., R. V. Asmundson, and C. M. Huang. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *Int. J. Food Microbiol.* 33(2-3): 209-218.
28. Koonse, B., W. Burkhardt, 3rd, S. Chirtel, and G. P. Hoskin. 2005. Salmonella and the sanitary quality of aquacultured shrimp. *J. Food Prot.* 68(12): 2527-2532.
29. Laursen, B. G., L. Bay, I. Cleenwerck, M. Vancanneyt, J. Swings, P. Dalgaard, and J. J. Leisner. 2005. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Syst Appl Microbiol.* 28(2): 151-164.
30. Laursen, B. G., J. J. Leisner, and P. Dalgaard. 2006. *Carnobacterium* species : effect of metabolic activity and interaction with *Brochotrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3604-3611.
31. Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55(1-3): 181-186.
32. Leroi, F., N. Arbey, J. J. Joffraud, and F. Chevalier. 1996. Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon. *Int. J. Food Sci. Tech.* 31: 497-504.

33. Leroi, F., J. J. Joffraud, F. Chevalier, and M. Cardinal. 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* 39(1-2): 111-121.
34. Leroi, F., J. J. Joffraud, F. Chevalier, and M. Cardinal. 2001. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *J. Appl. Microbiol.* 90(4): 578-587.
35. Matamoros, S., M. F. Pilet, F. Gigout, H. Prevost, and F. Leroi. 2006. Selection of psychrotrophic bacteria active against spoilage and pathogenic microorganisms relevant for seafood products, p. 395-402. In J.B. Luten, et al. (eds.), *Seafood research from fish to dish*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
36. Mejlholm, O., N. Boknaes, and P. Dalgaard. 2005. Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *J. Appl. Microbiol.* 99(1): 66-76.
37. Mejlholm, O. and P. Dalgaard. 2007. Modeling and predicting the growth boundary of *Listeria monocytogenes* in lightly preserved seafood. *J. Food Prot.* 70(1): 70-84.
38. Mohamed Hatha, A. A., T. K. Maqbool, and S. Suresh Kumar. 2003. Microbial quality of shrimp products of export trade produced from aquacultured shrimp. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 213-221.
39. Nilsson, L., L. Gram, and H. H. Huss. 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot.* 62(4): 336-342.
40. Nilsson, L., T. B. Hansen, P. Garrido, C. Buchrieser, P. Glaser, S. Knochel, L. Gram, and A. Gravesen. 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J. Appl. Microbiol.* 98(1): 172-183.
41. O'Sullivan, L., B. O'Connor E, R. P. Ross, and C. Hill. 2006. Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *J. Appl. Microbiol.* 100(1): 135-143.
42. Olofsson, T. C., S. Ahrne, and G. Molin. 2007. The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7 degrees C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. *J. Appl. Microbiol.* 103(1): 109-119.
43. Paludan-Muller, C., P. Dalgaard, H. H. Huss, and L. Gram. 1998. Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-

- packed cold-smoked salmon stored at 5 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* 39(3): 155-166.
44. Rachman, C., A. Fourrier, A. Sy, M. F. De La Cochetiere, H. Prevost, and X. Dousset. 2004. Monitoring of bacterial evolution and molecular identification of lactic acid bacteria in smoked salmon during storage. *Lait.* (84): 145-154.
 45. Rocourt, J., C. Jacquet, and A. Reilly. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62(3): 197-209.
 46. Rodgers, S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures - a review. *Trends Food Sci. Technol.* 12: 276-284.
 47. Rodgers, S., P. Peiris, and G. Casadei. 2003. Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures. *J. Food Prot.* 66(4): 674-678.
 48. Ross, R. P., S. Morgan, and C. Hill. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79(1-2): 3-16.
 49. Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70(2-4): 331-345.
 50. Stohr, V., J. J. Joffraud, M. Cardinal, and F. Leroi. 2001. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Res. Int.* 34(9): 797-806.
 51. Su, Y. C. and C. Liu. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiol.* 24(6): 549-558.
 52. Truelstrup-Hansen, J., T. Gill, and H. H. Huss. 1995. Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Res. Int.* 28(2): 123-130.
 53. Truelstrup-Hansen, L. and H. H. Huss. 1998. Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. *Food Res. Int.* 31(10): 703-711.
 54. Truelstrup-Hansen, L., S. D. Rontved, and H. H. Huss. 1998. Microbiological quality and shelf life of cold-smoked salmon from three different processing plants. *Food Microbiol.* 15: 137-150.
 55. Valdimarsson, G., H. Einarsson, B. Gudbjornsdottir, and H. Magnusson. 1998. Microbiological quality of Icelandic cooked-peeled shrimp (*Pandalus borealis*). *Int. J. Food Microbiol.* 45(2): 157-161.

-
56. van Spreekens, K. J. A. 1974. The suitability of a modification of Long and Hammer's medium for the enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products. *Archiv fur lebensmittelhygiene*. 25: 213-219.
 57. Vermeiren, L., F. Devlieghere, and J. Debevere. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96(2): 149-164.
 58. Vescovo, M., S. Gianluigi, and C. Zacconi. 2006. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* 23: 689-693.
 59. Wessels, S. and H. H. Huss. 1996. Suitability of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiol.* 13(4): 323-332.
 60. Yamazaki, K., M. Suzuki, Y. Kawai, N. Inoue, and T. J. Montville. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *J. Food Prot.* 66(8): 1420-1425.

Résultats complémentaires

Effet des bactéries lactiques sur les odeurs des crevettes

Lors des tests sensoriels réalisés sur les crevettes inoculées ou non par les 7 souches de bactéries lactiques, des profils ont également été enregistrés avec 13 descripteurs d'odeur. Une analyse en composantes principales a été réalisée à partir de ces profils afin de représenter les odeurs typiques de chaque échantillon. La figure 8 montre la projection des échantillons sur le plan des axes 1 et 2, ce qui représente 45,5 % de l'inertie totale de l'analyse. La première composante est principalement définie par les descripteurs "riz", "algue" et "grillé" d'un côté (partie gauche de la figure), et "acide", "aigre" et "fromage/pied" de l'autre (partie droite). Cette composante peut être considérée comme un axe représentant l'altération et l'évolution des échantillons, de non altérés à fortement altérés. La deuxième composante est principalement définie par les descripteurs "levures" et "fruité" d'un côté (cadran haut) et "serpillière" et "poisson séché" de l'autre (cadran bas).

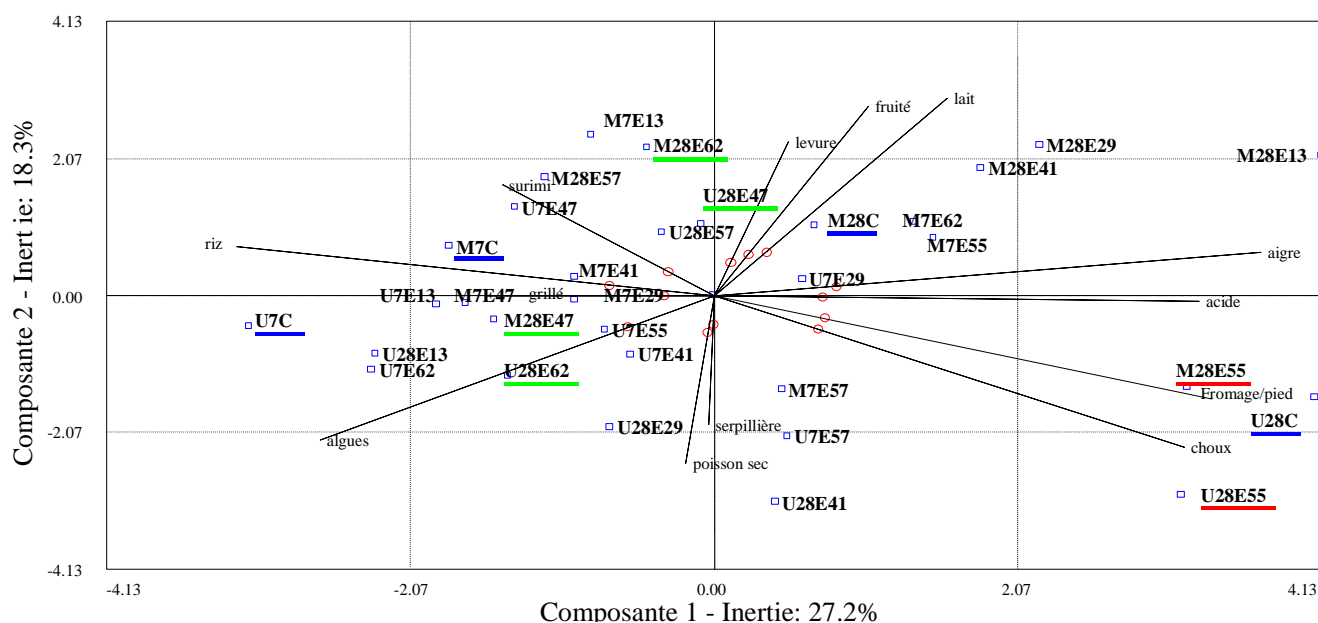


Figure 8 : représentation simultanée des échantillons de crevettes emballés sous vide et des descripteurs d'odeurs sur le plan 1-2 de l'analyse en composantes principales.

Etiquette des échantillons : M-U : lot M ou U ; 7-28 : nombre de jours de stockage avant analyse ; C : échantillon contrôle ; E13, E29, E41, E47, E55, E57, E62 : échantillons inoculés avec les souches EU2213, EU229, EU2241, EU2247, EU2255, EU2257 et EU2262 respectivement.

Les échantillons témoins non inoculés (soulignés en bleu dans la figure 8) à 7 jours sont localisés dans la partie gauche de la figure. Les odeurs dominantes sont "riz/crustacés", "grillé" et "algues/iode". Après 4 semaines de conservations, leurs odeurs se différencient. Le témoin du lot U est dominé par des odeurs de "fromage/pied", "choux/gaz" et "aigre/fermenté" tandis que pour celui du lot M on retrouve des odeurs "levure" et "aigre/fermenté". Pendant toute la durée de l'expérience (4 semaines), les échantillons inoculés avec les souches *Ln. gelidum* EU2247 et EU2262 (soulignés en vert) restent localisés dans la même zone que les échantillons témoins non altérés. Les notes de leurs odeurs de "riz/crustacés", "lait bouilli", "surimi/soufre" ou "serpillière" ne varient pas au cours du temps, ce qui suggère un effet protecteur de ces souches. Après 28 jours de conservation on peut observer dans la partie droite de la figure que les échantillons pour lesquels la souche *Lb. fuchuensis* EU2255 a été utilisée (soulignés en rouge) développent des odeurs "aigre/fermenté", "chou/gaz" et "fromage/pied". Cette évolution est plus rapide pour le lot M, dans la mesure où l'odeur "aigre/fermenté" est déjà présente dès le jour 7 pour cet échantillon (M7E55). La souche EU2241 ne semble pas diminuer l'altération à 28 jours, sans toutefois obtenir des notes comparables à la souche EU2255, notamment pour l'odeur "chou/gaz". L'effet des souches *Ln. gelidum* EU2213 et *Lactococcus* sp. EU2229 semble varier en fonction de la matière première utilisée. Pour le lot M, les échantillons inoculés avec la souche EU2213 présentent des notes de riz et de lait après 7 jours de conservation, et des odeurs intenses "aigre" et "chou" après 28 jours. Pour le lot U en comparaison, les échantillons conservent leurs caractéristiques initiales tout au long de l'expérience. Comme pour la souche EU2213, la souche EU2229 semble avoir un effet altérant plus prononcé sur les échantillons du lot M : après 28 jours le produit apparaît tout à droite de la figure, proche de la composante aigre. Enfin les échantillons inoculés avec la souche *Cb. alterfunditum* EU2257 sont les seuls à présenter une évolution du bas de la figure après 7 jours (odeurs de serpillière et poisson séché) vers le haut après 28 jours (odeur de riz). Cet effet est plus marqué pour le lot M.

Effet des bactéries lactiques sur les paramètres biochimique des crevettes

Les concentrations en azote basique volatil total (ABVT) et en triméthyle amine (TMA) ont été mesurées dans 2 échantillons de crevettes du lot P inoculés avec les souches *Lactococcus* sp. EU2241 ou *Ln. gelidum* EU2247 ainsi qu'un échantillon témoin non inoculé. Les mesures ont été effectuées en double juste après inoculation (J0), après 21 (J21) et 28 jours (J28) de conservation selon la méthode de microdiffusion de Conway (Conway & Byrne, 1933)

A J0 et J21 les concentrations d'ABVT et de TMA étaient faibles pour les trois échantillons analysés, avec des valeurs d'environ 1 mg d'azote pour 100 g de produit. A J28 la concentration d'ABVT a significativement augmenté dans l'échantillon témoin (21,5 mg/100g), alors que la concentration de TMA est restée faible (3 mg/100g). Des valeurs similaires ont été mesurées dans les échantillons inoculés avec la souche *Lactococcus* sp. EU2241. A l'inverse la souche *Ln. gelidum* EU2247 provoque une augmentation des concentrations à J28, avec des valeurs d'ABVT et de TMA de respectivement 41,1 et 10,6 mg/100g. Cette activité de la souche *Ln. gelidum* EU2247 est peut être corrélée avec l'augmentation de la durée de conservation observée en analyse sensorielle, mais les mécanismes devront être éclaircis.

Chapitre III

Caractéristiques de croissance et mécanismes
d'adaptation au froid d'une bactérie lactique
psychrotrophe.

Publication 4 :

Growth characteristics and cold adaptation mechanisms of *Lactococcus piscium*
EU2241, a psychrotrophic lactic acid bacterium isolated from seafood products

S. Matamoros, H. Prévost, F. Leroi and M.F. Pilet

Article en préparation

Introduction

La biopréservation est une méthode de conservation qui s'applique en général en combinaison avec d'autres techniques, dont la plus courante est la réfrigération. Il faut donc que les bactéries sélectionnées présentent des aptitudes pour la croissance à basse température afin d'entrer en compétition avec la flore pathogène ou d'altération de ces produits qui est majoritairement psychrotrophe. Si les mécanismes d'adaptation au froid ont été étudiés de manière approfondie chez des bactéries telles que *E. coli* ou *B. subtilis*, de nombreux aspects restent encore à élucider chez les bactéries lactiques. Six protéines de choc froid (cold shock proteins : CSP) ont été identifiées chez *Lactococcus lactis* (Wouters *et al.*, 1999a), et d'autres chez *Streptococcus thermophilus* (Wouters *et al.*, 1999b), *Lactobacillus delbrueckii* (Serror *et al.*, 2003) et *Lb. plantarum* (Mayo *et al.*, 1997). La plupart des études menées sur l'adaptation au froid a porté sur le choc froid (passage rapide de la température optimale de croissance à une température suboptimale) et non sur la croissance à basse température.

La souche bioprotectrice *Lactococcus* spp. EU2241 a été sélectionnée pour cette étude car elle présentait une croissance à 15°C mais pas à 30°C. Dans le but de caractériser son comportement en fonction de la température, sa croissance a été testée de manière plus précise entre 0 et 29°C. Des mesures de densités optiques ont été réalisées lors de la croissance grâce à l'appareil de mesure automatique Bioscreen C, et les taux de croissance ont été calculés par la méthode des dilutions successives selon la méthode proposée par Augustin *et al.* (1999). Il est ensuite possible de déduire les températures cardinales (optimale, maximale et minimale) à partir de ces valeurs. Les mécanismes moléculaires d'adaptation aux basses températures ont ensuite été analysés par une approche protéomique. La souche *Lactococcus* spp. EU2241 a été cultivée à température optimale de croissance et à une température suboptimale (20°C sous la température optimale) et son protéome analysé par électrophorèse bidimensionnelle. La localisation des CSP de bactéries lactiques sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle est bien connue grâce aux travaux déjà réalisés sur ce sujet (Wouters *et al.*, 1999a ; Wouters *et al.*, 1999b). Leur poids moléculaire est d'environ 7 kDa pour un pI compris entre 5 et 6. Une attention particulière a donc été portée aux protéines de cette région de manière à identifier une éventuelle protéine surexprimée pendant la croissance à basse température. Des analyses génétiques ont ensuite été menées de manière à identifier le ou les gènes correspondants.

Principaux résultats

La mesure de la croissance de la souche *Lactococcus* spp. EU2241 a permis de mettre en évidence des caractéristiques très inhabituelles pour une bactérie lactique. La température maximale de croissance est de 28°C, la température optimale de 26°C et la température minimale inférieure à 0°C. Les taux de croissance à ces températures sont de 0,607 h⁻¹ à 26°C ($G_{26} = 1 \text{ h } 11 \text{ min}$), 0,327 h⁻¹ à 28°C ($G_{28} = 3 \text{ h } 03 \text{ min}$) et 0,024 h⁻¹ à 0°C ($G_0 = 28 \text{ h } 31 \text{ min}$). De plus la souche EU2241 a montré une forte sensibilité à la chaleur, avec une mort cellulaire rapide en cas de passage rapide d'une culture de la température optimale à une température de 30°C.

Des cultures de la souche EU2241 ont été réalisées à température optimale de croissance (26°C, condition standard) et à 5°C. Le protéome de la souche a été comparé dans les deux conditions par électrophorèse bidimensionnelle. De cette manière, 12 spots ont montré une expression différente à 5°C par rapport à la condition standard, 4 étant sous-exprimés et 8 sur-exprimés. Parmi ces 8 spots, le plus fortement induit par la croissance à basse température (plus de 5 fois plus) est situé dans la région du gel précédemment décrite comme étant susceptible de contenir des CSP.

Ce spot a été excisé du gel et sa séquence peptidique a été déterminée par chromatographie liquide et double passage en spectrométrie de masse (LC/MS-MS). Cette analyse a permis de montrer une forte similarité (supérieure à 60%) avec des protéines de choc froid provenant d'autres bactéries lactiques telles que *Lc. lactis* ou *Lactobacillus plantarum*.

Afin de caractériser plus précisément cette protéine, des amorces de PCR ont été dessinées à partir de régions consensus entre la séquence peptidique et celles d'alignement de protéines similaires. L'obtention d'un premier fragment correspondant au gène ciblé a permis de mettre en œuvre une stratégie de PCR inverse. Un fragment de 350 pb a ainsi été amplifié et séquencé. Ce fragment contient une phase ouverte de lecture (ORF) partielle de 162 pb codant pour une protéine de 54 acides aminés. Cette protéine contient les deux domaines RNP1 (KGFGFI) et RNP2 (VHVHF) caractéristiques des CSP. Ces domaines sont nécessaires à la fixation de la protéine sur les acides nucléiques, et sont donc essentiels pour son rôle de chaperonne pour l'ARN et l'ADN. Enfin, cette protéine montre un pourcentage d'identité de

85%, 84 et 81% respectivement avec les protéines de choc froid identifiées chez *Enterococcus faecium*, *Ec. faecalis* et *Lc. lactis*. Cette protéine a été nommée CspE en raison de sa forte similarité avec la protéine du même nom chez *Lc. lactis*.

**Growth characteristics and cold adaptation mechanisms of *Lactococcus piscium*
EU2241, a psychrotrophic lactic acid bacterium isolated from seafood products**

S. Matamoros¹⁻², H. Prévost¹ F. Leroi², and M.F. Pilet^{1*}

1: UMR INRA 1014 SECALIM ENVN-ENITIAA, ENITIAA, Nantes, France

2: Département de Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, Nantes, France

*Corresponding author: M.F. Pilet, UMR INRA 1014 SECALIM ENVN-ENITIAA,
ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP82225, 44322 NANTES cedex 3, France (e-mail:
pilet@enitiaa-nantes.fr, Phone: +33 2 51 78 55 23)

Abstract

Adaptation to growth at low temperature was studied in the psychrotrophic lactic acid bacterium *Lactococcus* sp. EU2241. Growth rates were determined every 3°C from 0 to 23°C and every 1°C from 23 to 30°C using the automated optical density (OD) reader Bioscreen C. Thus, it allowed to determine an optimum growth temperature of 26 °C for this strain and a maximum growth temperature of 28°C, with a minimum below 0°C. Growth was recorded at 0°C with a growth rate of 0.024 h⁻¹ (generation time : 28 h 31 min), but not at 29°C or higher. Rapid decrease in cell number was observed when culture were shifted from 26 to 30°C. The protein production of strain EU2241 was investigated by two dimensional electrophoresis in order to identify the peptides involved in the cold growth process. Total cytoplasmic proteins from cultures grown at optimum temperature (26°C) and cultures grown at suboptimal temperature (5°C) were compared. A spot corresponding to molecular mass weight and pI previously described as typical for cold shock proteins (CSP) was overexpressed more than 5 times at 5°C. The protein was extracted from the gel and sequenced. The resulting peptide sequence showed high similarity (more than 60%) with CSP from other LABs. An inverse PCR strategy confirmed the presence of a putative *csp* gene, close to similar genes from other lactic acid bacteria. The deduced protein showed 85, 84 and 81% identity with cold shock proteins from *Enterococcus faecium*, *Ec. faecalis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are part of many food process, and have currently been the target of many researches on biopreservation. Biopreservation is a preservative technique which consist in inoculating inhibiting LAB strains in a product in order to limit the growth of pathogenic and spoiling bacteria. Biopreservation can be part of the hurdle technology (Leistner, 2000) and is very likely to be used in combination with other soft preservative methods such as refrigeration. For that reason the growth of selected LAB strains to be used as biopreservative agents, must be effective at refrigerated temperatures. Lactic acid bacteria are known to be mesophilic or psychrotrophic, with optimum growth temperature around 30°C, and minimum growth temperature as low as 0°C (van de Guchte *et al.*, 2002). Psychrotrophic lactic acid bacteria have previously been selected for biopreservative experiments (Duffes *et al.*, 1999 ; Yamazaki *et al.*, 2003 ; Altieri *et al.*, 2005 ; Weiss & Hammes, 2006). However, all these strains were capable of growing at 30°C. In a precedent study, we have isolated inhibiting lactic acid bacteria from seafood products that are able to grow at 15°C and not at 30°C (Matamoros *et al.*, 2006). Few lactic acid bacteria showing no growth capabilities above 30°C have been described so far: *Lactobacillus algidus*, isolated from refrigerated beef (Kato *et al.*, 2000) and two species of *Carnobacterium* isolated from an Antarctic lake, *Cb. funditum* and *Cb. alterfunditum* (Franzmann *et al.*, 1991). The mechanism of cold stress response for bacteria has been extensively studied. When suddenly placed in a cold environment, most bacteria develop a specific stress response (for review: van de Guchte *et al.*, 2002; Horn *et al.*, 2007). This response is generally characterized by the synthesis of a set of proteins called the cold induced proteins (CIPs). Among these CIPs is a family of low molecular mass proteins (around 7 kDa) called cold shock proteins (CSPs). The CSPs have been first identified as part of the cold shock response of *Escherischia coli* (Jones *et al.*, 1987), but since then the presence of proteins of this family have been demonstrated in numerous other bacteria such as *B. subtilis* (Graumann & Marahiel, 1999), *Lactococcus lactis* (Chapot-Chartier *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 1998), *Streptococcus thermophilus* (Wouters *et al.*, 1999b), *Lb. delbrueckii* (Serror *et al.*, 2003) and *Lb. plantarum* (Mayo *et al.*, 1997). The members of the CSP family show high similarity with the region called cold-shock domain of the eukaryote Y-box proteins, including the human YB-1 protein (Yamanaka *et al.*, 1998). The presence of binding sites for nucleic acids suggest a primary role as RNA chaperones (Schröder *et al.*, 1995 ; Jiang *et al.*, 1997). They prevent the formation of secondary structures

in mRNA due to low temperature, and thus facilitate the translation process (Phadtare, 2004). If the role of these proteins is now well characterized for mesophilic bacteria submitted to cold shock, their role in the adaptation to grow at cold temperature for psychrotrophic bacteria has not been reported..

The aim of this work was to characterize the growth parameters and cold adaptation response of one strain of biopreservative lactic acid bacteria previously isolated from refrigerated food products (Matamoros *et al.*, 2006). Growth rates were determined between 0 and 30°C, and cardinal temperatures were deduced. Analysis of the cold adaptation response was characterized by a proteomic approach during growth at suboptimal temperature. A gene encoding a protein possibly involved in the cold stress response was identified and sequenced.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Lactococcus spp. EU2241 was cultured in modified Elliker medium (mELK): 20 g/l tryptone (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), 5 g/l yeast extract (Biokar), 2.5 g/l gelatin (Panreac Quimicia SA, Barcelona, Spain), 7.5 g/l lactose (Merck, Darmstadt, Germany), 7.5 g/l glucose (Merck), 1.5 g/l sodium acetate (Merck), 0.5 g/l ascorbic acid (Merck), 20 g/l sodium chloride (Merck), pH adjusted at 6.8 with 10 M NaOH (Merck) before sterilization. Strain were stored at -80°C in mELK containing 10% glycerol (Panreac Quimicia). Pre-cultures were prepared by inoculating mELK at 1% with frozen strain followed by incubation at 15°C for 24 h.

Bioscreen C experiment

Experiments were performed as described by (Augustin *et al.*, 1999). Modified Elliker was inoculated at 5% (v/v) with the pre-culture of strain EU 2241. Eight half-dilutions were prepared from this suspension, and 200 μl of the suspension and of each half-dilutions were placed in the wells of honeycomb sterile plate. The tenth well of the series was filled with 200 μl of sterile medium as a negative control. The plates were placed in the Bioscreen C (Labsystem, Labsystem France SA, Les Ulis, France) and incubated at constant temperature. Incubation temperatures were 0, 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28 and 29°C . OD measurement at 600 nm was performed automatically every 20 min after a 10 s shaking and recorded until all cultures have reached stationary phase by the software Research Express v1.05 (Transgalactic Ltd., Helsinki, Finland).

Estimation of growth rate from OD measurements

The detection time of all curves were determined using Matlab (The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA) at an OD value of 0.3 (middle of the exponential phase). Detection times were plotted in Excel (Microsoft Corporation) against the neperian logarithm of the inoculum value : $\ln(N_i)$. Linear regression of the resulting curve calculates the maximum growth rate μ_{\max} . Generation time can then be calculated by the formula :

$$(1) T_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}.$$

Survival at 30°C

In order to test cell survival at 30°C, viable count experiment were performed as followed: 100 ml mELK flasks were inoculated at 1% (v/v) with 24 h subcultures. Flask were incubated at 26°C until OD₆₀₀ reached a value of 0.5. Cultures were then centrifuged, and resuspended in 100 ml of fresh medium. Flasks were then incubated at 30°C. Viable count were determined by pouring decimal dilutions in tryptone-salt (1 ml culture in 9 ml physiological water : 1 g l⁻¹ tryptone [Biokar Diagnostics, Beauvais, France], 8.5 g l⁻¹ NaCl [Merck, Darmstadt, Germany]) on Elliker agar plates (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) incubated at 15°C at inoculation time, when OD reached 0.5 after resuspension in fresh medium and transfer at 30°C, and every 24 h after the beginning of incubation at 30°C. OD measurement were performed in parallel. All experiments were performed in triplicate.

Growth at suboptimal temperature

Cold adaptation mechanisms were investigated during growth at suboptimal temperature. 100 ml mELK flasks were inoculated at 1% (v/v) with 24 h subcultures and incubated at 5°C or 26°C for control conditions until OD₆₀₀ reached 0.5.. Cells were pelleted by centrifugation 30 min at 6000 g, then washed in 100 ml of 10 mM sterile sodium phosphate buffer pH 7 (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany). Washed cells were pelleted and stored at – 80°C until protein extraction.

2D electrophoresis

Total cellular proteins were extracted from culture pellets by sonication with a Vibracell 72434 (Bioblock Scientific, Illkirch, France), 5 treatments of 15 sec sonication at 10 W and 45 sec waiting during 5 min. Samples were cooled in ice between treatments. Cell debris were pelleted by centrifugation at 21000 g during 40 min at 4°C. The protein content of the supernatant was determined by the Bradford method with a DC protein assay kit (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) as recommended by the supplier. Equal amounts of proteins (600 µg) were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (2D-EF). Proteins were precipitated in acetone for at least one night. Prior to loading on first dimension strips, the samples were rehydrated 30 min on ice in a buffer composed of urea 7 mol l⁻¹ (Sigma), thio-urea 2 mol l⁻¹ (Sigma), 4 % CHAPS (ICN Biomedical, Orsay, France), 0.25 % Triton 100X (Sigma), 0.4 % Biolyte 3/10 (Biorad), and dithithreitol 28 µg ml⁻¹ (Sigma). The total volume (250 µl) was loaded on a 11 cm isoelectric focusing gel strip with a linear isoelectric point (pI) range from 4 to 7 (Biorad). The gel and proteins were rehydrated overnight at 20°C under

a constant voltage of 50 V. First dimension migration was performed during 6 h with a voltage of 6000 V h⁻¹. For the second dimension, 16 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels were used.

The gels were stained overnight in a 0.1 % comassie blue solution, then discolored in a 20 % ethanol and 10 % acetic acid solution. They were then scanned with a GS-800 densimeter (Biorad) and analyzed using PDQuest software (Biorad). Five repetitions were made for each conditions.

Protein identification was performed by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS) and peptide sequences identification was obtained by data treatment with FASTS software (Mackey *et al.*, 2002).

Identification of a CSP gene

A degenerated nucleotide sequence of the corresponding gene from the sequenced protein was obtained by reverse transcription using internet-based program Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000). Gene sequences of proteins showing the highest similarity with the sequenced protein were retrieved from online databases and compared to our sequence using the multalin program (Corpet, 1988). PCR primers were designed from the conserved regions of these sequences: cspD1-f: 5'-GGCAAATGGAACAGTAAAATGG-3'; cspD3-r: 5'-TCCATCAGATTGGATTGCTGAG-3'. PCR reactions were performed in a PTC-100 thermocycler (MJ-Research) in a total volume of 50 µl containing 1X PCR buffer, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 1 µg ml⁻¹ DNA, 0.8 µmol l⁻¹ each primer, 0.2 mmol l⁻¹ (each) dNTP and 1U Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Hitchin, UK). Amplification consisted of a first cycle of 5 min at 94°C followed by 35 cycle of a 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, 1 min at 72°C and 5 min of final extension at 72°C. Negative controls containing no DNA template were included in parallel. The nucleotide sequence of the amplified gene fragment was determined with an ABI 370 automated sequencer using the Taq Dye-Deoxy TM terminator cycle sequencing method (Genome Express company, Meylan, France) and the cspD1-f and cspD3-r primers. Anticipated errors of PCR and sequencing reactions were avoided by sequencing both DNA strands. Sequence was then compared to databases using the nucleotide-nucleotide BlastN program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), (Altschul *et al.*, 1997).

Contiguous parts of the gene were identified using a inverse-PCR strategy. Twelve restriction enzymes were used to digest total DNA of strain EU2241 : EcoRI, Sall, EcoRV, BsmAI, NcoI, DpnI, BspHI, XhoI, MseI, HindIII, HaeIII and HhaI (Biolabs). None of these enzymes cut inside the previously identified gene fragment. Digestions were performed as

recommended by the supplier in a mix containing 10 µg of DNA, 20 U of restriction enzyme, 4 µl of 10X enzyme buffer, 0.4 µg of BSA when necessary and water adjusted to a final volume of 40 µl. Reaction mixes were incubated 3 h at 37°C (except for BsmAI mix incubated at 55°C) followed by inactivation of the enzymes at 65°C during 20 min. Ligation reactions of the digested products were performed overnight at room temperature (20°C) in a mix containing the previous digestion mix (40 µl), 800 U of T4 DNA ligase, 40 µl of 10X T4 buffer and water adjusted to a final volume of 400 µl. After isopropanol precipitation, PCR amplification was performed as described above using reverse primers Icq1f (5'-CGAAGCCTTTTTTCAGCGTTA-3') and Icq2r (5'-TCATCACTGGTCAGACGGAA-3') and 2 µl of re-circularized DNA as a template. Amplification products were separated on 1.5 % (w/v) agarose gel and were subsequently visualized by UV illumination after ethidium bromide staining. Positive PCR products were cloned using an Invitrogen pcrII-TOPO-TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and sequencing was performed as described above using primers M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') and M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3').

RESULTS

Growth rate in function of temperature

According to optical density measurements, optimum growth temperature for strain EU2241 was 26°C with a maximal growth rate $\mu_{\max 26} = 0.5921 \text{ h}^{-1}$ ($G_{26} = 1 \text{ h } 11 \text{ min}$). At 5°C, the maximal growth rate of strain EU2241 was 0.071 h^{-1} ($G_5 = 9 \text{ h } 45 \text{ min}$). Growth was recorded at 0°C, with a maximal growth rate $\mu_{\max 0} = 0.0243 \text{ h}^{-1}$ ($G_0 = 28 \text{ h } 31 \text{ min}$). Maximal growth rate in function of temperature is presented in figure 1.

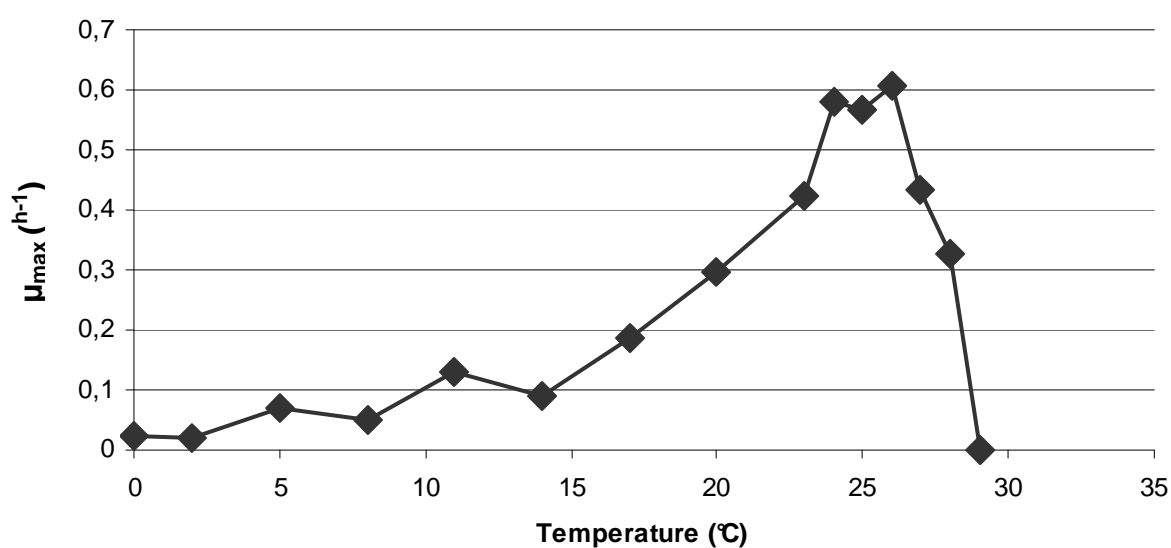


Figure 1: Maximal growth rate of strain EU2241 in function of temperature.

No growth was recorded at 29°C or above during Bioscreen C experiments. Live cultures grown at 26°C until $\text{OD}_{600} = 0.5$ ($3.9 \times 10^7 \text{ UFC/g}$) and then incubated at 30°C showed a stable number of viable cells during 24 h, and then a brutal decrease of cell viability as no colony was detected after 48 h. OD measurements with Bioscreen C also showed a decrease suggesting that cell lysis occurred (figure 2).

Temperature did not affect final OD value (0.6), except at 2 and 0°C where it decreased to 0.25.

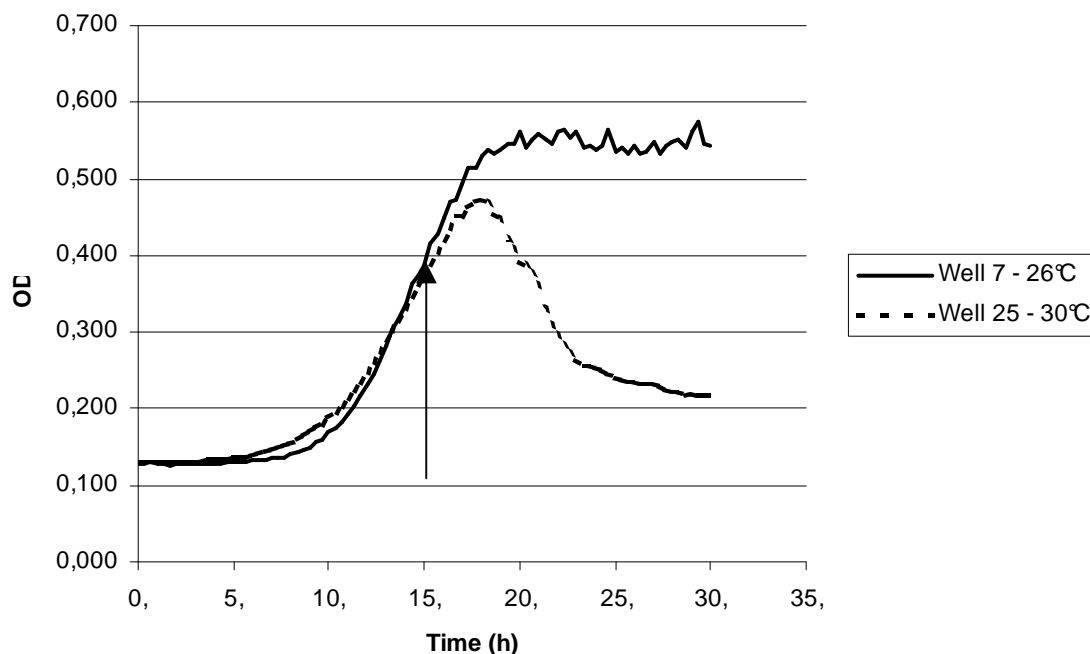
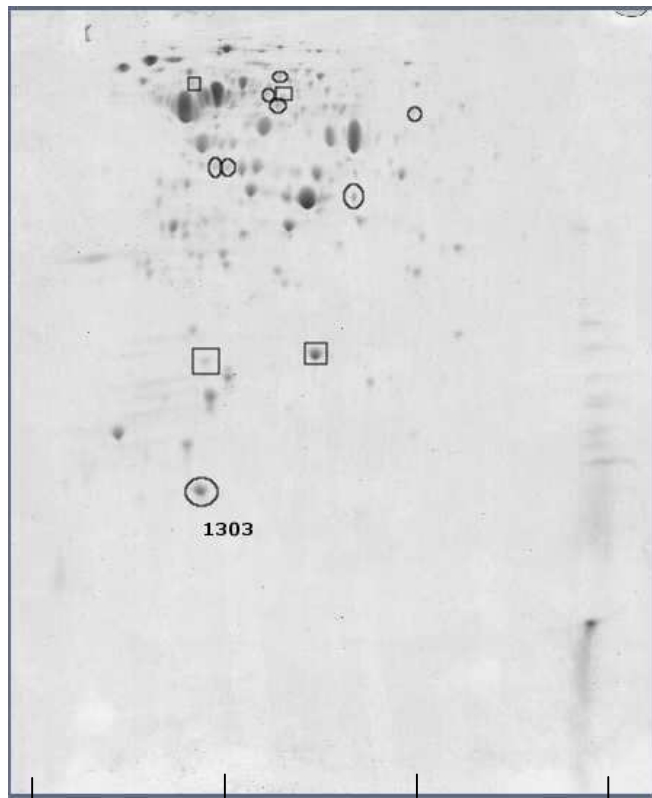


Figure 2: OD measurements of cultures of strain EU2241 at 26°C, with a temperature shift to 30°C (dotted) or not (plain) after 16 h of culture (arrow).

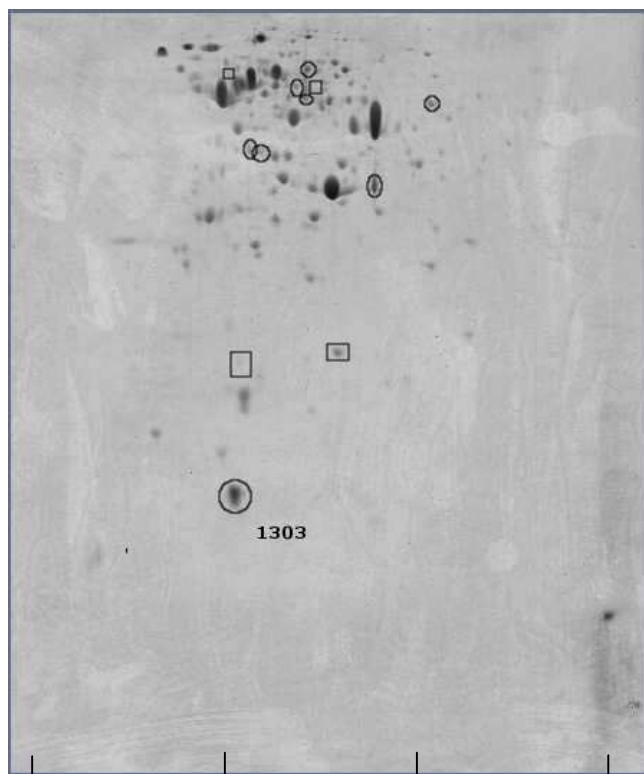
Protein analysis after growth at suboptimal temperature

Cultures inoculated at 1% reached an OD_{600} of 0.5 in 8 h at 26°C and 5 days at 5°C. Cell-free extract from mid-exponential-phase cultures were separated by 2D-EF. Corresponding gels are presented in figure 3. Around 200 spots could be identified. Twelve spots were found to be significantly different in the suboptimal conditions (5°C) compared to the standard condition (26°C). The expression of 4 proteins was repressed at 5°C, whereas the 8 other were induced. The comparison of the *Lactococcus* spp. EU2241 2D-EF gels with other gels from LAB strains (Wouters *et al.*, 1999a ; Wouters *et al.*, 1999b) allowed to determine the location of the CSP region. This area of the gels contained 4 major spots. One of them (spot 1303) was induced more than 5 times at 5°C compared to the expression at 26°C.

The spot 1303 was excised from the gel and peptide composition was analyzed by LC/MS-MS. Analysis of the resulting peptide sequence by the FASTS software showed high similarity (superior to 60%) with cold shock proteins from *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* and *Bacillus subtilis*. The nucleotide sequence of this protein obtained by reverse transcription was compared to the genes sequences of similar proteins and other cold shock proteins from different lactic acid bacteria. PCR primers CspD1-f and CspD3-r were designed upon the conserved regions of these sequences.



Pi: 4 5 6 7



Pi: 4 5 6 7

Figure 3: 2D-EF of cell-free extracts of strain *Lc. piscium* EU2241 grown at 26°C (a) or 5°C (b). Pi scale is given at the bottom. Over expressed proteins at 5°C are circled, and under expressed proteins are boxed.

Identification of a putative *csp* gene

PCR amplification with primers CspD1-f and CspD3-r using DNA from strain *Lactococcus* spp. EU2241 as a template resulted in the amplification of a fragment of approximately 100 bp as expected. Sequencing of this fragment and comparison of the nucleotide sequence with online database confirmed the presence of a putative *csp* gene. Inverse PCR primers Icq1f and Icq2r were designed upon this sequence. PCR amplification with these primers using the DNA from strain EU2241 digested by enzyme HhaI as a template resulted in the amplification of a 350 bp fragment. Analysis of this fragment with the ORF finder program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) revealed the presence of a 162 bp open reading frame comprising the original PCR fragment. This ORF encodes a partial protein of 54 amino acids (figure 4) which shares 85, 84 and 81% identity with cold shock proteins from *Enterococcus faecium*, *Ec. faecalis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. The protein also contains the two RNA-binding domains RNP1 and RNP2 (figure 4). Because of its similarity with the *Lc. lactis* CspE protein (closest protein of a bacterium from the same genus), the protein from strain EU2241 was named CspE.

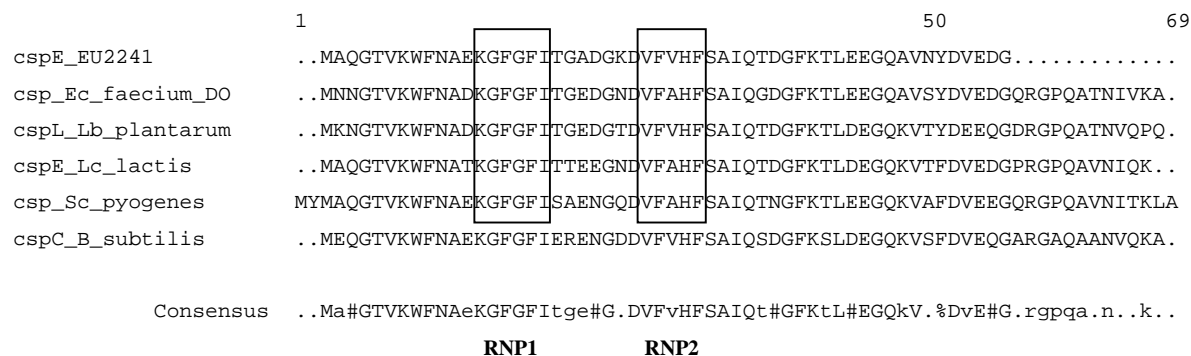


Figure 4: Multalin alignment of EU2241 CspE protein with close Csps from various bacteria. Consensus symbols : ! is anyone of IV; \$ is anyone of LM; % is anyone of FY; # is anyone of NDQEBZ. Boxed: RNP1 and RNP2 motives.

Discussion

The *Lactococcus* spp. strain used in this study previously proved to have an atypical behavior amongst lactic acid bacteria concerning growth at low temperature. Our results showed that *Lactococcus* spp. EU2241 is able to grow at 0°C, and unable to grow at 30°C which is the standard optimum temperature for bacteria of the *Lactococcus* genus (Matamoros *et al.*, 2006). All the lactic acid bacteria strains described in previous studies concerning cold shock or cold adaptation have an optimal growth temperature of 30°C or above (Chapot-Chartier *et al.*, 1997 ; Mayo *et al.*, 1997 ; Wouters *et al.*, 1998 ; Wouters *et al.*, 1999b ; Serror *et al.*, 2003 ; Marceau *et al.*, 2004 ; Sauvageot *et al.*, 2006). *Lactococcus lactis* MG1363 have an optimum growth temperature of 30°C, and a minimum of 4°C. After a cold shock from 30°C, its maximum growth rates at 20, 15, 10, 7 and 4°C are respectively 0,2 h⁻¹ 0,18 h⁻¹ 0,11 h⁻¹ 0,03 h⁻¹ 0,02 h⁻¹. They are similar to those predicted for strain EU2241, except at 20°C where it was clearly lower. Also an increasing lag time is observed for this strain at low temperature: no lag time at 20°C, 6h lag time at 10°C and 9 days at 4°C (Wouters *et al.*, 1999a). In comparison, no lag time is observed for strain EU2241, even at 5°C. Growth rates measured directly during growth at low temperature registered for *Lactobacillus sakei* 23K are also quite similar to those of *Lactococcus* spp. EU2241 except at 24°C: 0.32 h⁻¹ for *Lb. sakei* 23K compared to 0.58 h⁻¹ for our strain (Marceau *et al.*, 2003). (Hamasaki *et al.*, 2003) have also studied the growth rate of psychrotrophic LAB strains at low temperature : *Leuconostoc mesenteroides* sp *mesenteroides* MCRI1, *Ln. citreum* MCRI4 and *Lc. lactis* sp *lactis* MCRI3. All these strains have an optimum growth temperature of 30°C. The growth rates of the *Leuconostoc* strains at 4 and 10°C were similar to those of *Lactococcus* spp. EU2241, *Lc. lactis* MG1363 and *Lb. sakei* 23K. The *Lc. lactis* MCRI3 strain did not grow at 4°C, and its growth rate at 10°C was only 0,06 h⁻¹. From these comparisons, it appears that the strain *Lactococcus* spp. EU2241 have an atypical growth profile. The maximum growth rate values are similar to those of other psychrotrophic strains at low temperature (between 0 and 15°C), but at temperatures between 20 and 28°C, its growth rates are much higher than what can be expected.

Strain EU2241 was incubated at 5°C for comparison of proteome during cold growth versus standard condition at 26°C. By 2D-EF a modification of the expression was detected for 12 proteins. 2D-EF and LC/MS-MS analyses allowed to demonstrate that a CSP is overproduced more than 5 times at 5°C. In *Lb. sakei* 23K 17 proteins were differentially expressed at 4°C

compared to standard condition at 30°C. However, no cold shock proteins have been identified among them (Marceau *et al.*, 2004). CSP have previously been identified by 2D-EF, but always after cold shock (Wouters *et al.*, 1999a ; Wouters *et al.*, 1999b). CSP have previously been reported as part of the adaptation to growth at low temperature in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* (Berger *et al.*, 1996) and *Pseudomonas fragi* (Hebraud *et al.*, 1994). They are called cold adaptation proteins (CAPs), as they allow the bacteria not only to survive cold shock stress but also to grow at suboptimal temperature.

By using an inverse PCR strategy, a *csp* gene was detected in strain EU2241. At the nucleotide level, the homology with the *csp* sequences of *Lb. plantarum* (*cspC*) (Derzelle *et al.*, 2000) and *Lc. lactis* (*cspE*) (Wouters *et al.*, 1998) is 83 and 82% respectively. At the amino acid level, the CspE sequence of strain EU2241 was up to 85% identical to the sequence of an *Ec. faecium* Csp (accession number: Q3Y352), 84% to a Csp from *Ec. faecalis* (Q82ZX2) and 81% to the sequence of CspE from *Lc. lactis* (Q9CJ38). The two RNA binding domains (RNP 1 and 2) characteristic of the proteins from the Csp family were found in the deduced amino acid sequence. These motifs are highly conserved in CSPs. Their importance in RNA binding and the subsequent role of the CSPs as RNA chaperones have been demonstrated (Jiang *et al.*, 1997). In strain EU2241, CspE was present at 26°C in great amounts. In *Lc. lactis*, CspE is constitutively expressed, and appears to be the major CSP present at optimal growth temperature (Wouters *et al.*, 1999a). Moreover, overproduction of this protein allowed a 5 times increase of the survival after freezing compared to normal cells (Wouters *et al.*, 2000).

This work provides the first detailed growth characteristics of a psychrotrophic lactic acid bacteria that does not grow at 30°C. This kind of lactic acid bacteria is very uncommon, and only one other bacteria of this type has been reported in the literature (Kato *et al.*, 2000). The mechanisms of this adaptation have been investigated, and a protein of the CSP family has been identified, although its sequence needs to be completed.

The presence of other proteins of the CSP family needs to be investigated in strain *Lactococcus sp.* EU2241, by sequencing of SD-EF proteins spots in the same region that was identified before or by a genetic approach with universal CSP primers. In order to confirm the CAPs status of the identified protein in *Lactococcus sp.* EU2241, experiments will be conducted to measure the synthesis rate at different times of the growth, especially during the stationary phase.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the EU commission under the Integrated Project (IP) SEAFOODplus contract No. FOOD-CT-2004-506359.

References

Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M. A. and Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1294-1302.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.

Augustin, J. C., Rosso, L. and Carlier, V. (1999). Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* **38**, 137-146.

Berger, F., Morellet, N., Menu, F. and Potier, P. (1996). Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *Journal of Bacteriology* **178**, 2999-3007.

Chapot-Chartier, M. P., Schouler, C., Lepeuple, A. S., Gripon, J. C. and Chopin, M. C. (1997). Characterization of *cspB*, a cold-shock-inducible gene from *Lactococcus lactis*, and evidence for a family of genes homologous to the *Escherichia coli cspA* major cold shock gene. *Journal of Bacteriology* **179**, 5589-5593.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881-10890.

- Derzelle, S., Hallet, B., Francis, K. P., Ferain, T., Delcour, J. and Hols, P.** (2000). Changes in *cspL*, *cspP*, and *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* **182**, 5105-5113.
- Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P. and Dousset, X.** (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **47**, 33-42.
- Franzmann, P. D., Hopfl, P., Weiss, N. and Tindall, B. J.** (1991). Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Archives of Microbiology* **156**, 255-262.
- Graumann, P. L. and Marahiel, M. A.** (1999). Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**, 203-209.
- Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M. and Morita, H.** (2003). Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3668-3671.
- Hebraud, M., Dubois, E., Potier, P. and Labadie, J.** (1994). Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi*. *Journal of Bacteriology* **176**, 4017-4024.
- Horn, G., Hofweber, R., Kremer, W. and Kalbitzer, H. R.** (2007). Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 1457-1470.
- Jiang, W., Hou, Y. and Inouye, M.** (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 196-202.
- Jones, P. G., VanBogelen, R. A. and Neidhardt, F. C.** (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**, 2092-2095.

Kato, Y., Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kiuchi, A., Kaneuchi, C. and Ogawa, M. (2000). *Lactobacillus algidus* sp. nov., a psychrophilic lactic acid bacterium isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Pt 3**, 1143-1149.

Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 181-186.

Mackey, A. J., Haystead, T. A. and Pearson, W. R. (2002). Getting more from less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences. *Molecular and Cellular Proteomics* **1**, 139-147.

Marceau, A., Zagorec, M. and Champomier-Verges, M. C. (2003). Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*. *Research in Microbiology* **154**, 37-42.

Marceau, A., Zagorec, M., Chaillou, S., Mera, T. and Champomier-Verges, M. C. (2004). Evidence for involvement of at least six proteins in adaptation of *Lactobacillus sakei* to cold temperatures and addition of NaCl. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 7260-7268.

Matamoros, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Prevost, H. and Leroi, F. (2006). Selection of psychrotrophic bacteria active against spoilage and pathogenic microorganisms relevant for seafood products. In *Seafood research from fish to dish*, pp. 395-402. Edited by J. B. Luten, C. Jacobsen, K. Bekaert, A. Sæbø & J. Oehlenschläger. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.

Mayo, B., Derzelle, S., Fernandez, M., Leonard, C., Ferain, T., Hols, P., Suarez, J. E. and Delcour, J. (1997). Cloning and characterization of *cspL* and *cspP*, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* **179**, 3039-3042.

Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* **6**, 125-136.

Sauvageot, N., Beaufils, S., Maze, A., Deutscher, J. and Hartke, A. (2006). Cloning and characterization of a gene encoding a cold-shock protein in *Lactobacillus casei*. FEMS Microbiology Letters **254**, 55-62.

Schröder, K., Graumann, P., Schnuchel, A., Holak, T. A. and Marahiel, M. A. (1995). Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. Molecular Microbiology **16**, 699-708.

Serror, P., Dervyn, R., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. (2003). csp-like genes of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and their response to cold shock. FEMS Microbiology Letters **226**, 323-330.

Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. Biotechniques **28**, 1102, 1104.

van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek **82**, 187-216.

Weiss, A. and Hammes, W. P. (2006). Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold smoked salmon. European Food Research and Technology **222**, 343-346.

Wouters, J. A., Sanders, J. W., Kok, J., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (1998). Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five *csp* genes of *Lactococcus lactis* MG1363. Microbiology **144**, 2885-2893.

Wouters, J. A., Jeynov, B., Rombouts, F. M., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (1999a). Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. Microbiology **145**, 3185-3194.

Wouters, J. A., Rombouts, F. M., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (1999b). Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. Applied and Environmental Microbiology **65**, 4436-4442.

Wouters, J. A., Mailhes, M., Rombouts, F. M., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (2000). Physiological and regulatory effects of controlled overproduction of five cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3756-3763.

Yamanaka, K., Fang, L. and Inouye, M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Molecular Microbiology* **27**, 247-255.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N. and Montville, T. J. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection* **66**, 1420-1425.

Résultats complémentaires

Une stratégie de RT Q-PCR a été mise en place afin de mesurer l'expression du gène de la protéine de choc froid identifiée précédemment lors des essais de croissance à basse température.

La souche de *Lactococcus* spp. EU2241 a été cultivée en milieu Elliker modifié à trois températures différentes : 5°C, 15°C et 26°C. Lorsque les cultures ont atteint une DO de 0,5, les cellules ont été récupérées par centrifugation et les ARN totaux ont été extrait par la méthode de Milohanac *et al.* (2003). La DNase RQ1 RNase-free (Promega, Charbonnières, France) a été utilisée pour éliminer l'ADN génomique. Le gène de référence choisi pour mesurer les variations de transcription est le gène *rpoB*. Les amorces utilisées pour l'amplification de ce gène sont rpoB1: 5'-ATTGACCACTTGGGTAACCGTCG-3' et rpoB2: 5'-ACGATCACGGGTCAAACCACC-3' (Renouf *et al.*, 2006). A partir de la séquence du gène *cspE*, des amorces codant pour un fragment interne de petite taille ont été dessinées : CspE_QPCR1f: 5'-TAACGCTGAAAAAGGCTTCG-3' et CspE_QPCR2r: 5'-TTCCGTCTGACCAGTGATGA-3'. Les réactions de RT Q-PCR ont été réalisées en utilisant un kit SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) selon les recommandations du fabricant. Les réactions de transcription inverse et de quantification ont été réalisées dans un thermocycler Chromo-4 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) dans les conditions suivantes : 3 min à 50°C, 5 min à 95°C, 40 cycles de 30 sec à 95°C et 1 min à 60°C et enfin une étape finale de 1 min à 40°C. La courbe de fusion consistait en une incrémentation de 0,5°C toutes les 10 sec de 70 à 95°C. Les résultats de l'amplification ont été visualisés et analysés avec le logiciel Opticon Monitor 3 (Bio-Rad). Le seuil de détection C_T (seuil au-dessus duquel le signal est supérieur au bruit de fond) a été calculé pour chaque réaction. Les données ont été analysées en utilisant la méthode du double delta de C_T (Livak & Schmittgen, 2001). Tous les essais ont été réalisés en triple.

Lors des analyses de protéines en électrophorèse bidimensionnelle, la protéine CspE était surexprimée 5 fois à 5°C par rapport à son expression à 26°C. Les taux d'expression relatifs du gène *cspE* à 26, 15 et 5°C sont respectivement de $1,12 \pm 0,75$; $1,05 \pm 0,59$ et $0,24 \pm 0,09$. Selon Beltramo *et al.* (2006), les taux d'expression sont significatifs s'ils sont supérieurs à 2

(cas où le gène est sur exprimé) ou inférieurs à 0,5 (sous exprimé). Les résultats obtenus ne sont pas en accord avec les observations issues des expériences de protéomique. Cependant la méthodologie d'étude de l'expression des gènes de *Lactococcus* sp. EU2241 par RT Q-PCR demande à être optimisée. En effet seul le gène *rpoB* a pu être testé dans notre étude en temps que gène rapporteur, alors que d'autres gènes pourraient être plus adaptés comme les gènes de la famille de la lactate décarboxylase ou le gène *gyrA* (Desroche *et al.*, 2005). De plus la taille des fragments amplifiés sur les gènes *cspE* et *rpoB* demande à être ajustée. En effet ils sont respectivement de 50 et 400 pb, alors que la taille recommandée pour ce type d'analyse est comprise entre 100 et 250 pb. Les données obtenues entre temps sur le gène *cspE* devraient permettre de rectifier ce problème.

Discussion générale

Quelles souches de bactéries pour une meilleure biopréservation ?

La biopréservation est une méthode de conservation des aliments qui consiste à inoculer un produit alimentaire avec des souches de bactéries sélectionnées, de manière à inhiber la croissance de microorganismes indésirables. Combinée avec d'autres moyens de préservation tels que la réfrigération ou le fumage, elle permet d'allonger la durée de vie du produit en inhibant les flores d'altération, et d'améliorer la sécurité par inhibition des flores pathogènes. Elle peut être utilisée aussi bien dans des aliments fermentés (par exemple le fromage ou la charcuterie) que non fermentés (comme la viande ou les produits de la mer) (Leistner, 2000).

Les bactéries les plus intéressantes, et les plus fréquemment étudiées pour la biopréservation sont les bactéries lactiques (pour revue voir Stiles, 1996 et Rodgers, 2001). Elles possèdent souvent des propriétés recherchées pour l'application de cette technologie : production de composés inhibiteurs, innocuité reconnue ainsi que leur présence et croissance dans de nombreux produits alimentaires (fermentés ou non). La plupart des souches bioprotectrices sont sélectionnées pour leur capacité de production de bactériocines actives contre des germes pathogènes. Dans cette étude, de nouvelles souches ont été isolées à partir de produits de la mer. Les conditions de sélection se sont portées sur la capacité à inhiber des bactéries pathogènes et altérantes par des mécanismes non exclusivement liés à la production de bactériocines, ainsi que sur leur aptitude à la croissance à basse température.

Les bactéries lactiques décrites au chapitre 1 ont été isolées de produits de la mer frais emballés sous atmosphère modifiée (pavé de saumon, de dorade ou de grenadier) ou légèrement préservés (saumon fumé). Les produits à base de saumon représentent la source la plus importante de bactéries lactiques inhibitrices : 85% (44 sur 52) des souches de la collection proviennent des pavés de saumon frais ou du saumon fumé. Le saumon fumé est un produit dont la microflore en fin de conservation est largement dominée par les bactéries lactiques (Leroi *et al.*, 1998 ; Rachman *et al.*, 2004). De plus les bactéries qui y sont présentes possèdent souvent des propriétés inhibitrices, comme cela a été montré dans 2 études différentes où 14 et 41% des souches de bactéries lactiques isolées de saumon fumé avaient des propriétés anti-*Listeria* (Duffes *et al.*, 1999b ; Tomé *et al.*, 2006).

Les souches isolées lors de cette étude appartenaient principalement aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Des bactéries de ces genres ont déjà été isolées à partir de produits de la mer

(Mauguin & Novel, 1994 ; Wilderdyke *et al.*, 2004) mais les genres *Carnobacterium* et *Lactobacillus* y sont généralement décrits comme dominants (Leroi *et al.*, 1998 ; Truelstrup-Hansen *et al.*, 1998 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Rachman *et al.*, 2004). Dans cette étude, le genre *Leuconostoc* est principalement représenté par l'espèce *Ln. gelidum*. Cette espèce a été identifiée à partir de viande réfrigérée (Shaw & Harding, 1989). Elle participe à l'altération de filets de harengs marinés en produisant des substances visqueuses et du gaz (Lyhs *et al.*, 2004). Le fait que la production de polysaccharides n'ait pas été détectée lors de l'inoculation de nos souches sur du saumon fumé et des crevettes vient sans doute de leur faible teneur en saccharose. L'isolement de souches des espèces *Cb. alterfunditum* et *Lb. fuchuensis* respectivement à partir de pavés de grenadier et de pavés de dorade constitue à notre connaissance la première mise en évidence de la présence de ces espèces dans des produits de la mer. Les isolats du genre *Lactococcus* ont tous été identifiés comme faisant partie du même groupe taxonomique, sauf un appartenant probablement une autre espèce de *Lactococcus*. Le séquençage du gène de l'ARN 16S de plusieurs souches de ce groupe a révélé une très grande proximité avec l'espèce *Lc. piscium* (Williams *et al.*, 1990). Cependant les caractéristiques de croissance à basse température et l'hybridation ADN-ADN indiquent qu'il s'agit d'une nouvelle espèce. Le nom de *Lactococcus frigenis* est donc proposé, en référence à l'aptitude des souches représentatives de cette espèce à se développer à basse température. Le genre *Lactococcus* n'est pas fréquemment associé aux produits de la mer. Si l'espèce *Lc. piscium* a été isolée à partir de salmonidés, elle est plus souvent associée aux produits carnés (Sakala *et al.*, 2002 ; Vihavainen *et al.*, 2007). Elle est parfois considérée comme une espèce pathogène du poisson car la souche type provient d'échantillons de saumon malade (Williams *et al.*, 1990) et du fait de sa proximité taxonomique avec *Lc. garvieae*. Cependant aucune autre étude n'a mis en évidence le caractère pathogène de *Lc. piscium*, contrairement à *Lc. garvieae* (Eldar *et al.*, 1999). Les autres espèces du genre *Lactococcus* sont généralement associées aux produits laitiers (*Lc. lactis* et *Lc. raffinolactis*) à l'exception de *Lc. plantarum*, isolée à partir de légumes congelées mais pour laquelle aucun autre habitat n'a été décrit. Les bactéries décrites au chapitre 1 font partie d'espèces peu courantes dans les produits de la mer. Cela est probablement dû aux conditions particulières de sélection, comme la croissance à basse température. De plus, ces espèces ont rarement été étudiées en temps qu'agents de biopréservation.

Les mécanismes d'inhibition de sept souches de la collection ont été étudiés (voir chapitre 1). Une seule a montré une inhibition probablement liée à la production de bactériocine (perte de

pouvoir inhibiteur du surnageant lors de l'ajout de protéinase K). Il s'agit de la souche *Ln. gelidum* EU2247. Le spectre d'inhibition de cette bactériocine s'est révélé très restreint, affectant uniquement les souches de *L. monocytogenes* et *Lb. farciminis* parmi les 14 souches cibles testées. Ceci est concordant avec les précédentes études menées sur les bactériocines de bactéries lactiques (Jack *et al.*, 1996 ; Drider *et al.*, 2006). La production de bactériocines par des bactéries du genre *Leuconostoc* a déjà été identifiée auparavant (Daba *et al.*, 1991 ; Budde *et al.*, 2003). Au sein de l'espèce *Ln. gelidum*, la leucocine A-UAL 187 a été décrite et sa séquence en acide aminée déterminée, ainsi que la structure génétique du gène correspondant (Hastings *et al.*, 1991). Une comparaison de la leucocine A-UAL 187 avec la bactériocine produite par la souche *Ln. gelidum* EU2247 devra être effectuée pour déterminer s'il s'agit d'un nouveau peptide. L'ajout de bactéries productrices de bactériocine n'est pas réglementé à l'heure actuelle, que se soit au niveau français ou européen. En France les autorisations d'utilisation de microorganismes dans les produits alimentaires sont délivrées au cas par cas selon les recommandations de l'AFSSA (AFSSA, 2002). Les bactériocines étant considérées comme des additifs, l'autorisation est plus difficile à obtenir pour une souche productrice. L'innocuité de ces composés doit en effet être démontré ainsi que l'absence d'apparition de bactéries résistantes. La plupart des bactéries présentées dans cette étude ne sont pas productrices de bactériocine et elles entreraient donc dans la catégories des ingrédients (Wessels *et al.*, 2004) pour lesquels l'obtention des autorisations est plus facile. Du point de vue du consommateur, elles se rapprochent alors d'avantage des probiotiques et bénéficient ainsi de l'image positive qui leur est associée, spécialement si elles permettent d'éviter l'utilisation de conservateurs chimiques. Les mécanismes d'inhibition par lesquels ces souches parviennent à inhiber les bactéries d'altération et pathogènes devront cependant être élucidés. Les plus probables sont la production d'acides organiques et la compétition nutritionnelle, résultant de la déplétion en sucres de la matrice. Ce dernier mécanisme a déjà été observé pour une souche de *Cb. maltaromaticum* inhibant la croissance de *L. monocytogenes* (Nilsson *et al.*, 2005).

La biopréservation est elle un moyen efficace pour améliorer la qualité organoleptique des produits de la mer faiblement préservés ?

Pour la biopréservation des produits de la mer, le genre le plus utilisé est *Carnobacterium* (Yamazaki *et al.*, 2003 ; Brillet *et al.*, 2004 ; Nilsson *et al.*, 2004). Le genre *Lactococcus* est plus fréquemment utilisé pour la biopréservation des produits laitiers (O'Sullivan *et al.*, 2006),

et le genre *Leuconostoc* pour les produits carnés (Budde *et al.*, 2003 ; Jacobsen *et al.*, 2003). La souche cible visée est en général *L. monocytogenes*. L'étude décrite au chapitre 2 décrit pour la première fois l'utilisation des espèces *Ln. gelidum*, *Cb. alterfunditum* et *Lb. fuchuensis* pour la biopréservation des produits de la mer.

Pour la biopréservation des produits fermentés l'ajout d'une souche bioprotectrice, souvent sélectionnée parmi la flore naturelle du produit, est un concept bien accepté par les industriels, comme c'est par exemple le cas pour les fromages (McAuliffe *et al.*, 1999). A l'inverse dans les produits non fermentés tels que le saumon fumé ou les crevettes il peut y avoir une réticence à inoculer une bactérie vivante sur un produit dont on cherche normalement à minimiser la contamination microbiologique initiale. La présence des ferments bioprotecteurs ne doit donc pas être perceptible au niveau sensoriel et il faut s'assurer que les souches sélectionnées pour ce type d'application ne provoquent pas l'altération du produit. Pour cela, les 7 souches issues de la collection de bactéries inhibitrices (EU2213, EU2229, EU2241, EU2247, EU2255, EU2257 et EU2262) ont été inoculées sur des produits soumis à l'analyse sensorielle (évaluation des odeurs par un jury entraîné), afin de déterminer leur éventuel potentiel d'altération. Les tests sur des crevettes décortiquées cuites emballées sous vide ont révélé que les souches de *Lb. fuchuensis* EU2255 et *Cb. alterfunditum* EU2257 avaient un effet altérant. Elles produisaient respectivement après 7 jours de conservation à 8°C des odeurs de chou et de serpillière. Des odeurs de ce type ont déjà été décrites en corrélation avec la présence de souches de *Lactobacillus* spp. (Stohr *et al.*, 2001 ; Truelstrup-Hansen *et al.*, 1995). De la même manière l'inoculation de souche de *Cb. divergens* et *Cb. maltaromaticum* sur des crevettes nordiques à des niveaux similaires à ceux choisis dans cette étude ont conduit au rejet des échantillons par le jury d'analyse sensorielle, avec l'apparition d'odeurs de chlore (Laursen *et al.*, 2006). Le caractère protecteur ou altérant des souches du genre *Carnobacterium* varie considérablement selon les études et est encore largement débattu (Laursen *et al.*, 2005).

Parmi les 5 souches qui n'ont pas d'effet altérant sur les crevettes, 2 souches appartenant à l'espèce *Ln. gelidum* (EU2247 et EU2262) se sont montrées particulièrement efficaces pour allonger la durée de vie du produit. Les échantillons inoculés avec ces souches ont été considérés comme non altérés par le jury d'analyse sensorielle après 28 jours de stockage à 8°C alors que les témoins non ensemencés étaient considérés comme moyennement ou fortement altérés. De plus la présence des souches bioprotectrices ne modifie pas les

propriétés du produit, les odeurs enregistrées étant sensiblement les mêmes que pour un échantillon nonensemencé et non altéré. Une troisième souche de *Ln. gelidum* (EU2213) a montré un effet très variable selon les lots : forte préservation sur un lot et aucun effet sur l'autre. Ces variations peuvent être dues à la différence de composition de la microflore en fonction de la provenance des échantillons, mais les connaissances sur la flore bactérienne de la crevette tropicale doivent être approfondies avant de valider cette hypothèse. Les souches de *Lactococcus* sp. ne se sont pas révélées altérantes sur les crevettes et ont permis d'améliorer légèrement les caractéristiques organoleptiques à 28 jours de conservation. Cependant cette amélioration était beaucoup moins prononcée qu'avec les souches de *Ln. gelidum*. A notre connaissance, le genre *Leuconostoc* n'a jamais été utilisé pour la biopréservation des produits de la mer. Par ailleurs, aucune étude concluante n'a été publiée sur l'amélioration des caractéristiques organoleptiques de produits de type crevettes par le procédé de biopréservation, malgré des essais d'inoculation menés avec *Bifidobacterium breve* sur des crevettes décortiquées fraîches traitées avec du sorbate de potassium (Al-Dagal & Bazaraa, 1999). En revanche un brevet a été déposé par la société Biocéane concernant l'utilisation d'une souche de *Lc. lactis* pour allonger la durée de vie de produits alimentaires (Daniel & Lorre, 2003). Une application sur crevette est actuellement développée par un cuiseur français mais aucune donnée scientifique n'est disponible quant aux effets sur leurs produits. Des essais menés sur des crevettes nordiques marinées ont permis d'en allonger de manière significative la durée de conservation en utilisant de la nisine Z, passant de 10 jours pour les échantillons contrôle à 31 jours pour les échantillons traités avec la bactériocine (Einarsson & Lauzon, 1995). Mais comme cela a déjà été précisé, ce procédé se rapproche d'avantage de l'utilisation de conservateurs que de la biopréservation.

Le saumon fumé est un produit dont la microflore en fin de conservation est généralement dominée par les bactéries lactiques (Leroi *et al.*, 1998 ; Rachman *et al.*, 2004). Il s'agit d'un produit faiblement préservé, conservé à basse température et sur lequel le développement de la bactérie pathogène *L. monocytogenes* est possible (Duffes *et al.*, 1999a ; Cornu *et al.*, 2006). Toutes ces raisons en font une matrice de choix pour les essais de biopréservation, et de nombreuses études ont déjà été menées en ce sens (Leroi *et al.*, 1996 ; Nilsson *et al.*, 1999 ; Duffes *et al.*, 1999b ; Katla *et al.*, 2001 ; Yamazaki *et al.*, 2003 ; Brillet *et al.*, 2004 ; Vescovo *et al.*, 2006). Cependant, la plupart de ces études se concentrent sur l'inhibition de *L. monocytogenes* et les conséquences de l'ajout de ferments bioprotecteurs sur les caractéristiques organoleptiques sont rarement étudiées. Enfin les souches bioprotectrices

sélectionnées ne sont pas forcément efficaces pour l'allongement de la durée de conservation du produit (Brillet *et al.*, 2005).

Pour les expériences décrites au chapitre 2, les 4 souches les plus performantes lors des essais de biopréservation sur crevette ont été sélectionnées pour le même type de test sur saumon fumé : deux *Ln. gelidum* et deux *Lactococcus* sp. La souche de *Lactococcus* sp. EU2241 a montré un fort effet protecteur après 14 et 28 jours, avec 2/3 du jury déclarant l'échantillon non altéré après 4 semaines alors que l'échantillon témoin (non ensemencé) était déclaré fortement altéré par tous les panélistes. L'effet protecteur de l'autre souche de *Lactococcus* sp. (EU2229) n'a été enregistré qu'à 14 jours. Cette souche s'est révélée inefficace pour l'allongement de la durée de conservation au-delà de 28 jours. Les odeurs relevées par le jury dans les échantillons ensemencés avec les souches de *Lactococcus* sp. (fumée et beurre) sont décrites comme typiques de produits frais (Joffraud *et al.*, 2006 ; Leroi *et al.*, 1996). Une autre étude avait déjà montré précédemment un allongement de la durée de conservation de saumon fumé par une méthode de biopréservation, améliorant significativement les caractéristiques sensorielles après 4 semaines de stockage. Les souches utilisées appartenaient au genre *Carnobacterium* (Leroi *et al.*, 1996).

Quel impact sur les flores naturelles des produits ?

Comme il a été précédemment montré dans les crevettes (Mejlholm *et al.*, 2005) et dans le saumon fumé, les bactéries lactiques étaient dans cette étude la flore dominante des échantillons non ensemencés. La flore lactique en fin de conservation dans les échantillons de crevette ensemencés était supérieure d'un log à celle des échantillons non ensemencés. Les bactéries protectrices inoculées se sont donc bien implantées dans ce produit et sont majoritaires en fin de conservation.

Pour le saumon fumé, bien que les différents groupes bactériens reconnus pour être responsables de l'altération aient été dénombrés, il n'a pas été possible d'établir de manière significative un lien entre l'amélioration de la qualité sensorielle et la réduction des flores. Cette absence de corrélation a déjà été observée dans des essais de biopréservation de saumon fumé (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Leroi *et al.*, 1996) et est probablement due au fait que l'altération de ce type de produits dépend d'interactions complexes entre différents microorganismes (Joffraud *et al.*, 2006 ; Laursen *et al.*, 2006). Pour les crevettes, seules les

entérobactéries et la flore totale ont été dénombrées, et comme sur le saumon fumé aucune corrélation avec les qualités organoleptiques n'a pu être établie. Cependant des données récentes suggèrent que l'altération de ce type de produit serait due à la présence de *Bx. thermosphacta* et de *Carnobacterium* (Laursen *et al.*, 2006 ; Joffraud *et al.*, communication personnelle). *Bx. thermosphacta* est faiblement inhibée par les bactéries lactiques testées dans cette étude (voir chapitre 2). Celles ayant le plus d'effet appartiennent au groupe *Lactococcus* sp. Des dénombrements sur produits ainsi que des essais de co-inoculation devront être réalisés pour étudier l'impact des souches bioprotectrices sur les niveaux de *Bx. thermosphacta* grâce au milieu de dénombrement spécifique disponible.

Quel impact sur les flores pathogènes ?

Sur milieu modèle en boîte de Pétri, toutes les bactéries lactiques sélectionnées dans cette étude se sont montrées capables d'inhiber *L. monocytogenes* (voir chapitre 1). Ce pathogène représente le risque principal pour les produits faiblement préservés. Ce critère d'inhibition est donc très recherché pour les souches bioprotectrices. De nombreuses études ont déjà mis en évidence le fait qu'une forte proportion des bactéries lactiques isolées de produits alimentaires est capable d'inhiber cette bactérie (Budde *et al.*, 2003 ; Brillet *et al.*, 2005 ; Alvarado *et al.*, 2005 ; Wilson *et al.*, 2005 ; Weiss & Hammes, 2006). Si une grande partie des souches testées a aussi inhibé *Cl. sporogenes* (choisie en raison de ses caractéristiques semblables à celles du pathogène *Cl. botulinum*, mais plus facile à manipuler), les pathogènes *E. coli*, *Salmonella enterica* et *Staphylococcus aureus* n'ont été inhibés respectivement que par 3, 2 et 1 souches. L'inhibition de 3 souches de *Cl. botulinum* a déjà été démontrée par des bactéries appartenant aux genres *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Lactobacillus* (Rodgers *et al.*, 2003).

Afin de confirmer les résultats d'inhibition obtenus en boîte de Pétri, un test a été mené en co-inoculant des bactéries pathogènes (*L. monocytogenes*, *St. aureus* et *Vibrio cholerae*) et des bactéries lactiques (*Lactococcus* sp. EU2241 et *Ln. gelidum* EU2247) sur des crevettes cuites décortiquées et conservées sous vide à 8°C. En plus du danger représenté par *L. monocytogenes*, la bactérie pathogène *St. aureus* est un germe de recontamination courant qui peut être retrouvé dans les crevettes. Enfin la présence de *Vibrio* est un problème récurrent de l'aquaculture, particulièrement dans les eaux tropicales (Gopal *et al.*, 2005 ; Koonse *et al.*, 2005), et ces bactéries peuvent se retrouver dans le produit fini.

L'inhibition maximale de *L. monocytogenes* a été enregistrée dans les crevettes en présence de la souche *Lactococcus* sp. EU2241 après 3 semaines de conservation à 8°C. La différence avec le témoin non biopréservé était alors d'environ 2 log. Parmi les deux souches retenues dans notre étude, seule la souche de *Ln. gelidum* EU2247 est productrice de bactériocine, or l'inhibition de *L. monocytogenes* par cette souche s'est révélée moins importante que celle obtenue avec *Lactococcus* sp. EU2241. On considère généralement que la production de bactériocine joue un rôle majeur dans l'inhibition de *L. monocytogenes* (Dridier *et al.*, 2006) ou d'autres pathogènes tels que *Cl. botulinum* (Rodgers *et al.*, 2003). De nombreuses études mettent en évidence l'inhibition de *L. monocytogenes* par des bactéries lactiques productrices de bactériocine (Wessels & Huss, 1996 ; Nilsson *et al.*, 1999 ; Alvarado *et al.*, 2005), et celles portant sur des souches non productrices sont plus rares (Nilsson *et al.*, 2005). Bien que *Lactococcus* sp. EU2241 ait montré des capacités d'inhibition de *L. monocytogenes* intéressantes, la souche de *Cb. divergens* V41 est plus efficace, permettant une inhibition de la bactérie pathogène de près de 5 log (Brillet *et al.*, 2004). Une inhibition de *St. aureus* a aussi été mise en évidence pour les deux souches, avec une différence de 2 log enregistrée après 3 semaines de conservation entre les échantillons non ensemencés et les échantillons biopréservés. D'après les résultats exposés dans le chapitre 1, cette inhibition n'est pas due à une bactériocine, mais il est probable qu'elle soit due à une compétition nutritionnelle. Une inhibition de *St. aureus* a déjà été observée en boîte de Pétri par des souches de *Lc. lactis*, *Enterococcus faecium* et *Ec. mundtii* productrices de bactériocines (Campos *et al.*, 2006) mais elle n'a jamais été confirmée sur des produits alimentaires.

Perspectives de biopréservation : plusieurs souches pour une meilleure conservation ?

La comparaison des résultats d'analyse sensorielle et d'inhibition de bactéries pathogènes révèle que les 4 souches les plus performantes pour la biopréservation des produits de la mer sont *Lactococcus* sp. EU2229, *Lactococcus* sp. EU2241, *Ln. gelidum* EU2247 et *Ln. gelidum* EU2262. Cependant, une forte disparité a été constatée entre ces souches. Les isolats de *Ln. gelidum* se montrent plus efficaces pour la biopréservation des crevettes, alors que ceux de *Lactococcus* sp. ont permis une meilleure préservation du saumon fumé. Par ailleurs l'inhibition de bactéries pathogènes par *Lactococcus* sp. EU2241 s'est révélée la plus efficace, malgré le fait que cette souche ne produise pas de bactériocine. Cependant des souches de *Cb. divergens* précédemment isolées ont montré une meilleure inhibition de la bactérie pathogène *L. monocytogenes*. Ces résultats suggèrent que les stratégies de biopréservation doivent être

mises au point spécifiquement pour chaque produit, et probablement même pour des produits identiques provenant de sources différentes, comme le montrent les résultats différents obtenus sur les 2 lots de crevettes. Enfin la combinaison de plusieurs souches est un axe de travail qui devra être envisagé sérieusement, de manière à fournir une protection optimale à la fois contre les flores d'altération et les flores pathogènes. Par exemple, les souches de *Lactococcus* sp., très efficaces pour prévenir l'altération du saumon fumé, pourraient être associées à la souche *Cb. divergens* V41 qui permet une forte inhibition de *L. monocytogenes* (Brillet *et al.*, 2004).

Comment garantir l'innocuité des souches bioprotectrices ?

Afin de pouvoir être utilisées sur des produits alimentaires, les souches bioprotectrices ne doivent pas représenter un danger pour la santé humaine. Certaines amines biogènes comme l'histamine et la tyramine peuvent être responsables d'intoxications alimentaires, et leur synthèse a été reliée à la présence de bactéries lactiques dans les aliments tels que les produits laitiers, le vin ou les produits à base de viande (ten Brink *et al.*, 1990 ; Joosten & Nunez, 1996 ; Lonvaud-Funel, 2001 ; Suzzi & Gardini, 2003). Dans les produits de la mer, leur présence est majoritairement due à l'action de *Photobacterium phosphoreum* (Jorgensen *et al.*, 2000b ; Dalgaard *et al.*, 2006). Cependant la présence de bactéries lactiques dans du saumon conservé sous atmosphère modifiée a aussi été reliée à de forts taux de tyramine (Emborg *et al.*, 2002). Si les quantités d'amines biogènes produites par les bactéries lactiques restent en général peu importantes dans les produits naturellement contaminés, les taux de bactéries lactiques nécessaires pour obtenir une bioprotection efficace (de l'ordre de 10^8 UFC/g) peuvent en revanche conduire à une production importante de ces métabolites (Jorgensen *et al.*, 2000b). Par exemple des quantités élevées de tyramine (près de 300 mg/kg) ont été relevées lors de l'inoculation de la souche bioprotectrice *Cb. divergens* V41 en culture pure sur du saumon fumé (Duffes *et al.*, 1999a ; Brillet *et al.*, 2005). Dans ce contexte, le fait qu'aucune des souches testées au chapitre 1 n'ait montré de production d'histamine ni de tyramine est un avantage.

Les souches de bactéries lactiques présentées dans cette étude ont été sélectionnées sur des critères de croissance visant à éviter de masquer d'éventuels problèmes de maîtrise des procédés de transformation. En effet le dénombrement de la flore totale à 30°C reste un critère indicateur dans beaucoup de guides de bonnes pratiques de transformation des produits de la

mer, même s'il ne fait plus partie du nouveau règlement européen sur les critères microbiologiques (CE 2073/2005). Les bactéries bioprotectrices sont inoculées à des niveaux élevés (10^5 UFC/g) et sont donc généralement plus nombreuses que les flores de contamination. Les souches bioprotectrices de notre étude ont été sélectionnées pour ne pas se développer à 30°C et permettre le dénombrement de la flore mésophile totale indicatrice de l'hygiène des produits. Enfin la croissance dans le système digestif humain (37°C) des souches sélectionnées sera impossible, ce qui va dans le sens de l'innocuité de ces bactéries.

Un antibiogramme été réalisé, ce qui est fortement recommandé pour les souches bioprotectrices (Rodgers, 2001). Les sept isolats testés (EU2213, EU2229, EU2241, EU2247, EU2255, EU2257, EU2262) sont sensibles au chloramphénicol, à la tétracycline et à l'érythromycine sauf EU2241 qui a montré une résistance intermédiaire à l'érythromycine. Tous sont résistants à la vancomycine, la kanamycine, la colistine et à l'acide nalidixique. Ces résistances sont fréquemment décrites chez les bactéries lactiques et sont généralement considérées comme non transférables (Mathur & Singh, 2005).

Le nouveau système européen QPS (Qualified Presumption of Safety) de validation des souches destinées à l'alimentation humaines distingue deux axes principaux pour lister les bactéries entrant dans l'alimentation humaine : celles disposant d'un historique démontrant la sécurité de leur utilisation et pour lesquelles les volumes consommés par les humains sont importants (utilisation "traditionnelle" de microorganismes comme c'est le cas pour les ferments lactiques dans les produits laitiers) et les nouvelles bactéries utilisées dans un aliment. Cette dernière catégorie comprend aussi les bactéries déjà reconnues sans risques, mais utilisées dans un nouveau contexte (par exemple celui de la biopréservation). Ne disposant pas de l'historique adéquat, ces microorganismes devront alors être testés, afin de générer une base de connaissance nécessaire à l'acceptation d'utilisation. Cette base de connaissance devra permettre de préciser : la taxonomie ; le caractère non pathogène des souches ou l'absence de toxicité des métabolites produits ; et enfin les résistances spécifiques aux antibiotiques. Ces éléments ont déjà été réunis pour les souches sélectionnées dans cette étude, ce qui devrait permettre d'obtenir rapidement le statut QPS si les souches présentées ici devaient être proposées pour une application industrielle.

Des bactéries bien adaptées à la croissance sur produits réfrigérés ?

Les bactéries lactiques sont généralement des organismes mésophiles, avec une température optimale de croissance de 30°C, un maximum vers 45°C et un minimum pouvant descendre jusqu'à 0°C (van de Guchte *et al.*, 2002). Les bactéries présentées dans cette étude ont donc clairement un comportement inhabituel pour des bactéries lactiques. Les seuls autres exemples de bactéries lactiques ne poussant pas à 30°C sont *Lb. algidus*, une bactérie isolée de bœuf réfrigéré (Kato *et al.*, 2000) et les bactéries isolées d'un lac de l'Antarctique *Cb. funditum* et *Cb. alterfunditum* (Franzmann *et al.*, 1991). Les profils de croissance en fonction de la température ont été réalisés pour 2 souches de la collection : *Lactococcus* sp. EU2241 et *Ln. gelidum* EU2247. Leurs températures optimales de croissance étaient respectivement 26 et 20°C. Pour les deux souches, aucune croissance n'a été mesurée à 29°C ou au-dessus, mais toutes les deux poussaient à 0°C. Les vitesses de croissance calculées pour la souche *Lactococcus* sp. EU2241 étaient équivalentes à celles relevées pour d'autres souches psychrotrophes telles que *Lc. lactis* MG1363 (Wouters *et al.*, 1999a) ou *Lb. sakei* 23K (Marceau *et al.*, 2003), sauf à des températures supérieures à 20°C. Des mesures de croissance réalisées à 4 et 10°C sur des souches appartenant aux espèces *Ln. mesenteroides* sp *mesenteroides* et *Ln. citreum* montrent également des taux de croissance équivalents à ceux de *Ln. gelidum* EU2247 (Hamasaki *et al.*, 2003). D'après ces comparaisons, les souches isolées dans cette étude présentent un profil de croissance similaire à ceux des autres bactéries lactiques à basse température. Cependant la souche EU2241 montre des taux de croissance supérieurs à ceux relevés dans la littérature entre 20 et 28°C. Enfin l'absence de croissance à 30°C ou au-dessus est une caractéristique originale. Ces caractéristiques inhabituelles pour des bactéries lactiques ne sont pas encore élucidées à l'heure actuelle. Considérant leur intérêt pour la biopréservation, il est essentiel d'étudier les mécanismes associés.

Comment ces souches s'adaptent-elles au froid ?

Les protéines de la famille des CSP sont majoritairement produites en cas de choc froid dans la plupart des microorganismes. Chez certains organismes psychrophiles comme *Pseudomonas fragi* (Hebraud *et al.*, 1994) ou *Arthrobacter globiformis* (Berger *et al.*, 1996) des protéines de ce type sont surexprimées de manière continue lors de la croissance à basse température. Elles sont appelées protéines d'adaptation au froid (CAPs, cold adaptation proteins) (Hebraud & Potier, 1999). Dans la partie 3, la surproduction d'une protéine a été

démontrée lors de la croissance de la souche *Lactococcus* sp. EU2241 à basse température. La production de cette protéine à 5°C est environ 5 fois supérieure à celle obtenue lors d'une culture à 26°C.

La séquence en nucléotides du gène de la protéine surexprimée a été déterminée, ainsi que sa séquence en acides aminés. Les résultats présentés dans le chapitre 3 montrent une identité supérieure à 80% avec d'autres protéines de choc froid provenant de bactéries lactiques telles que *Lc. lactis* LG1363 (Wouters *et al.*, 1998), *Lb. plantarum* (Derzelle *et al.*, 2000) ou encore *Ec. faecium*. Les deux domaines RNP1 et RNP2 caractéristiques des CSP ont été retrouvés dans cette protéine. L'importance de ces domaines pour la liaison des CSP avec les acides nucléiques a été démontrée (Jiang *et al.*, 1997), et supporte l'hypothèse d'un rôle de chaperonnes à ARN ou ADN pour ces protéines. La protéine identifiée est très proche de la protéine CspE décrites chez *Lc. lactis*. A température optimale de croissance, cette protéine est la plus fortement exprimée parmi les CSP de cette bactérie, et son expression est doublée après d'un choc froid (Wouters *et al.*, 1999a). La protéine identifiée chez *Lactococcus* sp. EU2241 est aussi fortement produite à température de croissance optimale. Lors de la croissance à basse température (4°C) de la souche de *Lb. sakei* 23K, 17 protéines sont exprimées différemment par rapport à la condition standard de 30°C. Cependant aucune d'entre elle ne semble être une CSP (Marceau *et al.*, 2004). Il s'agit donc de la première corrélation établie entre la production de CSP et la croissance à basse température de bactéries lactiques. Afin de vérifier si cette protéine fait partie de la famille des CAPs, il faudrait établir une cinétique de production au cours de la croissance à basse température. Un mutant *cspE*- permettrait de déterminer le rôle que joue cette protéine dans la croissance à basse température. Cette technique a permis de mettre en évidence les rôles des protéines de cette famille chez d'autres bactéries comme *B. subtilis* (Graumann *et al.*, 1997). Enfin la présence d'autres protéines de la même famille est très probable. La méthode la plus employée pour les détecter consiste à soumettre la bactérie à un choc froid, comme cela a été le cas pour *E. coli* (Jones *et al.*, 1987), *Lc. lactis* (Wouters *et al.*, 1999a) ou *Sc. thermophilus* (Wouters *et al.*, 1999b).

Pour finir

Les études présentées dans cette thèse ont permis d'isoler et de caractériser des souches de bactéries lactiques bioprotectrices. Les données taxonomiques indiquent qu'il s'agit d'espèces

qui n'ont jamais été étudiées en temps qu'agents de biopréservation des produits de la mer (comme *Ln. gelidum*), ainsi qu'une nouvelle espèce de *Lactococcus*. Selon les recommandations de l'EFSA pour l'obtention de la mention QPS, des informations sur l'identification, l'innocuité (absence de synthèse d'amines biogènes) et la résistance aux antibiotiques ont été rassemblées.

Les applications menées sur des crevettes tropicales décortiquées cuites et sur du saumon fumé ont permis de montrer que les souches sélectionnées présentaient un fort potentiel pour la biopréservation. Lorsqu'elles sont inoculées sur du saumon fumé ou des crevettes, 4 de ces souches (*Lactococcus* sp. EU2229, *Lactococcus* sp. EU2241, *Ln. gelidum* EU2247 et *Ln. gelidum* EU2262) ne modifient pas les odeurs des produits frais perçues par un jury d'analyse sensorielle, et permettent d'allonger significativement la durée de conservation au-delà de 4 semaines. Elles permettent aussi d'améliorer la sécurité microbiologique, en inhibant la croissance de *L. monocytogenes* et de *St. aureus* de près de 2 log. Des études préliminaires sont en cours pour valoriser ces résultats dans un brevet industriel. Par la suite, une inoculation conjointe avec des souches bioprotectrices très efficaces contre les pathogènes comme *Cb. divergens* V41 devrait permettre de contrôler aussi bien les aspects durée de conservation que sécurité.

Enfin les caractéristiques de croissance des souches sélectionnées sont très inhabituelles pour des bactéries lactiques. Elles se développent rapidement à basse température (entre 4 et 8°C) mais pas du tout à 30°C. Cela représente un avantage pour la biopréservation des produits réfrigérés, leur permettant d'entrer en concurrence avec la flore d'altération psychrotrophe sans pour autant masquer les flores mésophiles révélatrices de la qualité hygiénique des produits. C'est aussi une garantie supplémentaire pour le consommateur, car aucune croissance ne pourra avoir lieu dans le tractus intestinal. La surexpression d'une protéine apparentée à la famille des CSP a été démontrée à 5°C. L'étape suivante consistera à démontrer son rôle exact dans l'adaptation à ces températures, ainsi qu'à rechercher d'autres protéines impliquées, qu'elles appartiennent à la même famille ou non. De part son comportement particulier, la souche *Lactococcus* sp. EU2241 pourrait constituer un modèle original pour l'étude de l'adaptation des bactéries lactiques aux basses températures.

Références bibliographiques

A

- AFSSA.** (2002). Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des micro-organismes utilisés dans le secteur agroalimentaire - souches nouvelles ou modifiées - applications différentes de souches déjà utilisées.
- Al-Dagal, M. M. and Bazarraa, W. A.** (1999). Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. *Journal of Food Protection* **62**, 51-56.
- Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M. A. and Sinigaglia, M.** (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1294-1302.
- Alvarado, C., Garcia-Almendarez, B. E., Martin, S. E. and Regalado, C.** (2005). Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. *Current Microbiology* **51**, 110-115.
- Augustin, J. C., Rosso, L. and Carlier, V.** (1999). Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* **38**, 137-146.

B

- Balcazar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Vendrell, D., Girones, O. and Muzquiz, J. L.** (2007). Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **30**, 111-118.
- Beltramo, C., Desroche, N., Tourdot-Marechal, R., Grandvalet, C. and Guzzo, J.** (2006). Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Research in Microbiology* **157**, 267-274.
- Ben Embarek, P. K.** (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *International Journal of Food Microbiology* **23**, 17-34.
- Berger, F., Morellet, N., Menu, F. and Potier, P.** (1996). Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *Journal of Bacteriology* **178**, 2999-3007.
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Bouttefroy, A. and Leroi, F.** (2004). Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 1029-1037.
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M. and Leroi, F.** (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **104**, 309-324.

Budde, B. B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A. G. (2003). *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 171-184.

C

Campos, C. A., Rodriguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barros-Velásquez, J. (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International* **39**, 356-364.

Cardinal, M., Berdague, J.-L., Dinel, V., Knockaert, C. and Vallet, J.-L. (1997). Effet de différentes techniques de fumage sur la nature des composés volatils et les caractéristiques sensorielles de la chair de saumon. *Sciences des aliments* **17**, 679-696.

Cardinal, M., Gunnlaugsdottir, H., Bjoernevik, M., Ouisse, A., Vallet, J.-L. and Leroi, F. (2004). Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Research International* **37**, 181-193.

Champomier-Verges, M. C., Maguin, E., Mistou, M. Y., Anglade, P. and Chich, J. F. (2002). Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B* **771**, 329-342.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 1-20.

Collins, M. D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Fergus, S. and Jones, D. (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 310-316.

Collins, M. D., Williams, A. M. and Wallbanks, S. (1990). The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiology Letters* **70**, 255-262.

Conway, E. J. and Byrne, A. (1933). An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances: The micro-determination of ammonia. *The Biochemical Journal* **27**, 419-429.

Corbo, M. R., Altieri, C., Bevilacqua, A., Campaniello, D., D'Amato, D. and Sinigaglia, M. (2005). Estimating packaging atmosphere-temperature effects on the shelf life of cod fillets. *European Food Research and Technology* **220**, 509-513.

Cornu, M., Beaufort, A., Rudelle, S., Laloux, L., Bergis, H., Miconnet, N., Serot, T. and Delignette-Muller, M. L. (2006). Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 159-168.

D

- Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. and Lacroix, C.** (1991). Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3450-3455.
- Dalgaard, P., Gram, L. and Huss, H. H.** (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* **19**, 283-294.
- Dalgaard, P.** (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* **26**, 319-333.
- Dalgaard, P. and Jorgensen, L. V.** (2000). Cooked and brined shrimps packed in a modified atmosphere have a shelf-life of > 7 months at 0°C, but spoil in 4-6 days at 25°C. *International Journal of Food Science and Technology* **35**, 431-442.
- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P. and Leisner, J. J.** (2003). Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 degrees C and 25 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 80-89.
- Dalgaard, P., Madsen, H. L., Samieian, N. and Emborg, J.** (2006). Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*)--effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 80-95.
- Daniel, P. and Lorre, S.** (2003). Brevet WO/2003/027268 : Souches de *Lactococcus lactis* et leur application a la conservation de produits alimentaires.
- Dauphin, G., Ragimbeau, C. and Malle, P.** (2001). Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *International Journal of Food Microbiology* **64**, 51-61.
- De Ley, J., Cattoir, H. and Reynaerts, A.** (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry* **12**, 133-142.
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. and Janssens, D.** (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*, pp. 25-116. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Paris: Lavoisier.
- Derdelinckx, G., Maudoux, M., Martens, H., Verachtert, H. and Dufour, J. P.** (1994). Bières spéciales malts et moûts de type acide. In *Bactéries Lactiques*, pp. 333-340. Edited by H. De Roissart & F. M. Luquet. Paris: Lavoisier.
- Derzelle, S., Hallet, B., Francis, K. P., Ferain, T., Delcour, J. and Hols, P.** (2000). Changes in *cspL*, *cspP*, and *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* **182**, 5105-5113.

- Derzelle, S., Hallet, B., Ferain, T., Delcour, J. and Hols, P.** (2003). Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4285-4290.
- Desroche, N., Beltramo, C. and Guzzo, J.** (2005). Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of Microbiological Methods* **60**, 325-333.
- Dicks, L. M., Dellaglio, F. and Collins, M. D.** (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 395-397.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M. and Prevost, H.** (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 564-582.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X. and Boyaval, P.** (1999a). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *in situ* produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* **62**, 1394-1403.
- Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P. and Dousset, X.** (1999b). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **47**, 33-42.

E

- Einarsson, H. and Lauzon, H. L.** (1995). Biopreservation of Brined Shrimp (*Pandalus borealis*) by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 669-676.
- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier, H.** (1999). Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1005-1008.
- Emborg, J., Laursen, B. G., Rathjen, T. and Dalgaard, P.** (2002). Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 790-799.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P. and Villani, F.** (2006). Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 4663-4671.
- Escara, J. F. and Hutton, J. R.** (1980). Thermal stability and renaturation of DNA in dimethyl sulfoxide solutions: acceleration of the renaturation rate. *Biopolymers* **19**, 1315-1327.

F

Fang, L., Jiang, W., Bae, W. and Inouye, M. (1997). Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization. *Molecular Microbiology* **23**, 355-364.

Feller, G. and Gerday, C. (1997). Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **53**, 830-841.

Franzmann, P. D., Hopfl, P., Weiss, N. and Tindall, B. J. (1991). Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Archives of Microbiology* **156**, 255-262.

G

Gancel, F., Dzierszynski, F. and Tailliez, R. (1997). Identification and characterization of *Lactobacillus* species isolated from fillets of vacuum-packed smoked and salted herring (*Clupea harengus*). *Journal of Applied Microbiology* **82**, 722-728.

Goarant, C. and Merien, F. (2006). Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. *Journal of Microbiological Methods* **67**, 27-35.

Gonzalez-Rodriguez, M. N., Sanz, J. J., Santos, J. A., Otero, A. and Garcia-Lopez, M. L. (2002). Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 161-168.

Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. and Karunasagar, I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 151-159.

Gram, L. and Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 121-137.

Graumann, P., Schroder, K., Schmid, R. and Marahiel, M. A. (1996). Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **178**, 4611-4619.

Graumann, P., Wendrich, T. M., Weber, M. H., Schroder, K. and Marahiel, M. A. (1997). A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Molecular Microbiology* **25**, 741-756.

Graumann, P. L. and Marahiel, M. A. (1999). Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**, 203-209.

Gudmundsdottir, S., Gudbjornsdottir, B., Lauzon, H. L., Einarsson, H., Kristinsson, K. G. and Kristjansson, M. (2005). Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked

salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* **101**, 41-51.

Gudmundsdottir, S., Gudbjornsdottir, B., Einarsson, H., Kristinsson, K. G. and Kristjansson, M. (2006). Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants. *Journal of Food Protection* **69**, 1304-1311.

Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P. (2005). Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 1316-1325.

H

Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y. and Hoshino, T. (2004). Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* **234**, 335-346.

Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M. and Morita, H. (2003). Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3668-3671.

Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology* **173**, 7491-7500.

Hebraud, M., Dubois, E., Potier, P. and Labadie, J. (1994). Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi*. *Journal of Bacteriology* **176**, 4017-4024.

Hebraud, M. and Potier, P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**, 211-219.

Heinitz, M. L. and Johnson, J. M. (1998). The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *Journal of Food Protection* **61**, 318-323.

Helander, I. M., von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T.-M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology* **8**, 146-150.

Hof, H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**, 199-202.

Horn, G., Hofweber, R., Kremer, W. and Kalbitzer, H. R. (2007). Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 1457-1470.

Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T. and Gram, L. (2004). Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **96**, 117-132.

Huss, H. H. (1997). Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control* **8**, 91-98.

Huss, H. H., Reilly, A. and Ben Embarek, P. K. (2000). Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* **11**, 149-156.

J

Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews* **59**, 171-200.

Jack, R. W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Wettenhall, R. E., Hickey, M. W. and Coventry, M. J. (1996). Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2897-2903.

Jacobsen, T., Budde, B. B. and Koch, A. G. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 242-249.

Jiang, W., Hou, Y. and Inouye, M. (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 196-202.

Joborn, A., Dorsch, M., Olsson, J. C., Westerdahl, A. and Kjelleberg, S. (1999). *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1891-1898.

Joffraud, J. J., Leroi, F., Roy, C. and Berdague, J. L. (2001). Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **66**, 175-184.

Joffraud, J. J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J. S., Léon, S., Gigout, F. and Leroi, F. (2006). Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **112**, 51-61.

Jones, P. G., VanBogelen, R. A. and Neidhardt, F. C. (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**, 2092-2095.

Joosten, H. and Nunez, M. (1996). Prevention of Histamine Formation in Cheese by Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1178-1181.

Jorgensen, L. V. and Huss, H. H. (1998). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology* **42**, 127-131.

Jorgensen, L. V., Dalgaard, P. and Huss, H. H. (2000a). Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2448-2453.

Jorgensen, L. V., Huss, H. H. and Dalgaard, P. (2000b). The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 920-934.

K

Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V. and Prevost, H. (2002). Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5358-5366.

Kandror, O. and Goldberg, A. L. (1997). Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**, 4978-4981.

Kandror, O., DeLeon, A. and Goldberg, A. L. (2002). Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**, 9727-9732.

Katla, T., Moretro, 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 Microbiology* **18**, 431-439.

Kato, Y., Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kiuchi, A., Kaneuchi, C. and Ogawa, M. (2000). *Lactobacillus algidus* sp. nov., a psychrophilic lactic acid bacterium isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Pt 3**, 1143-1149.

Kelly, W. J., Asmundson, R. V. and Huang, C. M. (1996). Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 209-218.

Kim, D. H., Brunt, J. and Austin, B. (2007). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology* **102**, 1654-1664.

Kim, W. S. and Dunn, N. W. (1997). Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. *Current Microbiology* **35**, 59-63.

Knockaert, C. (2002). *Le fumage du poisson, 7ème édition, collection "Valorisation des produits de la mer"*: IFREMER.

Koonse, B., Burkhardt, W., 3rd, Chirtel, S. and Hoskin, G. P. (2005). Salmonella and the sanitary quality of aquacultured shrimp. *Journal of Food Protection* **68**, 2527-2532.

Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T. and Esaki, N. (2004). Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly-->Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1696**, 59-65.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. and et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.

L

Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science* **52**, 299-305.

Lalitha, K. V., Sonaji, E. R., Manju, S., Jose, L., Gopal, T. K. and Ravisankar, C. N. (2005). Microbiological and biochemical changes in pearl spot (*Etroplus suratensis* Bloch) stored under modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1222-1228.

Laursen, B. G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P. and Leisner, J. J. (2005). *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 151-164.

Laursen, B. G., Leisner, J. J. and Dalgaard, P. (2006). *Carnobacterium* species : effect of metabolic activity and interaction with *Brochotrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 3604-3611.

Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 181-186.

Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J. J. and Chevalier, F. (1996). Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon. *International Journal of Food Science and Technology* **31**, 497-504.

Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F. and Cardinal, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 111-121.

Leroi, F., Joffraud, J. J. and Chevalier, F. (2000). Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5 degrees C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection* **63**, 502-508.

Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F. and Cardinal, M. (2001). Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 578-587.

Leroy, F. and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 67-78.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402-408.

Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 317-331.

Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **199**, 9-13.

Lyhs, U., Bjorkroth, J., Hyytia, E. and Korkeala, H. (1998). The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4 degrees C or 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **45**, 135-142.

Lyhs, U., Koort, J. M., Lundstrom, H. S. and Bjorkroth, K. J. (2004). *Leuconostoc gelidum* and *Leuconostoc gasicomitatum* strains dominated the lactic acid bacterium population associated with strong slime formation in an acetic-acid herring preserve. *International Journal of Food Microbiology* **90**, 207-218.

M

Marceau, A., Zagorec, M. and Champomier-Verges, M. C. (2003). Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*. *Research in Microbiology* **154**, 37-42.

Marceau, A., Zagorec, M., Chaillou, S., Mera, T. and Champomier-Verges, M. C. (2004). Evidence for involvement of at least six proteins in adaptation of *Lactobacillus sakei* to cold temperatures and addition of NaCl. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 7260-7268.

Masson, F., Talon, R. and Montel, M. C. (1996). Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology* **32**, 199-207.

Mathur, S. and Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review. *International Journal of Food Microbiology* **105**, 281-295.

Mauguin, S. and Novel, G. (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *Journal of Applied Bacteriology* **76**, 616-625.

Mayo, B., Derzelle, S., Fernandez, M., Leonard, C., Ferain, T., Hols, P., Suarez, J. E. and Delcour, J. (1997). Cloning and characterization of *cspL* and *cspP*, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* **179**, 3039-3042.

McAuliffe, O., Hill, C. and Ross, R. P. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 251-256.

Mejlholm, O., Boknaes, N. and Dalgaard, P. (2005). Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 66-76.

Mesbah, M., Premachandran, U. and Whitman, W. (1989). Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 159-167.

Milohanic, E., Glaser, P., Coppee, J. Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vazquez-Boland, J. A., Kunst, F., Cossart, P. and Buchrieser, C. (2003). Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular Microbiology* **47**, 1613-1625.

Mohamed Hatha, A. A., Maqbool, T. K. and Suresh Kumar, S. (2003). Microbial quality of shrimp products of export trade produced from aquacultured shrimp. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 213-221.

Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews* **39**, 144-167.

Muto, A. and Osawa, S. (1987). The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **84**, 166-169.

N

Nilsson, L., Gram, L. and Huss, H. H. (1999). Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection* **62**, 336-342.

Nilsson, L., Ng, Y. Y., Christiansen, J. N., Jorgensen, B. L., Grotinum, D. and Gram, L. (2004). The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 133-143.

Nilsson, L., Hansen, T. B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knochel, S., Gram, L. and Gravesen, A. (2005). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 172-183.

O

O'Sullivan, L., O'Connor E, B., Ross, R. P. and Hill, C. (2006). Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 135-143.

OFIMER. (2001). Le marché des crevettes. www.ofimer.fr.

OFIMER. (2004a). Le marché du saumon. www.ofimer.fr.

OFIMER. (2004b). Le marché du saumon et de la truite fumés en Europe occidentale. www.ofimer.fr.

OFIMER. (2006). Bilan annuel 2006 : commerce extérieur des produits de la pêche et de l'aquaculture. www.ofimer.fr.

Olofsson, T. C., Ahrne, S. and Molin, G. (2007). The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7 degrees C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 109-119.

Ordonez, J. A., Lopez-Galvez, D. E., Fernandez, M., Hierro, E. and de la Hoz, L. (2000). Microbial and physicochemical modifications of hake (*Merluccius merluccius*) steaks stored under carbon dioxide enriched atmospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1831-1840.

P

Paludan-Muller, C., Dalgaard, P., Huss, H. H. and Gram, L. (1998). Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 155-166.

Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology* **6**, 125-136.

Pilet, M.-F., Dousset, X., Barré, R., Novel, G., Desmazeaud, M. and Piard, J.-C. (1995). Evidence for Two Bacteriocins Produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* Isolated from Fish and Active Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **58**, 256-262.

R

Rachman, C., Fourrier, A., Sy, A., De La Cochetiere, M. F., Prevost, H. and Dousset, X. (2004). Monitoring of bacterial evolution and molecular identification of lactic acid bacteria in smoked salmon during storage. *Lait*, 145-154.

Renouf, V., Claisse, O., Miot-Sertier, C. and Lonvaud-Funel, A. (2006). Lactic acid bacteria evolution during winemaking: use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology* **23**, 136-145.

Richard, C., Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H. and Drider, D. (2003). Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 288-292.

Ringo, E., Olsen, R. E., Overli, O. and Lovik, F. (1997). Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture Research* **28**, 901-904.

Ringo, E., Wesmajervi, M. S., Bendiksen, H. R., Berg, A., Olsen, R. E., Johnsen, T., Mikkelsen, H., Seppola, M., Strom, E. and Holzappel, W. (2001). Identification and characterization of Carnobacteria isolated from fish intestine. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 183-191.

- Ringø, E. and Gatesoupe, F.-J.** (1998). Lactic acid bacteria in fish : a review. *Aquaculture* **160**, 177-203.
- Ringø, E., Bendiksen, H. R., Wesmajervi, M. S., Olsen, R. E., Jansen, P. A. and Mikkelsen, H.** (2000). Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Applied Microbiology* **89**, 317-322.
- Rocourt, J., Jacquet, C. and Reilly, A.** (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 197-209.
- Rodgers, S.** (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures - a review. *Trends in Food Science & Technology* **12**, 276-284.
- Rodgers, S., Peiris, P. and Casadei, G.** (2003). Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures. *Journal of Food Protection* **66**, 674-678.
- Ross, R. P., Morgan, S. and Hill, C.** (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* **79**, 3-16.
- Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S. E. and Nissen, H.** (2004). Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in modified-atmosphere-packed salmon and coalfish. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5010-5018.
- Rutherford, T. J., Marshall, D. L., Andrews, L. S., Coggins, P. C., Schilling, M. W. and Gerard, P.** (2007). Combined effect of packaging atmosphere and storage temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat shrimp. *Food Microbiology* **24**, 703-710.
- S**
- Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C. and Ogawa, M.** (2002). Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 173-179.
- Sakamoto, K. and Konings, W. N.** (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology* **89**, 105-124.
- Sakamoto, T. and Murata, N.** (2002). Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 208-210.
- Sauvageot, N., Beaufils, S., Maze, A., Deutscher, J. and Hartke, A.** (2006). Cloning and characterization of a gene encoding a cold-shock protein in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters* **254**, 55-62.
- Schleifer, K. H. and Kandler, O.** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* **36**, 407-477.
- Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W. and Amann, R.** (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **5**, 1081-1094.

- Schröder, K., Graumann, P., Schnuchel, A., Holak, T. A. and Marahiel, M. A.** (1995). Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Molecular Microbiology* **16**, 699-708.
- Serror, P., Dervyn, R., Ehrlich, S. D. and Maguin, E.** (2003). csp-like genes of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and their response to cold shock. *FEMS Microbiology Letters* **226**, 323-330.
- Shaw, B. G. and Harding, C. D.** (1989). *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *Journal of systematic bacteriology* **39**, 217-223.
- Silla Santos, M. H.** (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* **29**, 213-231.
- Stiles, M. E.** (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 331-345.
- Stohr, V., Joffraud, J. J., Cardinal, M. and Leroi, F.** (2001). Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* **34**, 797-806.
- Sumner, J. and Ross, T.** (2002). A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 55-59.
- Suzzi, G. and Gardini, F.** (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 41-54.

T

- Tamaoka, J. and Komagata, K.** (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiology Letters* **25**, 125-128.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. and Huis in 't Veld, J. H.** (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* **11**, 73-84.
- Todorov, S. D., Koep, K. S. C., Van Reenen, C. A., Hoffman, L. C., Slinde, E. and Dicks, L. M.** (2007). Production of salami from beef, horse, mutton, Blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*) and Springbok (*Antidorcas marsupialis*) with bacteriocinogenic strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus*. *Meat Science* **77**, 405-412.
- Tomé, E., Teixeira, P. and Gibbs, P. A.** (2006). Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. *Food Microbiology* **23**, 399-405.
- Truelstrup-Hansen, J., Gill, T. and Huss, H. H.** (1995). Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International* **28**, 123-130.

Truelstrup-Hansen, L. and Huss, H. H. (1998). Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. *Food Research International* **31**, 703-711.

Truelstrup-Hansen, L., Rontved, S. D. and Huss, H. H. (1998). Microbiological quality and shelf life of cold-smoked salmon from three different processing plants. *Food Microbiology* **15**, 137-150.

V

Valdimarsson, G., Einarsson, H., Gudbjornsdottir, B. and Magnusson, H. (1998). Microbiological quality of Icelandic cooked-peeled shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* **45**, 157-161.

van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 187-216.

Varlet, V., Knockaert, C., Prost, C. and Serot, T. (2006). Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 3391-3401.

Vermeiren, L., Devlieghere, F. and Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology* **96**, 149-164.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., De Graef, V. and Debevere, J. (2005). In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 33-42.

Vescovo, M., Scolari, G., Orsi, C., Sinigaglia, M. and Torriani, S. (1997). Combined effect of *Lactobacillus casei* inoculum, modified atmosphere packaging and storage temperature in controlling *Aeromonas hydrophilia* in ready-to-use vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* **32**, 411-419.

Vescovo, M., Gianluigi, S. and Zacconi, C. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiology* **23**, 689-693.

Vihavainen, E., Lundstrom, H. S., Susiluoto, T., Koort, J., Paulin, L., Auvinen, P. and Bjorkroth, K. J. (2007). Role of broiler carcasses and processing plant air in contamination of modified-atmosphere-packaged broiler products with psychrotrophic lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1136-1145.

W

- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. and Trüper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 463-464.
- Weiss, A. and Hammes, W. P. (2006). Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold smoked salmon. *European Food Research and Technology* **222**, 343-346.
- Wessels, S. and Huss, H. H. (1996). Suitability of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiology* **13**, 323-332.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E. B., de Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. and von Wright, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science and Technology* **25**, 498-505
- Wilderdyke, M. R., Smith, D. A. and Brashears, M. M. (2004). Isolation, identification, and selection of lactic acid bacteria from alfalfa sprouts for competitive inhibition of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* **67**, 947-951.
- Williams, A. M., Fryer, J. L. and Collins, M. D. (1990). *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters* **56**, 109-113.
- Wilson, A. R., Sigee, D. and Epton, H. A. (2005). Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1516-1522.
- Wouters, J. A., Sanders, J. W., Kok, J., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (1998). Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five *csp* genes of *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology* **144**, 2885-2893.
- Wouters, J. A., Jeynov, B., Rombouts, F. M., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (1999a). Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology* **145**, 3185-3194.
- Wouters, J. A., Rombouts, F. M., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (1999b). Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4436-4442.
- Wouters, J. A., Kamphuis, H. H., Hugenholtz, J., Kuipers, O. P., de Vos, W. M. and Abee, T. (2000). Changes in glycolytic activity of *Lactococcus lactis* induced by low temperature. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3686-3691.
- Wouters, J. A., Frenkiel, H., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. (2001). Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the

production of cold-induced proteins. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5171-5178.

X

Xia, B., Ke, H. and Inouye, M. (2001). Acquirement of cold sensitivity by quadruple deletion of the *cspA* family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **40**, 179-188.

Y

Yamanaka, K., Fang, L. and Inouye, M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Molecular Microbiology* **27**, 247-255.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N. and Montville, T. J. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection* **66**, 1420-1425.

Annexes

Annexe I : **Matamoros S.**, Pilet M.F., Chevalier F., Prévost H., Leroi F. 2006. Isolation and characterisation of psychrophilic lactic acid bacteria isolated from seafood products. *In* Seafood research from fish to dish – Quality, safety and processing of wild and farmed fish. Ed. Luten J.B., Jacobsen C., Bekaert K., Saebo A., Oehlenschläger J. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.

Annexe II : 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria 2005, Egmond aan Zee : Selection of psychrophilic lactic acid bacteria active against spoilage and pathogenic microorganisms relevant for seafood products

Annexe III : First International Symposium on Antimicrobial Peptides Food, Veterinary and Medical Applications 2006, Nantes : Characterization of psychrophilic lactic acid bacteria for the biopreservation of seafood products

Annexe IV : CBL 2007, Rennes : Comportement d'une bactérie lactique psychrotrophe à différentes températures

Selection of psychotrophic bacteria active against spoilage and pathogenic micro-organisms relevant for seafood products

Sébastien Matamoros^{1,2}, Marie-France Pilet¹, Frédérique Gigout², Hervé Prevost¹ and Françoise Leroi²

¹Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, ENITIAA, Nantes, France

²Département de Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, Nantes, France

Abstract

In this study, 51 seafood products were screened to select psychrophilic inhibiting lactic acid bacteria. 5575 colonies were tested for inhibition against four target strains : *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus xylosum*, *Pseudomonas* sp. and *Serratia liquefaciens*. 456 colonies (8.2%) showed inhibition and 132 (28.9%) of them were picked up. 54 isolates growing at 15 °C but not at 30 °C were selected. Basic phenotypic characteristics (Gram, catalase and oxidase test) were then tested. Finally, 52 presumptive psychrophilic LAB strains were selected. The inhibition spectrum of these strains was enlarged to 14 spoiling or pathogenic target strains relevant for seafood products. The inhibition profiles were recorded, and clustering was made to separate eight distinct groups.

Keywords: biopreservation, psychrophilic lactic acid bacteria, inhibition

Introduction

Seafood products, widely marketed throughout the world, are easily spoiled by micro-organisms. Due to its aquatic environment, the microbiology of fish products is quite specific. The main spoilage flora of fresh seafood products stored at low temperature is constituted of Gram negative bacteria like *Shewanella* spp., *Pseudomonas* spp. and *Photobacterium* spp. (Gram and Huss 1996). Vacuum packaging reduces the level of the respiratory bacteria such as *Pseudomonas* spp. However *Shewanella putrefaciens* and *Photobacterium phosphoreum* develop easily under vacuum conditions, due to their capacity to use trimethylamine oxide (TMAO) as an electron acceptor. Reduction of TMAO into trimethylamine (TMA) leads to specific fishy off-odours. Modified atmosphere packaging (MAP) with CO₂ inhibits the development of respiratory organisms such as *Pseudomonas* spp. and *S. putrefaciens*. This result explains the significant extension of the product shelf-life. However, *P. phosphoreum* is resistant to CO₂ atmosphere and is still a source of spoilage (Gram and Huss 1996). Lightly preserved fish products (cold-smoked fish, pickled and marinated fish, etc.) are generally distributed at chilled temperature and under vacuum or modified atmosphere packaging. This kind of packaging favours the growth of lactic acid bacteria (LAB) such as *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp. and *Leuconostoc* spp., which soon become the predominant flora. They are mixed with typical Gram negative spoilage bacteria. They can be part of the spoilage by producing off odours and biogenic amines. *Enterobacteriaceae* (Gram negative) and *Brochothrix thermosphacta* (Gram positive) can also be found in lightly preserved products (Gram and Huss 1996; Leroi and others 1998; Gram and Dalgaard 2002).

Sébastien Matamoros, Marie-France Pilet, Frédérique Gigout, Hervé Prevost and Françoise Leroi

Pathogenic risks in lightly preserved seafood products occur mainly from *Listeria monocytogenes* and biogenic amines production. *L. monocytogenes* is a Gram positive bacterium that can resist salting, drying and cooling (Collins-Thompson 1980). This resistance allows *L. monocytogenes* to grow in preserved products such as smoked salmon (Heinitz and Johnson 1998). Low numbers of *Clostridium botulinum*, *Bacillus* spp. and *Salmonella* spp. have been reported in seafood (Huss 1997). High levels of biogenic amines, particularly histamine in scombroid fish, can lead to food poisoning (ten Brink and others 1990). Their formation is mainly due to microbial activity and can be related to the presence of *P. phosphoreum*, psychrotolerant *Morganella morganii*-like bacteria and LAB, as for example in lightly preserved tuna (Emborg and others 2005).

Biopreservation is a novel and innovative way of reducing microbial risks and/or extending shelf life of lightly preserved products. Biopreservation consists in inoculating in the food matrix bacterial strains selected for their ability to inhibit growth of undesirable bacteria, while not presenting any spoilage capacity (Rodgers 2001). Many studies have been conducted on the biopreservation of food products (seafood, meat, dairy products). For example Vermeiren and others (2004) investigated the preservative abilities of *Lb. sakei* on cooked meat products. Brillet and others (2004) used *Carnobacterium divergens* to protect cold-smoked salmon from growth of *L. monocytogenes*. According to Helander and others (1997), the control of Gram-negative bacteria is problematic because they are resistant to bacteriocins, which are molecules often produced by LABs and active against related species.

In this study, isolation of bacteria from different seafood products was carried out. The objective was to isolate psychrophilic LAB cultures active against a wide range of Gram negative and Gram positive spoilage or pathogenic target bacteria, to be used in the seafood industry.

Materials and methods

Bacteria isolation from seafood products

Fifty one seafood products were obtained from different supermarkets (Table 3). They were stored at 4 or 8 °C, and opened in a range of 10 days before to 10 days after the use by date. A 30 g sample of each product was taken aseptically and diluted in 120 ml of physiological water (1 g/l tryptone (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), 8.5 g/l NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), 1 drop of bromocresol purple). The sample was crushed in a Stomacher 400 (Seward Medical, London, UK) for 2 min. After 30 min for revivification, four decimal dilutions were made in physiological water, and 0.1 ml of each dilution was spread on Elliker agar plates (Elliker, Biokar Diagnostics, with 1.5% agar added). For each sample, 5 plates of each dilution were made (total: 25 plates per sample). Plates were then incubated in anaerobic conditions at 8 °C for 10 to 15 days. At that time, plates showing growth of 10 to 15 colonies were selected for the double layer inhibition test.

Double layer inhibition test

Four target strains have been selected for the test: *Listeria monocytogenes* (EU2160), *Staphylococcus xylosus* (EU2178), *Pseudomonas* group I (EU2189) and *Serratia liquefaciens* (EU2196). These strains were incubated twice successively for 72 and 24 hours in Brain Heart Broth (Biokar Diagnostics), before being diluted to a previously determined concentration. Information about culture conditions are presented in Table 1. One millilitre of selected dilution was added to 15 ml of soft BHB agar (Brillet and others 2004) and then spread on an isolation plate showing growth of 10 to 15 colonies. The four target strains were spread on different

Selection of psychotrophic bacteria active against spoilage and pathogenic micro-organisms

plates of the same set (same product, same dilution). The fifth plate of the set was kept intact as a negative control. Plates were then incubated for 24 hours at the specific strain incubation temperature (Table 1). Presence of inhibition zone was checked visually. Based on colony aspect (size, colour, appearance, presence or not of polysaccharide) and product of origin, approximately 1 out of 3 colonies showing an inhibition zone was picked up and cultivated in Elliker broth (Biokar Diagnostics) at 15 °C.

Selected strains were isolated twice successively on Elliker agar and then incubated in Elliker broth at 15 °C for 4 days before being frozen for conservation at -80 °C in Elliker broth containing 10% of glycerol (Panreac Quimicia SA, Barcelona, Spain).

Phenotypic tests

The selected strains were pre-cultivated for 72 hours in Elliker broth at 15 °C. In order to check their psychotrophic characteristic, each strain was then inoculated in two Elliker broth tubes. One tube was incubated at 15 °C, while the other one was incubated at 30 °C. Growth was watched visually by checking turbidity after 48 h and one week of culture. Strains presenting growth at 15 °C but no growth at 30 °C after one week were tested for three characteristics: Gram, catalase and oxidase. Their morphological characteristics were observed by phase contrast microscopy. The Gram test was performed by the KOH method (Gregersen 1978). The Catalase test was performed by dropping 10% H₂O₂ (Merck) on a colony. The Oxidase test was performed on a BBL DrySlide (Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France). Only Gram positive, catalase negative and oxidase negative strains were selected for further studies.

Inhibition spectrum

Research of the inhibitory capacities of the selected strains was enlarged to 14 spoilage and pathogenic target strains listed in Table 2. The tested LAB strains were incubated for 48 h in Elliker broth at 15 °C. Hundred-fold dilutions were made in physiological water. Strains were spotted on Elliker agar plates (10 µl per spot) with 6 spots per plate. Plates were then incubated anaerobically for 10 days at 8 °C.

The target strains were cultivated twice successively for 72 hours and 24 hours in specific medium broth, at their specific temperature (Table 2). They were then diluted in physiological water (Table 2), and 1 ml of final dilution was added to 15 ml of specific medium (Table 2) containing 10 g/l of agar. Soft agar was then spread on previously spotted and incubated Elliker agar plates. After 24 hours incubation at target strain appropriate temperatures (Table 2), the plates were examined for evidence of inhibition. The size of the inhibition zone was recorded, and a score from 0 to 4 was given as follows : 0 for no inhibition, 1 for an inhibition zone's

Table 1. Target strains used in first screening and appropriate cultures conditions for double layer realisation.

Strain	Code	Incubation temperature	Used dilution
<i>L. monocytogenes</i>	EU2160	20 °C	1/100
<i>S. xylosum</i>	EU2178	37 °C	1/1000
<i>Pseudomonas</i> sp.	EU2189	20 °C	1/1000
<i>S. liquefaciens</i>	EU2196	20 °C	1/1000

Sébastien Matamoros, Marie-France Pilet, Frédérique Gigout, Hervé Prevost and Françoise Leroi

Table 2. Target strains used in the inhibition spectrum and appropriate cultures conditions for double layer realisation.

Code*	Species	Medium**	Temperature	Dilution
EU2199	<i>Psychrobacter</i> sp.	BHB	20 °C	10 ⁻²
EU2183	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	BHB + 15g/l NaCl	15 °C	0
EU2204	<i>Lactobacillus farciminis</i>	BHB	20 °C	10 ⁻²
EU2206	<i>Brochotrix thermosphacta</i>	BHB	20 °C	10 ⁻³
EU2187	<i>Shewanella putrefaciens</i>	BHB	20 °C	10 ⁻²
EU2211	<i>Bacillus subtilis</i>	BHB	37 °C	10 ⁻³
EU2160	<i>Listeria monocytogenes</i>	BHB	20 °C	10 ⁻²
EU2178	<i>Staphylococcus xylosum</i>	BHB	37 °C	10 ⁻³
EU2189	<i>Pseudomonas</i> group 1	BHB	20 °C	10 ⁻³
EU2196	<i>Serratia liquefaciens</i>	BHB	20 °C	10 ⁻³
CIP81.3	<i>Salmonella enterica</i>	BHB	37 °C	10 ⁻²
CIP76.25	<i>Staphylococcus aureus</i>	BHB	37 °C	10 ⁻¹
CIP76.24	<i>Escherichia coli</i>	BHB	37 °C	10 ⁻²
ENITIAA	<i>Clostridium sporogenes</i>	RCM***	37 °C	10 ⁻²

* EU: HURDLETECH collection, stored in IFREMER, Nantes, France ; CIP: Institut Pasteur Collection, Paris, France; ENITIAA: ENITIAA collection, Nantes, France

** BHB: Brain Heart Broth, Biokar Diagnostic; RCM medium was prepared as follow : 3 g/l yeast extract (Biokar Diagnostics), 10 g/l meat extract (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England), 10 g/l peptone (Oxoid LTD.), 5 g/l glucose (Merck), 1 g/l potato starch (La Bovida, Nanterre, France), 5 g/l NaCl (Merck), 3 g/l Sodium Acetate (Merck), 0.5 g/l cystein hydrochloride (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), 0.5 g/l agar (Biokar Diagnostics). The pH was adjusted at 6.9 and medium was then autoclaved

diameter of 1 cm, 2 for a diameter of 2 cm, 3 for a diameter of 3 cm and 4 for a diameter of 4 cm or more (meaning the inhibition zone extended to the next spot on the plate).

Ward's hierarchical clustering method with squared Euclidian distance was used to separate the 52 LAB isolates into groups according to the size of their inhibition zone for the fourteen target strains (Uniwin plus, version 4.01, Sigma plus, Paris, France).

Results and discussion

Isolation and characterisation

From the 51 seafood products analysed, a total of 5575 colonies have been covered with indicative bacteria. 456 (8.2%) colonies showed an inhibition activity and 132 of these (28.9%) were selected upon their appearance for further tests. All results concerning isolation and characterisation are presented in Table 3. From the 132 selected strains, 54 (40.9%) were able to grow at 15 °C and showed no growth at 30 °C. According to Shewan and Murray (1979), psychrophilic bacteria have an optimum growth temperature of 15 °C and a maximum growth temperature of 18 °C, whereas psychrotrophic strains have an optimum growth temperature between 20 and 30 °C, and a maximum at 37 °C. The selection of strains showing no growth at 30 °C orients the selection toward psychrophiles. The selection's main purpose was to select strains that will be capable of growing at chilled storage temperatures. Moreover, psychrophilic

Selection of psychotrophic bacteria active against spoilage and pathogenic micro-organisms

strains will not grow at body temperature, meaning no growth will occur in the human tractus. If the product is submitted to abused temperature during storage, the biopreservative strains will not overgrow and spoil the product. Fifty two (96.3%) out of the 54 psychrophilic strains were Gram positive, catalase negative, oxidase negative rods or cocci, which means that they probably belong to the LAB group.

As shown in Table 3, a lot of presumptive LAB colonies were obtained from MAP and smoked fish products. This is coherent with previous publications (Leroi and others 1998; Gonzalez-Rodriguez and others 2002). But very few of the colonies coming from smoked fish products showed inhibition, except for the cold-smoked salmon. A significant number of colonies from MAP products showed inhibition and were selected thereafter. In addition, 44 strains out of the 52 selected strains (84.6%) came from salmon: MAP salmon (39 strains) and smoked salmon (5 strains). Moreover, the screening for psychrophilic bacteria eliminated most of the strains isolated from smoked salmon. Of the 37 strains originally selected from smoked salmon, 32 (86.5%) grew at 30 °C and were not selected. On the opposite, 40 of 48 (83.3%) of the strains

Table 3. Number of colonies screened and selected per product.

Product name	Number of colonies covered	Number of colonies showing inhibition	Number of isolated colonies	Number of selected potential LAB
MAP shrimp	157	26	11	0
MAP rough head grenadier	520	24	7	3
MAP salmon	718	151	48	39
MAP sea-bream	240	11	13	5
MAP whiting	456	14	3	0
Smoked haddock	217	4	4	0
Smoked mackerel	121	0	0	0
Smoked herring	300	2	2	0
Smoked trout	354	0	0	0
Smoked tuna fish	368	0	0	0
Smoked shark	476	2	2	0
Smoked salmon	554	221	37	5
Red mullet viscera	371	0	0	0
Mackerel viscera	198	0	0	0
Herring viscera	39	0	0	0
Sea-bream viscera	184	1	1	0
Shrimp (fresh)	0	0	0	0
Salmon carpaccio	128	0	0	0
Salted cod	0	0	0	0
Roe cod (tarama)	174	0	4	0
Roe lumpfish, roe salmon	0	0	0	0
Marinated sardines, anchovy, mussel, pickled shell fish and pickled herring	0	0	0	0
Total	5575	456	132	52

Sébastien Matamoros, Marie-France Pilet, Frédérique Gigout, Hervé Prevost and Françoise Leroi

isolated from MAP salmon showed no growth at 30 °C and were selected. This is probably the result of the food processing : during cold smoking, temperature rises to 20-25 °C, which may inhibit psychrophilic strains. Fish viscera gave a smaller but still important number of colonies. However, none of them showed any interesting anti-microbial potential.

Inhibition spectrum

The aim of this experiment was to test the inhibiting capacities of the 52 isolated strains. They were tested against typical pathogenic and spoiling strains (later referred to as target strains). Most of the target strains chosen are commonly found in seafood products (Gram and Huss 1996). Others like *E. coli*, *Salmonella* or *B. subtilis* are not generally associated with seafood products, but can in rare outbreaks be isolated from these products (Heinitz and Johnson 1998; Huss 1997). The clustering analysis, based on the size of the inhibition zone of fourteen target strains, allowed the distinction of eight clusters, containing from one to 16 LAB strains. Mean inhibitory spectrum of each cluster is presented in Table 4. All strains showed inhibiting capacities against at least two of the fourteen target strains. No strain showed inhibition against all of the fourteen target strains. All strains showed inhibition against *L. monocytogenes*. This is important because *L. monocytogenes* is a common pathogenic bacterium found in seafood products. This also confirms the ability of LAB strains to easily inhibit *L. monocytogenes*. All strains inhibited at least one Gram positive and one Gram negative strain. However, the mechanism of inhibition needs to be investigated, as it is known that the nature of the antimicrobial compound (acid, bacteriocin, hydrogen peroxide) influence the inhibition of some strains, especially Gram negative (Helander 1997). One of the clusters (cluster 8) regrouped five strains showing the weakest inhibiting capacities, including negative control *Lb. curvatus*. Cluster 5 had a high inhibiting potential:

Table 4. Mean inhibitory spectrum of eight clusters of psychrophilic lactic acid bacteria against fourteen target strains. (the number represent the mean inhibition halo diameter of the group, in cm). Clusters are obtained by the Ward's hierarchical clustering method. Brackets: number of isolates/cluster.

Cluster	Target strain													
	Gram +							Gram -						
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. farciminis</i>	<i>B. thermosphacta</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. phosphoreum</i>	<i>S. putrefaciens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>Psychrobacter</i>
1 (16)	1	0	0	4	0	0	0	0	0	2.2	0	0	2	0
2 (12)	2	0	1	4	0	1	1	0	0	3	1	1	2	1.3
3 (6)	2	0	1	4	0	1	2	0	1	2	3	4	2	4
4 (9)	1.7	0	0	4	0	3	1	0	0	2	0	4	2	4
5 (2)	2	0	1	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
6 (1)	2	1	0	2	0	1	1	0	0	1	2	2	1	3
7 (2)	1	0	3	4	0	1	1	3	3	1	1	4	1	3
8 (5)	1	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0.2	0.2	0.4	0.2	1

Selection of psychotrophic bacteria active against spoilage and pathogenic micro-organisms

although it had weaker inhibition (*i.e.* smaller inhibiting zone diameter) than what could be seen in other clusters, it inhibited all target strains except *Staphylococcus xylosum*. Cluster 7 showed approximately the same inhibiting pattern than cluster 5, but with stronger inhibition of *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. It is also important to notice that typical seafood product spoiling bacteria are frequently inhibited: all clusters (except cluster 8) presented at least weak inhibition against *Pseudomonas* and *Serratia liquefaciens*. *P. phosphoreum* was inhibited by all clusters except clusters 1 and 4.

Conclusion

Lightly preserved seafood products offer a good range of LAB adapted to biopreservation. Smoked salmon and other MAP seafood products were the products that contained the highest levels of interesting LAB, providing nearly 85% of our final isolates. True psychophilic bacteria are quite rare and it appeared much easier to isolate psychophiles from products that have never been heated. Around 8% of the colonies investigated showed an inhibition capacity and less than 40% of the selected colonies finally matched the researched characteristics (psychophilic presumptive LAB). Some isolates, for example those from cluster 5 (coming from sea bream) and cluster 7 (coming from smoked salmon), exhibited an interesting spectrum against both pathogenic and spoiling microflora. These results are to be confirmed in seafood products. The non spoiling capacity of the selected LAB has also to be checked and a complete identification, using both phenotypic and molecular methods must be provided.

Acknowledgements

This work was performed within the Integrated Project (IP) SEAFODplus granted by the EU commission under contract n°FOOD-CT-2004-506359.

References

- Brillet A, Pilet MF, Prevost H, Bouttefroy A, Leroi F. 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol* 97:1029-1037.
- Brillet A, Pilet MF, Prevost H, Cardinal M, Leroi F. 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol* 104:309-324.
- Collins-Thompson DL. 1980. Food spoilage and food-borne infection hazards. In: Graham HD, editor. *Safety of foods*. 2nd ed. Mayaguez : University of Puerto Rico Mayaguez. p 15-53.
- Emborg J, Laursen BG, Dalgaard P. 2005. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 °C – effect of vacuum- and modified atmosphere- packaging on psychrotolerant bacteria. *Int J Food Microbiol* 101(3):263-279.
- Gonzalez-Rodriguez MN, Sanz JJ, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML. 2002. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int J Food Microbiol* 77:161-168.
- Gram L, Dalgaard P. 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Curr Opin Biotechnol* 13:262-266.
- Gram L, Huss HH. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol* 33:121-137.
- Gregersen T. 1978. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 5:123-127.
- Heinitz LM, Johnson JM. 1998. The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *J Food Prot* 61(3):318-323.

Sébastien Matamoros, Marie-France Pilet, Frédérique Gigout, Hervé Prevost and Françoise Leroi

- Helander IM, von Wright A, Mattila-Sandholm TM. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobial against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci Technol* 8(5):146-150.
- Huss HH. 1997. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control* 8(2):91-98.
- Leroi F, Joffraud JJ, Chevalier F, Cardinal M. 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 °C. *Int J Food Microbiol* 39:111-121.
- Rodgers S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – a review. *Trends Food Sci Technol* 12:276-284.
- Shewan JM, Murray CK. 1979. The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrophiles. In: Russel AD, Fuller R, editors. *Cold tolerant microbes in spoilage and the environment*. London: Academic Press. p 117-136.
- ten Brink B, Daminsk C, Joosten HMLJ, Huis in't Veld JHJ. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol* 11:73-84.
- Vermeiren L, Devlieghere F, Debevere J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int J Food Microbiol* 96:149-164.

Selection of psychrophilic lactic acid bacteria active against spoilage and pathogenic microorganisms relevant for seafood products

S. Matamoros^{1,2}, F. Chevalier¹, M.F. Pilet¹, H. Prevost¹ and F. Leroi²

¹ Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, ENIWA, Nantes

² Laboratoire de Sciences et Technologies Alimentaires Marines, IFREMER, Nantes

INTRODUCTION :

Biopreservation is a promising method of extending shelf-life of lightly preserved food products. It consists in adding bacterial cultures selected to prevent growth of spoiling and/or pathogenic bacteria. Lactic Acid Bacteria (LAB) are very common at the end of storage of lightly preserved products. Also, previous studies have already shown the interest of LAB in biopreservation.

The aim of this study was to isolate LAB from lightly preserved seafood products in order to have a collection of potentially protective strains, specifically adapted to seafood products

This work was performed within the Integrated Project (IP) SEAFOODplus granted by the EU commission under contract n° FOOD-CT-2004-504359

MATERIALS AND METHODS

First screening

Selection of colonies showing inhibition of indicator strain



51 samples (31 different products : MAP salmon, fresh shrimp, smoked mackerel, smoked trout, herring, vacuum, anchovy, sea cod (briana) ...)

Successive 10 fold dilutions, spreading on Elliker plates, incubation 10 days, 8°C, anaerobic conditions.

Then plates covered with double layer of soft BHI Agar containing indicator strains (*Listeria monocytogenes* EU2160, *Staphylococcus xylosus* EU2178, *Pseudomonas* EU2189 and *Serratia liquefaciens* EU2196).



RESULTS

About 7000 colonies covered :

PRODUCTS	NUMBER OF INHIBITING COLONIES
MAP salmon	151 (48)
Smoked salmon	221 (37)
MAP sea bream	11 (13)
MAP shrimp	24 (11)
MAP rough lead garnishes	24 (7)
Sea cod (Briana)	0 (4)
Smoked haddock	4 (4)
MAP salmon	14 (3)
Smoked herring	2 (2)
Smoked shark	2 (2)
Sea Bream vacuum	1 (1)
Sea fish fish vacuum, anchovy...	0

In brackets : number of selected colonies

132 strains selected for second screening

Second screening

Selection of psychrophilic Lactic Acid Bacteria

- growth at 15°C and 30°C in Elliker broth
- Gram test (KOH method), Catalase, oxydase

Selection of Gram+, catalase-, oxydase- strains, growing at 15°C but not at 30°C

52 strains selected for third screening

Third screening

Inhibition spectrum against 14 target strains

52 LAB strains tested



Spots of LAB incubated 10 days at 8°C, anaerobically

Soft agar containing spoiling and pathogenic strains : incubation 24 hours



Inhibition spots

Target strains used (and number of times they have been inhibited by one of the 52 LAB strain) :

Target Gram+ strains : *L. monocytogenes* (50), *E. sporogenes* (48), *D. lactimons* (34), *B. thermosphacta* (32), *S. aureus* (21), *B. subtilis* (2), *S. xylosus* (1)

Target Gram- strains : *Pseudomonas* spp (49), *Serratia liquefaciens* (48), *Psychrobacter* spp (35), *Shewanella putrefaciens* (34), *P. phosphoreum* (28), *Salmonella* spp (8), *E. coli* (2)

Clustering of the 52 LAB based on inhibition results, by Ward's hierarchical method (squared Euclidian distance) allowed identification of 8 distinct groups (one containing non-inhibiting strains)

7 interesting LAB selected

CONCLUSION :

These different steps of screening have allowed the selection of an interesting collection of psychrophilic inhibiting LAB. Gram negative inhibiting ability is quite original, and demands to be investigated later on. Further work must be carried on precise identification (physiological and molecular), technological abilities (application on lightly preserved products) and psychrophilic mechanisms (proteins and RNA).

Characterization of psychrophilic lactic acid bacteria for the biopreservation of seafood products

 MATAMOROS Sébastien¹, LEROI Françoise¹, PREVOST Hervé¹ and PILET Marie-France^{2*}
¹ Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, ENIWA, Nantes

² Laboratoire de Sciences et Technologies Alimentaires Marines, IFREMER, Nantes

INTRODUCTION :

Fifty two strains were previously isolated from various seafood products. Selection criteria were biopreservative abilities (against four target strains : *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus xylosum*, *Pseudomonas* and *Serratia liquefaciens*), psychrophilic behaviour (growth at 25°C but not at 30°C) and lactic acid bacteria characteristics (Gram positive, catalase and oxidase negative).

The objectives of this work were to enlarge the inhibition spectrum to 14 target strains relevant for seafood quality and safety, to select and identify the most promising strains and to precise their inhibition mechanisms.

This work was performed within the Integrated Project (IP) SEAFOODplus granted by the EU commission under contract n° FOOD-CT-2004-504359

MATERIALS AND METHODS

RESULTS

Inhibition spectrum against 14 target strains

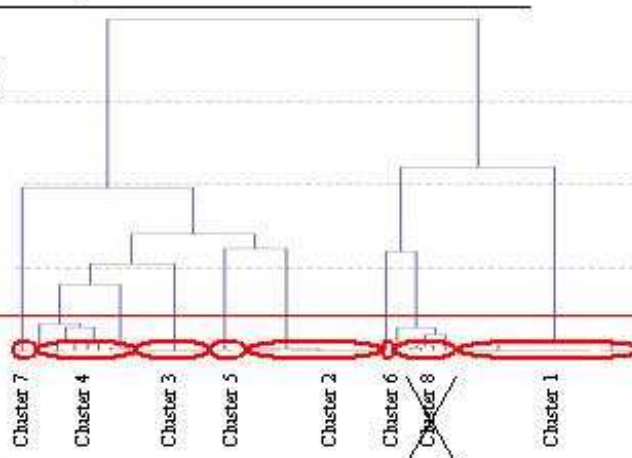
52 LAB strains tested by spotting on ELK agar and double layer covering with soft agar containing target strains selected amongst pathogenic and spoiling flora of seafood products

Target strains used (and number of times they have been inhibited by one of the 52 LAB strain) :

Target Gram+ strains : *L. monocytogenes* (70), *C. sporogenes* (45), *U. faecalis* (34), *B. thermophilus* (32), *S. aureus* (21), *B. subtilis* (2), *S. typhimurium* (1)

Target Gram- strains : *Pseudomonas* spp (49), *Serratia liquefaciens* (45), *Proteobacter* spp (37), *Shewanella putrefaciens* (34), *P. phosphoreum* (26), *Salmonella* spp (5), *E. coli* (2)

Clustering of the 52 LAB based on size of inhibition zone, by Ward's hierarchical method (squared Euclidian distance) allowed identification of 8 distinct groups (cluster 8 containing non-inhibiting strains that were not further investigated)



Clusters and strains identification

PCR amplification of 16S-23S rRNA intergenic spacer region and lactic acid production and configuration tested by Mycozym®

API gallery and 16S rRNA sequencing

All groups were homogeneous except group 4 where one isolate did not have the same profile (PCR and lactic acid configuration) than the other isolates of the group.

One isolate selected in each cluster

Strain identification : 3 *Leuconostoc inhae* (clusters 1, 4 and 7), 2 *Lactococcus piscium* (clusters 2 and 3), 1 *Lactobacillus fischeri* (cluster 5), 1 *Carnobacterium alterfundatum* (cluster 6).

Inhibition mechanism

Test realized on cell free culture supernatant (potential inhibiting activity) : pH adjustment (acidity), catalase (hydrogen peroxide), proteinase (bacteriocin like compounds).



Strain number	Species	Cluster	Number of Gram+ strains inhibited (out of 7) with presence of colony	Number of Gram- strains inhibited (out of 7) with presence of colony	Probable inhibition mechanism
FU2213	<i>Ln. inhae</i>	1	2	3	Competition
FU2229	<i>Ln. piscium</i>	2	5	5	Competition
FU2241	<i>Ln. piscium</i>	3	5	4	Competition
FU2247	<i>Ln. inhae</i>	4	4	4	Competition + bacteriocin
FU2255	<i>U. faecalis</i>	5	5	7	Competition
FU2257	<i>U. alterfundatum</i>	6	5	5	Competition
FU2242	<i>Ln. inhae</i>	7	5	7	Competition

Comparison of inhibiting mechanisms : number of strains inhibited in presence of colony (inhibition spectrum), and probable inhibition mechanisms determined by cell free culture supernatant analysis.

CONCLUSION :

The method of selection allowed the isolation of LAB strains growing at cold temperature, and presenting interesting inhibiting capacities against both Gram positive and Gram negative, pathogenic and spoiling strains. The strains selected amongst the different clusters were identified and their large inhibition spectrum and biopreservative capacities will be confirmed in products.

Comportement d'une bactérie lactique psychrotrophe à différentes températures

MATAMOROS Sébastien¹, LEROI Françoise², PREVOST Hervé¹ et PILET Marie-France¹¹ UMR-INRA 1014 SECALIM, ENITAA, Nantes, France² Département de Sciences et Technologies Alimentaires Marines, IFREMER, Nantes, France

INTRODUCTION

La souche de *Lactococcus* sp. EU2241 a été isolée à partir de saumon conditionné sous atmosphère modifiée. Elle a montré d'excellentes aptitudes à la biopréservation, augmentant la durée de vie de crevettes décoquillées sous vide ou de saumon fumé et permettant d'inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* sur du saumon fumé.

L'objectif de ces travaux est de caractériser le comportement de cette souche entre 0°C et 30°C, et d'identifier les mécanismes moléculaires intervenant dans sa capacité à s'adapter aux basses températures.

Profil de croissance en fonction de la température



La croissance à différentes températures de la souche EU2241 a été suivie par mesure de densité optique au Bioscreen C selon la méthode des dilutions successives (1).

Cette méthode permet d'estimer le taux maximal de croissance μ_{max} à chaque température par régression linéaire des intervalles de temps entre les courbes à une DO donnée (Fig.1).

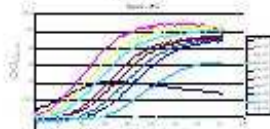


Fig.1 : Croissance de la souche EU2241 à 24°C suivie au Bioscreen C selon la méthode des dilutions successives.

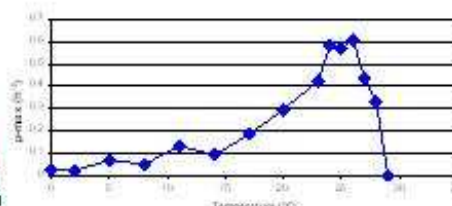


Fig.2 : Taux de croissance maximale de la souche EU2241 en fonction de la température.

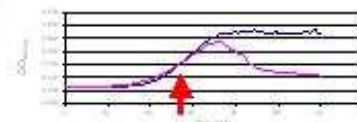


Fig.3 : Effet d'un transfert à 30°C sur la croissance de la souche EU2241. Courbe bleue : croissance à 24°C. Courbe violette : croissance à 24°C suivie d'un passage à 30°C (flèche rouge).

La courbe du taux de croissance de la souche EU2241 en fonction de la température révèle des caractéristiques inhabituelles pour une bactérie lactique : croissance jusqu'à 0°C, température optimale de croissance de 26°C, montrant une adaptation aux basses températures (Fig.2).

Par ailleurs l'absence de croissance à 30°C et l'arrêt de croissance après transfert de 26°C à 30°C (Fig.3) sont des propriétés habituellement non décrites chez les lactococques.

Identification d'une protéine surexprimée à basse température

L'analyse des protéines cytosolubles de la souche EU2241 au cours de la croissance à 5°C et 26°C a montré la surexpression à 5°C d'une protéine d'environ 7 kDa (Fig.4) qui a été extraite et identifiée comme une cold-shock protein (CSP). L'utilisation d'amorces dégénérées et d'une stratégie de PCR inverse a permis de déterminer chez EU2241 la séquence partielle du gène codant pour une protéine présentant des similarités avec d'autres CSP de bactéries lactiques (Fig.5).

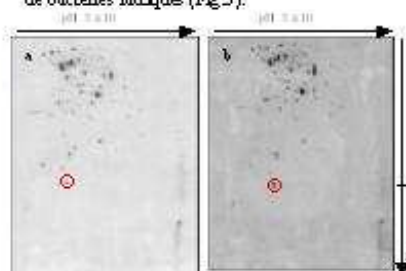


Fig.4 : Electrophorèse bidimensionnelle des protéines totales de la souche EU2241 à 24°C (a) et 5°C (b). Cercle rouge : protéine surexprimée pbs de 5°C à 5°C.

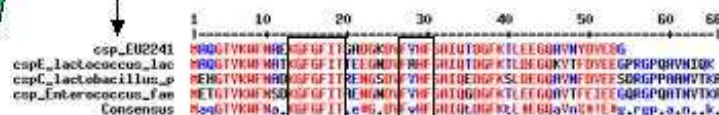


Fig.5 : Alignement des séquences protéiques les plus similaires à la séquence identifiée chez *Lactococcus* sp. EU2241. Les séquences consensus ENP1 et ENP2 de la fonction IARN sont encadrées.

CONCLUSION

La souche *Lactococcus* sp. EU2241 présente un comportement en fonction de la température original pour une bactérie lactique : température maximale de croissance proche de 30°C, et croissance rapide à basse température. Une clé de cette adaptation se trouve peut-être dans les cold-shock protein (CSP) dont un exemplaire a pu être identifié chez *Lactococcus* sp. EU2241. Son rôle exact dans l'adaptation au froid ainsi que la présence d'autres protéines du même type restent à confirmer.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet européen FP7-254700 (plus accessible par le lien <http://www.europarl.europa.eu/fr/press/2010/02/2010020201>)

(1) Matamoros et al., 1999, J Microbiol Meth 38, pp 137-146

Résumé

La biopréservation est une méthode de conservation des aliments qui consiste à inoculer un produit alimentaire avec des souches de bactéries sélectionnées, de manière à inhiber la croissance de microorganismes indésirables. Elle est destinée à être utilisée dans le cadre de la technologie des barrières, c'est à dire en combinaison avec d'autres méthodes douces de préservation (réfrigération, emballage sous vide ou atmosphère modifiée, lumière pulsée).

Des bactéries lactiques présentant des capacités inhibitrices ont d'abord été isolées à partir de produits de la mer. Parmi elles, 52 souches présentant toutes des capacités particulières de croissance au froid (croissance à 15°C mais pas à 30°C) ont été sélectionnées. Elles ont ensuite été identifiées par des méthodes phénotypiques et moléculaires, ce qui a permis de mettre en évidence la présence d'espèces rarement décrites dans les produits de la mer comme *Lactococcus piscium*, *Leuconostoc gelidum*, *Lactobacillus fuchuensis* et *Carnobacterium alterfunditum*. Ces isolats ont été testés contre 14 souches cibles faisant partie de la flore d'altération ou pathogène des produits alimentaires, ce qui a permis de les regrouper en fonction de leur pouvoir inhibiteur. Sept groupes intéressants ont été distingués et une souche représentative de chaque groupe a été choisie pour la suite des analyses. L'identification approfondie d'une souche de *Lactococcus piscium* présentant des caractéristiques phénotypiques de croissance à la température inhabituelles pour cette espèce, a montré qu'il s'agit d'une nouvelle espèce de *Lactococcus*.

Des essais de biopréservation ont été réalisés sur des produits de la mer faiblement préservés : crevettes décortiquées cuites et saumon fumé. Des analyses sensorielles ont permis de montrer que les souches appartenant à l'espèce *Leuconostoc gelidum* (EU2247 et EU2262) étaient les plus performantes pour l'allongement de la durée de vie de crevettes cuites emballées sous vide. Sur le saumon fumé au contraire, ce sont les bactéries appartenant à la nouvelle espèce *Lactococcus* sp. (EU2229 et EU2241) qui se sont révélées les plus performantes. Des co-cultures avec des bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholerae*) ont aussi été effectuées sur du saumon fumé. La souche de *Lactococcus* sp. EU2241 (non productrice de bactériocine) s'est révélée plus efficace que la souche de *Ln. gelidum* EU2247 (productrice de bactériocine) pour inhiber ces pathogènes, avec une inhibition atteignant 2 log par rapport au témoin non biopréservé.

Les mécanismes d'adaptation au froid de la souche *Lactococcus* sp. EU2241 ont été analysés. Ses caractéristiques de croissance ont été déterminées à différentes températures allant de 0 à 30°C Cette souche présente une croissance à 0°C (indiquer taux de croissance), un optimum à 26°C et une absence totale de croissance à 29°C ou au-delà . L'analyse du protéome par électrophorèse bidimensionnelle a montré la surproduction d'une protéine (plus de 5 fois) lors de la croissance à 5°C par rapport à la croissance à 26°C. Cette protéine a été identifiée en temps que protéine de choc froid, et le gène correspondant a pu être séquencé. Il a révélé des taux d'identité de plus de 80% avec les gènes d'autres protéines de la même famille provenant de bactéries lactiques telles que *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* ou *Enterococcus faecium*. Cette protéine a été nommée CspE en raison de sa ressemblance avec la protéine du même nom identifiée chez *Lc. lactis*. Il s'agit à notre connaissance de la première mise en évidence de la surproduction d'une protéine de choc froid pendant la croissance à température suboptimale pour une bactérie lactique.

Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid

Des souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir de produits de la mer et regroupées en fonction de leur pouvoir inhibiteur contre 14 bactéries appartenant à la flore d'altération ou pathogène de ces produits, dans le but de développer des applications en biopréservation. Elles ont été identifiées majoritairement comme *Leuconostoc gelidum*, et *Lactococcus piscium*. L'identification approfondie d'une souche de *Lc. piscium* montre qu'il s'agit d'une nouvelle espèce de *Lactococcus*. Des analyses sensorielles ont permis de montrer que 2 souches appartenant à l'espèce *Leuconostoc gelidum* permettait de prolonger la durée de vie de crevettes cuites emballées sous vide et qu'une souche de *Lactococcus* sp. avait le même effet sur du saumon fumé. Un test d'inhibition de bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholerae*) a été effectué sur du saumon fumé. La souche de *Lactococcus* sp. EU2241 (non productrice de bactériocine) s'est révélée plus efficace que la souche de *Ln. gelidum* EU2247 (productrice de bactériocine) pour inhiber ces pathogènes, avec une inhibition atteignant 2 log par rapport au témoin non biopréservé. Les caractéristiques de croissance de la souche *Lactococcus* sp. EU2241 à différentes températures ont montré un optimum de croissance à 26°C et aucune croissance à 29°C ou au dessus. L'analyse du protéome a révélé la surproduction d'une protéine de choc froid lors de la croissance à 5°C, et le gène correspondant a pu être identifié et séquencé. Il s'agit de la première mise en évidence de la surproduction d'une protéine de choc froid lors de la croissance à température suboptimale pour une bactérie lactique.

Mots clés : biopréservation, crevettes, saumon fumé, analyse sensorielle, protéine de choc froid, *Lactococcus* sp. nov., *Leuconostoc gelidum*, psychrotrophe.

Characterization of psychrotrophic lactic acid bacteria for food biopreservation. Physiologic and molecular study of cold adaptation mechanisms.

Lactic acid bacteria strains were isolated from seafood products and clustered according to their inhibiting capacities against 14 food borne spoiling and pathogenic strains in order to develop applications in biopreservation. Most of the strains were identified as *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium*. Detailed identification of one strain of the *Lactococcus piscium* strains suggests that it is a new specie. According to sensory analysis results, 2 strains belonging to the *Leuconostoc gelidum* specie were the most efficient for the enhancement of the shelf life of vacuum packed peeled and cooked shrimps. Similar results were obtained in cold smoked salmon with one strains of *Lactococcus* sp. A challenge test against three pathogenic strains (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae*) was performed in cold smoked salmon. The *Lactococcus* sp. EU2241 strain (non bacteriocinogenic) enabled a more efficient inhibition of the pathogens than the *Ln. gelidum* EU2247 strain (bacteriocinogenic). The maximum recorded inhibition was 2 logs compared to the uninoculated samples. Growth characteristics of strain *Lactococcus* sp. EU2241 were determined at different temperatures showed an optimal growth at 26°C and no growth at 29°C or above. Proteomic analysis showed a cold shock protein overproduction during growth at 5°C. The gene coding for this protein was identified and sequenced. Overproduction of a cold shock protein during growth at suboptimal temperature has never been described in a lactic acid bacterium before.

Keywords : biopreservation, shrimps, cold-smoked salmon, sensory analysis, cold-shock protein, *Lactococcus* sp. nov., *Leuconostoc gelidum*, psychrotrophic.