

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

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

Études des interactions entre une bactérie bioprotectrice,
Lactococcus piscium CNCM I-4031, et *Brochothrix*
thermosphacta et *Listeria monocytogenes*
dans la crevette tropicale

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Microbiologie
Spécialité : Microbiologie alimentaire

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Papa Abdoulaye Fall

Le 21 juin 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs Mme Marie-Christine Champomier-Verges, Chargé de recherche INRA, Jouy en Josas
Mme Anne Marie Révol-Junelles, Professeur INPL-ENSAIA, Nancy

Président M. Joël Fleurence, Professeur, Université de Nantes

Examineurs M. Emmanuel Coton, Professeur, Université Bretagne Occidentale, Brest
M. Guillaume Duflos, Ingénieur de recherche, Anses, Boulogne/mer

Directrice de thèse Mme Françoise Leroi, Chercheur, Ifremer, Nantes

Co-encadrante Mme Marie France Pilet, Maître de conférences, Oniris, Nantes

ED :
(Uniquement pour STIM et SPIGA)

A mon père et à ma mère qui ont toujours été là pour moi.
A ma femme et à ma fille qui m'ont donné la force d'y croire et la motivation.
A tout le reste de ma famille et à mes amis.

Remerciements

Je tiens à remercier Jean Luc Vallet et Jean Pascal Bergé directeur du laboratoire Science et Technologies de la Biomasse Marine (STBM) de m'avoir accueilli pour la réalisation de ce projet.

Je remercie tout particulièrement tous les membres du jury : Madame Marie Christine Champomier, Madame Anne Marie Révol, Monsieur Joël Fleurence, Monsieur Guillaume Duflos et Monsieur Emmanuel Coton, d'avoir bien voulu évaluer ce travail.

Je décerne la mention spéciale à ma directrice de thèse Françoise Leroi, cadre de recherche au laboratoire STBM de l'Ifremer de Nantes et ma co-encadrante Marie France Pilet, maître de conférence à ONIRIS/ENV de Nantes pour la qualité de leur encadrement, leur implication, leur disponibilité et le soutien sans faille dont elles ont fait preuve tout au long de ces trois années.

Je remercie par la même occasion, Régis Baron et Mireille Cardinal pour l'aide dans les parties modélisation et analyse sensorielle de ce projet.

Je remercie particulièrement mes techniciennes préférées : Frédérique Chevalier, Claire Donnay Moreno, Sandrine Bruzac, Josiane Cornet et Jacqueline Ratiskol pour leurs soutiens techniques.

Je ne saurai terminer sans remercier, l'ensemble des permanents et des thésards (Vincent Boursicot, Karine Le Roux, Kristelle Kouakou, Sabrina Macé, Anne Brillet, Gaëtan Podeur, Anaïs Penven, Elodie Cesbron) avec qui j'ai passé de bons moments.

Abréviations

- ✚ A3C : Association des Cuiseurs de Crevettes et de Crustacées
- ✚ ABVT : Azote Basique Volatil Total
- ✚ ATP : Adénosine Triphosphate
- ✚ DLC : Date Limite de Consommation
- ✚ DO : Densité Optique
- ✚ EFSA : European Food Safety Agency (Agence européenne de sécurité des aliments)
- ✚ GRAS : Generally Recognized as Safe
- ✚ HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point (Analyse des dangers, maîtrise des points critiques)
- ✚ HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide haute performance)
- ✚ IQ : Indice de Qualité
- ✚ LAB : Lactic Acid Bacteria (bactéries lactiques)
- ✚ LC-HRMS : Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution)
- ✚ MSMA : Model Shrimp Medium A (milieu modèle crevette A)
- ✚ OTMA : Oxyde de Triméthylamine
- ✚ QPS : Qualified Presumption of Safety (qualité de sécurité présumée)
- ✚ RMSE : Root Mean Square Error
- ✚ SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (électrophorèse en gel de polyacrylamide dodécyl sulfate de sodium)
- ✚ SSO : Specific Spoilage Organism (organisme d'altération spécifique)
- ✚ TMA : Triméthylamine
- ✚ TTGE : Temporal Temperature Gel Electrophoresis (Electrophorèse en gradient de température)
- ✚ UFC : Unité Formant Colonies

Abréviation des noms de bactéries ou d'organismes

- *B. thermosphacta* : *Brochothrix thermosphacta*
- *C. botulinum* : *Clostridium botulinum*
- *C. divergens* : *Carnobacterium divergens*
- *C. maltaromaticum* : *Carnobacterium maltaromaticum*
- *L. monocytogenes* : *Listeria monocytogenes*
- *L. piscium* : *Lactococcus piscium*
- *P. phosphoreum* : *Photobacterium phosphoreum*
- *P. vannamei* : *Penaeus vannamei*
- *S. putrefasciens* : *Shewanella putrefasciens*
- *St. liquefasciens* : *Serratia liquefasciens*
- *V. parahaemolyticus* : *Vibrio parahaemolyticus*

Valorisation de la thèse

Publications dans des revues internationales à comité de lecture :

1. **Fall, P.A.**, Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F. and Pilet, M.F. (2010). Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Letters in Applied Microbiology* 50, 357-361.
2. **Fall, P.A.**, Leroi, F., Chevalier, F., Guérin, C. and Pilet, M.F. (2010). Protective effect of a non-bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* strain against *Listeria monocytogenes* in sterilised tropical cooked peeled shrimp. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 19, 84-92.
3. **Fall, P.A.**, Pilet, M.F., Leduc, F., Cardinal, M., Duflos, G., Guérin, C., Joffraud, J.J. and Leroi, F. (2011). Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *B. thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 during storage at 8°C. *International journal of Food Microbiology*: in press
4. **Leroi, F.**, Fall, P.A., Pilet, M.F., Chevalier, F., and Baron, R. (2011). Influence of temperature, pH and NaCl concentration on maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Food Control*: soumise

Communications orales:

Fall, P.A., Leroi, F., Matamoros, S., Prévost, H., Pilet, M.F. *Lactococcus* sp. EU2241, an atypical strain for biopreservation of seafood products? Trans Atlantic Fisheries Technology (TAFT, 15-18 Sept 2009, Copenhagen, Denmark).

Fall, P.A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F. and Pilet, M.F. Spoilage prevention of cooked peeled shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. Food Micro 2010 (30 Août-3 Sept 2010, Copenhagen, Denmark).

Fall, P.A., Leroi, F., Matamoros, S., Chevalier F., Pilet, M.F. Inhibition de *Brochothrix thermosphacta* et amélioration des la qualité organoleptique de crevettes décortiquées cuites par *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. Société Française de Microbiologie (2-4 Juin 2010, Marseille, France)

Communications affichées:

Fall, P.A., Leroi, F., Zagorec, M., Guérin C., Champomier, M., Pilet, M, F.

Improving the quality of cooked and peeled shrimp with *Lactococcus* sp. EU2241: an Explanation. Colloque EFFOST, 2009, Budapest.

Fall, P.A., Leroi, F., Matamoros, S., Rossero, A., Pilet, M.F.

Lactococcus sp. EU2241, un lactocoque atypique à activité bioprotectrice. Colloque CBL, 2009, Toulouse.

Fall, P.A., Leroi, F., Chevalier, F., Pilet, M.F.

Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactococcus* sp. EU2241 in tropical shrimp. Colloque ISOPOL, 2010, Porto.

***Lactococcus* sp. EU2241, an atypical strain for biopreservation of seafood products?**

Presenting author : Papa Abdoulaye Fall⁽¹⁻²⁾, co-authors : Françoise Leroi⁽¹⁾, Sébastien Matamoros⁽¹⁻²⁾, Hervé Prévost⁽²⁾ and Marie-France Pilet⁽²⁾

⁽¹⁾Département des Sciences et Techniques Alimentaires Marines, Ifremer, BP 21105, Rue de l'île d'Yeu 44311 Nantes Cedex 03, France.

⁽²⁾UMR SECALIM, ENITIAA, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 03, France.



Present position:

PhD student

Education and professional employments:

Master of Science in Environmental Microbiology from Pau University (France) in 2007.

Research areas: Food Microbiology

Selected major and/or recent papers:

Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Kasbi Chadli, F., Cornet, J., Prévost, H. and Pilet, M.F. (2009a) Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packed cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *J Food Prot*, **72**, 365-374.

Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost, H. and Leroi, F. (2009b) Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria *Food Microbiol*, In press.

Biopreservation is an alternative technology for preservation of food, which consists in inoculating a product with selected bacteria that eliminate or prevent growth of undesirable microorganisms without changing the sensory and nutritional properties. Previously, a strain of *Lactococcus* sp. had been isolated from raw salmon and showed capacities to enhance the sensory shelf-life of naturally contaminated cooked/peeled shrimps and cold-smoked salmon. This year, it was shown that the inhibitory spectrum of *Lactococcus* sp. EU2241 was wide, 19 out of 25 pathogens and spoiling bacteria being inhibited, using a Petri dish double layer method with Elliker agar. No production of bacteriocin was recorded. When the experiments were repeated on shrimp juice agar, no inhibition was observed, showing that the mechanism of action depended on the matrix. The inhibition capacities were then tested in shrimp artificially contaminated with selected bacteria. Six batches of cooked shrimps were prepared. 1: sterility control; 2: inoculation with *Lactococcus* sp. EU2241 (10^6 CFU/g); 3: *Listeria monocytogenes* (10^3 CFU/g); 4: *Brochothrix thermosphacta* (10^3 CFU/g); 5: co-inoculation of *Lactococcus* and *Lm*; 6: co-inoculation of *Lactococcus* and *Bt*. Shrimps were stored at 8°C for 21 days under modified atmosphere (CO₂/N₂ 50-50). An immediate inhibition of target bacteria reaching more than 4 logs at the end of the storage was observed in co-inoculated batches. Sensory analysis with a panel of eleven trained judges confirmed that *Bt*, frequently isolated from cooked shrimp, was a spoiling microorganism. In co-culture with *Lactococcus* sp. EU2241, samples were not spoiled till 21 days, and the strain alone was not detected by the panellists, confirming the interest of this bacterium for an application in biopreservation of seafood products. However, the mechanism of action is not elucidated but a chemically defined liquid medium is currently developed to study the inhibition mechanisms.

Identification using total sequencing of 16S rDNA showed 99% of homology with the type strain of *Lactococcus piscium* DSM6634. DNA-DNA hybridization performed by two laboratories showed 52% and 68% of similarity between *Lactococcus* sp. EU2241 and the type strain. AFLP analysis confirmed that *Lactococcus* sp. EU2241 is closed to *Lactococcus piscium* but may constitute a new species. Its atypical growth temperature profile (growth at 0°C and death at temperature higher than 30°C) constitute an advantage for a biopreservation of refrigerated food products.



FOOD MICRO 2010 - Copenhagen 30 August - 3 September

Title: Spoilage Prevention of Cooked Peeled Shrimp By *Lactococcus piscium* CNCM I-4031

Abstract: Food micro 2010

Biopreservation a natural technology to prevent growth of unwanted bacteria in ready to eat food by using lactic acid bacteria is the predilection field for our laboratory that possess a collection of microorganisms useful for this technology. Among these, a strain, *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 had been isolated from raw steak salmon and showed capacities to enhance the sensory shelf-life of naturally contaminated cooked/peeled shrimp and cold-smoked salmon without bacteriocin production.

The aim of this present survey was to bring to light factors capable of explaining the bioprotective effect of *L. piscium* CNCM I-4031. The inhibition capacities of this strain were tested in sterile cooked/peeled shrimp artificially contaminated with *Brochothrix thermosphacta* (*Bt*), the main spoilage bacterial specie in such products evidenced in some studies. Four batches of ionized cooked peeled shrimp were prepared in triplicate. 1: sterility control; 2: inoculation with *L. piscium* (10^6 CFU g^{-1}); 3: inoculation with *Bt* (10^3 CFU g^{-1}); 4: co-inoculation with *L. piscium* and *Bt*. Shrimp were packed under modified atmosphere (CO_2/N_2 50-50) and stored at 8°C for 31 days. At regular interval, chemical (lactic and acetic acids, O-TMA, TMA, volatile compounds), microbial, pH and sensory analyses were performed. Microbial monitoring indicated that *L. piscium* CNCM I-4031 and *Bt* are well adapted in shrimp matrix reaching their maximum cell number (10^9 CFU g^{-1}). In co-inoculated batch, growth of *Bt* was reduced by 3.3 log at 10 days till the end of storage by *L. piscium*. The pH decrease after 7 days (6.5 to 5.9) correlated with lactic acid produced by *L. piscium* (26 mM) did not totally explain these results as their variation is limited. To explain this inhibition, a chemical defined liquid medium similar to shrimp composition was settle and a competition for a specific nutrients is currently tested. Sensory analysis with a panel of eleven trained judges confirmed that *Bt*, frequently isolated from cooked shrimp, was a spoiling microorganism (at 10 days) associated with an emission of strong butter caramel off-odour. Among all the volatile compounds detected by SPME/GC/MS, 2,3 butanedione was presumed responsible of this off-odour. In co-culture with *L. piscium*, samples were not spoiled till 31 days, and the strain alone was not detected by the panellists, confirming the interest of this bacterium for Biopreservation. afood.products.



INHIBITION DE *BROCHOTHRIX THERMOSPACTA* ET AMELIORATION DE LA QUALITE ORGANOLEPTIQUE DE CREVETTES DECORTIQUEES CUITES PAR *LACTOCOCCUS PISCIIUM* CNCM I-403

Papa Abdoulaye Fall^{1,2}, Françoise Leroi¹, Sébastien Matamoros^{1,2}, Frédérique Chevalier¹ et Marie-France Pilet²

¹Laboratoire Science et Technologie de la Biomasse Marine, Ifremer, BP 21105, Rue de l'île d'Yeu 44311 Nantes Cedex 03

²UMR-INRA 1014 SECALIM ONIRIS Site de la Géraudière BP 82225, 44322 Nantes Cedex 03

La biopréservation, technologie de barrière utilisant des microorganismes (bactéries lactiques) capables d'inhiber le développement des flores indésirables dans les produits alimentaires, est une méthode alternative à l'utilisation de conservateurs chimiques. Assez étudiée pour des activités contre les pathogènes, cette technologie reste encore peu développée pour lutter contre des germes d'altération et les applications dans les denrées non fermentées comme les produits de la mer sont limitées. Pour lutter contre la flore d'altération des crevettes cuites décortiquées conditionnées sous atmosphère modifiée, une collection de bactéries lactiques à caractère anti-microbien isolées de produits marins a été mise en place au niveau de notre institut. Parmi celles ci, une souche de *Lactococcus*, a permis de retarder, l'altération sensorielle de crevettes cuites décortiquées et de saumon fumé naturellement contaminés, conditionnés sous vide (Matamoros et al., 2009) sans qu'aucune corrélation n'ait été trouvée entre les flores énumérées et l'amélioration de la qualité des produits. L'utilisation de tests phénotypiques et le séquençage complet du gène codant pour l' ARNr 16S ont permis d'affilier cette souche à l'espèce *piscium*. Elle a été déposée dans la collection nationale de microorganismes de l'Institut Pasteur (Paris, France) sous la référence CNCM I-4031.

Le but de cette étude est de déterminer si le potentiel bioprotecteur de *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 est lié à l'inhibition d'une flore d'altération spécifique. Cette souche a donc été testée sur des crevettes cuites décortiquées stériles sous atmosphère modifiée en présence de *Brochothrix thermosphacta*, bactérie dont le rôle dans l'altération des crevettes a été récemment démontré par certaines études.

Des crevettes tropicales crues (*Penaeus vannamei*) congelées en provenance de Colombie ont été utilisées pour réaliser les Challenge tests. Après cuisson et congélation à -80°C. elles ont été traitées par ionisation à 3.75 kGy (IONISIS Pouzaugues, France). Les crevettes ont ensuite étéensemencées avec les cultures de *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 et *B. thermosphacta*, à 10⁶ et 10³ UFC g⁻¹ respectivement, mises sous atmosphère modifiée (50%N₂-50%CO₂) et stockées à 8°C pendant 31 jours. Quatre types de lots en triplicat ont été réalisés: 1-lot de témoin stérile, 2- lot inoculé par *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, 3- lot inoculé par *B. thermosphacta*, 4- lot co-inoculé par *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 et *B. thermosphacta*. Des analyses microbiologiques et biochimiques ainsi qu'un suivi sensoriel par un jury entraîné d'une douzaine de personnes ont été réalisés à intervalles réguliers pendant la durée de conservation.

Les résultats ont montré une bonne implantation de la souche bioprotectrice (10⁹ UFC g⁻¹) au bout de 4 jours, sans modification sensorielle du produit. *B. thermosphacta* s'adapte aussi bien sur le produit en atteignant la même densité de population que *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, après seulement 14 jours de conservation. Par ailleurs, *B. thermosphacta* s'est révélé être un germe très altérant. Après 11 jours, le lot inoculé par *B. thermosphacta* a été déclaré altéré avec une forte odeur de beurre caramel liée à la production de 2,3 butanedione (diacétyl). En présence de *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 son développement a été limité (4 log UFC g⁻¹ de moins qu'en culture pure) et aucune dégradation organoleptique n'a été constatée pendant les 31 jours de conservation dans ce lot, permettant ainsi une extension de la durée de conservation de plus de 3 semaines. Malgré une baisse de pH de 6.6 à 5.9 en 7 jours dans le lot 2 et le lot 4, aucune différence notable n'a été décelée par le jury d'analyse sensorielle entre ces lots inoculés par *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 et le témoin. L'ensemble de ces résultats montre l'efficacité de *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 pour lutter contre *B. thermosphacta* dans la matrice crevette. *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 pourrait être une bonne candidate pour la technologie de biopréservation, notamment dans les produits où *B. thermosphacta* est l'altérant majeur comme d'autres produits de la mer ou certains produits carnés.

L'action inhibitrice de *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 n'est pas liée à une production de bactériocine ni de peroxyde d'hydrogène ; par ailleurs, compte-tenu de la faible baisse du pH l'implication des acides organiques ne suffit pas à expliquer l'inhibition. L'hypothèse d'une compétition nutritionnelle ou d'une combinaison de facteurs inhibiteurs sera testée afin d'élucider les mécanismes d'action impliqués dans l'inhibition de *B. thermosphacta*.

1. Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Chadli, F.K., Cornet, J., Prevost, H., and Pilet, M.F. (2009) Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *J Food Prot* **72**, 365-374.

IMPROVING THE QUALITY OF COOKED PEELED SHRIMP WITH *LACTOCOCCUS* SP. EU2241 : AN EXPLANATION



Papa Abdoulaye Fall^{1,2}, Françoise Leroi¹, Monique Zagorec³,
Camille Guérin¹, Marie-France Pilet², Marie Champomier Vergès³

¹Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine Ifremer

²UMR-INRA 1014 SECALIM ENVN/ENITIAA

³UR308 INRA Unité Flore Lactique et Environnement Carné (FLEC)



INTRODUCTION

Biopreservation, a new approach consisting to prevent growth of unwanted microorganisms in food by using endogenous or added microorganisms, generally lactic acid bacteria, is more and more investigated for its natural principle. A strain of *Lactococcus* sp. close to *L. piscium* had been isolated from raw salmon and showed capacities to enhance the sensory shelf-life of naturally contaminated cooked/peeled shrimp and cold-smoked salmon. No correlation was found between microbial counts and sensory quality.

Brochothrix thermosphacta (*Bt*), a spoilage organism in meat product, was evidenced in many studies as the main spoilage bacterial specie in tropical shrimp. In the present study and in order to explain the previous results, the inhibition capacities of *Lactococcus* sp. EU2241 were tested in cooked/peeled shrimp artificially contaminated with *Bt* under modified atmosphere (MA)

Penaeus vannamei



Cooked at 100°C, 2.5 min
in salted water 3%



Cooled at 4°C
Ionized (3.75 kGy)

Inoculation



10% v/w, 4 batches



MAP (50% N₂ – 50% CO₂)
Stored 8°C, 38 days

- 1- Sterility control
- 2- *Lactococcus* sp. EU2241 10⁶ CFU g⁻¹
- 3- *B.thermosphacta* 10³ CFU g⁻¹
- 4- *Bt* 10³ CFU g⁻¹ + EU2241 10⁶ CFU g⁻¹

Microbial counts
Acid production
pH monitoring
Sensory analysis (12 trained judges)
Twice a week

1 - When inoculated alone EU2241 and *Bt* grew very well in shrimp reaching 10⁹ CFU g⁻¹ in 3 days and 10 days respectively.

2 - In co-inoculated batch *Bt* was inhibited by EU2241 by 3.5 log after 10 days of storage at 8°C.

3 - In batch inoculated with *Bt* alone, the product was spoiled after 10 days of storage, with strong butter/caramel off-odours.

4 - In co-inoculated batch the product was not spoiled and the shelf life was extended more than 3 weeks.

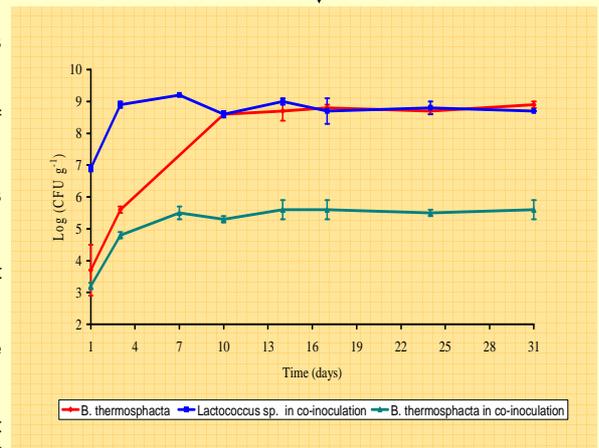
5 - Sensory analysis indicated that EU2241 alone did not spoil the product within 38 days.

6 - No acid acetic was produced. 2452 ppm of lactic acid and a pH decrease from 6.61 to 5.96 was recorded in co-inoculated batch.

7 - The use of predictive model of *Bt* growth according to different environmental factors shows that lactic acid and pH decrease did not totally explain the inhibition.

8 - *Bt* inhibition was not due to bacteriocin production.

9 - Others mechanisms such as competition for specific nutrients may also contributed to the inhibition.



Growth of *Lactococcus* sp. EU2241 and *B.thermosphacta* in cooked peeled shrimp packed under MA at 8°C

CONCLUSION & PERSPECTIVES

This study demonstrated that *Lactococcus* sp. EU2241 is useful for biopreservation of seafood products by inhibiting spoilage microorganisms i.e *Bt*. More knowledge about inhibition mechanisms are necessary to improve the antimicrobial activity of EU2241. To elucidate the inhibition mechanisms, co-culture experiments will be performed in diffusion chamber growth system with a membrane filter in chemical defined medium simulating shrimp composition.

INHIBITION OF *Listeria monocytogenes* BY *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 IN TROPICAL SHRIMP



Papa Abdoulaye Fall^{1,2}, Françoise Leroi¹, Frédérique Chevalier¹
Marie-France Pilet^{1,2}

¹Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, Ifremer, Nantes, France

²UMR-INRA 1014 SECALIM, ONIRIS, Nantes, France

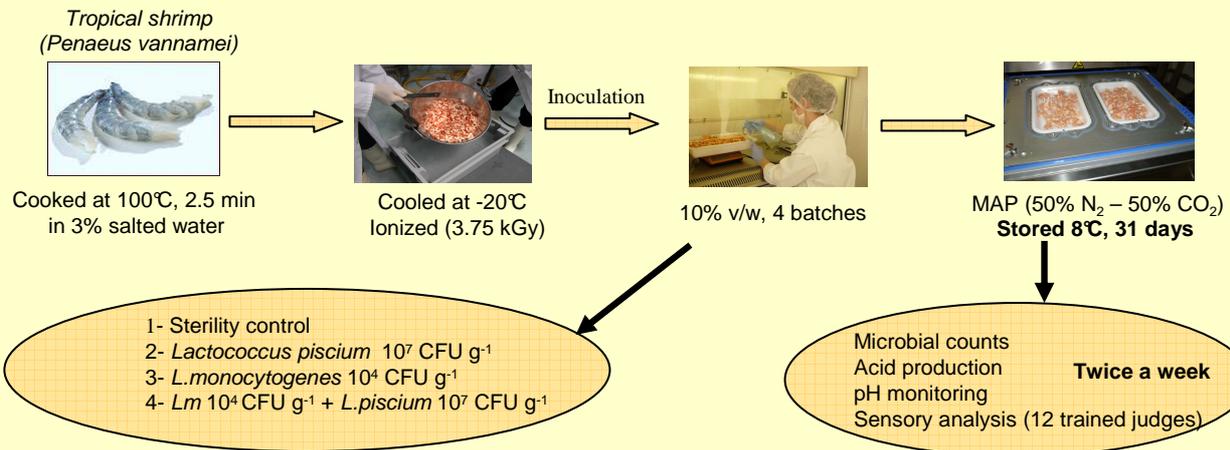
Papa.Abdoulaye.Fall@ifremer.fr

INTRODUCTION

Biopreservation, a new approach consisting to prevent growth of unwanted microorganisms in food by using endogenous or added microorganisms, generally lactic acid bacteria, is more and more investigated for its natural principle as alternative of chemical preservatives. A strain, *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 had been isolated in previous work from raw salmon steaks and showed capacities to enhance the sensory shelf-life of naturally contaminated cooked/peeled shrimp and cold-smoked salmon.

Listeria monocytogenes is a food borne pathogens generally associated with ready to eat food products, thereby constituting a safety risk for consumers when hygienic practices are not respected. In the present study, the protective effect of *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 was tested in cooked/peeled shrimp artificially contaminated with *Lm* and packed under modified atmosphere (MAP).

MATERIALS & METHODS



RESULTS

- 1 - When inoculated alone **CNCM I-4031** and ***Lm*** grew very well in shrimp reaching **10⁹ CFU g⁻¹** in 4 days and 14 days respectively (Fig.1)
- 2 - In co-inoculated batch ***Lm* was inhibited by CNCM I-4031 by 3.5 to 4 log** from the 7th day till the end of the storage period at 8°C.
- 3 - A pH decrease from 6.5 to 5.9 and production of 26 mM of lactic acid were observed in the co-inoculated batch. Acid acetic was not produced.
- 4 - The use of predictive model (SSSP v.3.1, <http://sssp.dtuqua.dk>), of *Lm* growth according to different shrimp characteristics shows that this **lactic acid** concentration and the **pH decrease did not totally explain the inhibition**.
- 5 - *Lm* inhibition was not due to bacteriocin production.
- 6 - Others mechanisms such as competition for specific nutrients may also contribute to the inhibition.

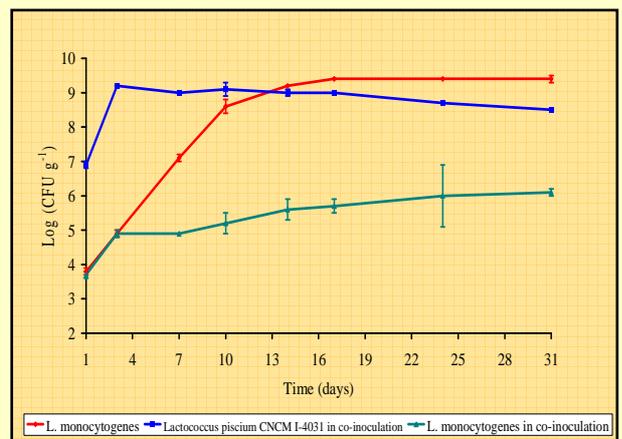


Fig.1 : Growth of *Lactococcus* CNCM I-4031 and *L.monocytogenes* in cooked peeled shrimp under MAP at 8°C

CONCLUSION & PERSPECTIVES

This study demonstrated that *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 would be useful for ensuring the safety of seafood products by inhibiting the food borne pathogens *Lm*. More knowledge about inhibition mechanisms are necessary to improve the antimicrobial activity of CNCM I-4031. The hypothesis of nutrients competition is being tested in chemical defined liquid medium close to shrimp composition by co-cultures and sequential cultures.

Lactococcus sp. EU2241, un lactocoque atypique à activité bioprotectrice



Papa Abdoulaye Fall^{1,2}, Françoise Leroi¹, Sébastien Matamoros^{1,2}, Albert Rossero² et Marie-France Pilet²



¹Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine Ifremer
²UMR-INRA 1014 SECALIM ENVN/ENITIAA

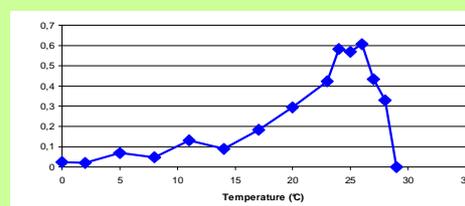
La biopréservation, technologie de barrière utilisant des microorganismes (bactéries lactiques) capables d'inhiber les flores indésirables dans les aliments est une méthode alternative à l'utilisation de conservateurs chimiques. Assez étudiée pour des activités contre les pathogènes, cette technologie reste encore peu développée pour lutter contre des germes d'altération, et les applications dans les denrées non fermentées comme les produits de la mer sont limitées.

A partir d'une collection de 52 bactéries lactiques isolées de produits marins pour leurs capacités anti-microbiennes, un groupe de 18 souches inhibant des bactéries d'altération de produits de la mer comme *Brochothrix thermosphacta*, *Photobacterium phosphoreum*, *Serratia liquefaciens* a été mis en évidence. Par des analyses du profil des régions intergéniques 16S-23S, PCR-RFLP et des tests phénotypiques, ces souches ont été identifiées comme des *Lactococcus* spp. et 14 profils ont été mis en évidence par électrophorèse en champ pulsé.

La présente étude se propose de procéder à l'identification précise d'un de ces isolats, *Lactococcus* sp. EU2241 et de tester son efficacité en biopréservation.

CARACTERISATION DE *Lactococcus* sp. EU2241

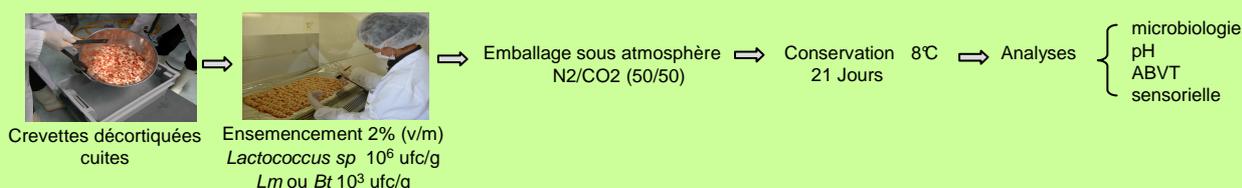
Analyses / Souche	ARNr 16S	Hybridation ADN-ADN	AFLP
<i>Lactococcus</i> sp. EU2241	99% similarité <i>L.piscium</i> ^T	51% <i>L.piscium</i> ^T	40% de similarité <i>L.piscium</i> ^T



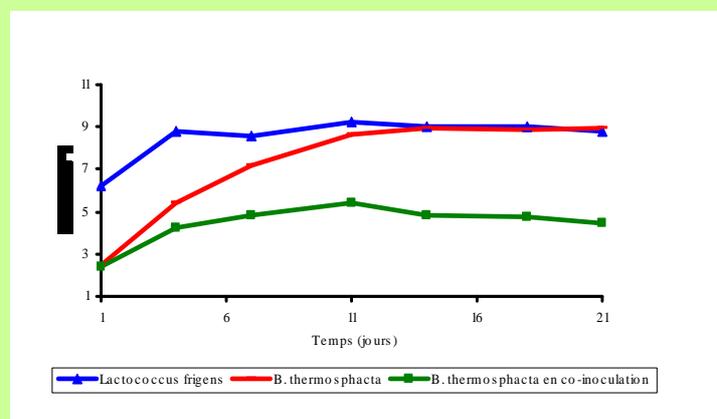
La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche EU2241 a permis de l'identifier comme appartenant à l'espèce *piscium*. Cependant le profil de croissance en fonction de la température (fig. 1) qui montre un optimum à 26°C et une absence de croissance à 30°C, et les résultats d'hybridation ADN-ADN et d'AFLP (tab.1) montrent que cette souche est un *Lactococcus* atypique proche de l'espèce *piscium*.

APPLICATION A LA BIOPRESERVATION

5 types de cultures ont été testés: *Lactococcus* sp. EU2241 seule; *B.thermosphacta* seule; *L.monocytogenes* seule; *Lactococcus* +*Bt*; *Lactococcus* sp. EU2241+*Lm*



Lactococcus sp. EU2241 seule n'altère pas le produit pendant la durée de conservation
Altération du produit par *B.thermosphacta* au bout de 11 jours de conservation
Inhibition de la croissance de *B.thermosphacta* (fig. 2) et *L.monocytogenes* (4 log pendant la durée de conservation)
Amélioration de la qualité organoleptique du produit par EU2241 en co-inoculation avec *B.t*
Baisse du pH dans les lots avec EU2241 non perceptible en analyse sensorielle
Aucune corrélation trouvée entre l'altération et la production faible d'amine basique volatile totale par *B.t*



CONCLUSION

Lactococcus sp. EU2241 semble être une souche proche de l'espèce *piscium* selon les résultats des analyses génétiques. Elle présente un profil de croissance et d'inhibition de bactéries d'altération et pathogènes faisant d'elle une bonne candidate pour des applications en biopréservation.

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1. La filière crevette	4
1.1 Généralités.....	4
1.2 Données économiques.....	4
1.3 Technologie de transformation.....	6
2. Le produit crevette tropicale	9
2.1 Caractéristiques physico-chimiques et composition	9
2.2 Caractéristiques microbiologiques	9
2.2.1 Microbiote de la crevette fraîche vivante.....	9
2.2.2 Microbiote de la crevette conservée crue.....	10
2.2.3 Microbiote de la crevette conservée cuite.....	10
2.3 Altération de la crevette	12
2.3.1 Altération d'origine physico-chimique	12
2.3.2 Micro-organismes responsables de l'altération	12
2.3.3 <i>Brochothrix thermosphacta</i> , une bactérie spécifique d'altération de la crevette	14
2.3.4 Méthodes d'évaluation de l'altération	14
2.4 Les micro-organismes pathogènes	15
3. Maîtrise des micro-organismes d'altération et des pathogènes par des micro- organismes protecteurs	19
3.1 La biopréservation : une technologie de barrière alternative pour les produits de la mer	19
3.1.1 Définition de la biopréservation.....	20
3.1.2 Exemples d'application de la biopréservation dans des produits de la mer.....	20
3.1.3 <i>Lactococcus piscium</i> , une espèce d'intérêt pour la biopréservation ?	21
3.2 Mécanismes d'interactions bactériennes	23
3.2.1 Production de métabolites inhibiteurs.....	23
3.2.2 Compétition nutritionnelle	25
3.2.3 La métabiose	25
3.3 Réglementation de l'utilisation des microorganismes protecteurs.....	26
4. La microbiologie prévisionnelle pour prévoir le développement et les interactions bactériennes	27
4.1 Les modèles prédictifs.....	28
4.1.1 Les modèles primaires	28
4.1.2 Les modèles secondaires.....	28
4.2 Méthodologie pour des modèles progressifs.....	29
4.3 Applications	31

RESULTATS

CHAPITRE 1	33
1-1 Inhibition de <i>Brochothrix thermosphacta</i> et amélioration de la qualité organoleptique de la crevette tropicale cuite décortiquée par <i>Lactococcus piscium</i> CNCM I – 4031	33
1-2 Évolution physico-chimique et sensorielle de la crevette tropicale cuite décortiquée inoculée avec <i>Lactococcus piscium</i> CNCM I – 4031 et <i>Brochothrix thermosphacta</i> et entreposée à 8°C.....	41
CHAPITRE 2	66
2-1 Influence de la température, du pH et du taux de sel (NaCl) sur le taux de croissance de <i>Lactococcus piscium</i> CNCM I – 4031 et <i>Brochothrix thermosphacta</i> en milieu modèle	50
2-2 Effet de la variation des paramètres physico-chimiques et du taux d'inoculum initial de <i>Lactococcus piscium</i> sur la croissance de <i>Brochothrix thermosphacta</i> et sur la qualité organoleptique des crevettes cuites décortiquées	74
CHAPITRE 3	94
3-1 Effet protecteur d'une souche non productrice de bactériocine contre <i>Listeria monocytogenes</i> dans la crevette tropicale cuite décortiquée et stérile	94
3-2 Nature et élucidation des interactions entre <i>Lactococcus piscium</i> et <i>Listeria monocytogenes</i>	107
CONCLUSION & PERSPECTIVES	124
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133

Introduction Générale

INTRODUCTION

La crevette est l'un des produits de la mer les plus commercialisés dans le monde. En France, la demande globale pour les crevettes cuites, particulièrement les crevettes tropicales est en croissance continue. Cependant, ce produit est très sensible d'un point de vue microbiologique, du fait de ses caractéristiques physico-chimiques : pH neutre, salinité faible, présence de composés azotés de faible poids moléculaire (Jeyasekaran *et al.*, 2006), facilitant le développement de micro-organismes d'origine endogène ou provenant de recontaminations au cours du procédé de fabrication. Certains de ces micro-organismes sont responsables de l'altération sensorielle des produits (Chinivasagam *et al.*, 1998). Par ailleurs, des germes pathogènes naturellement présents dans l'environnement ou issus d'une contamination croisée peuvent s'implanter dans le produit et ainsi poser des problèmes sanitaires graves (Gopal *et al.*, 2005; Gudmundsdóttir *et al.*, 2006b).

Le développement de cette flore indésirable est retardé par l'utilisation de techniques classiques telles que la conservation à basse température, le salage ou la modification de l'atmosphère dans les emballages. Cependant, l'utilisation d'additifs conservateurs, essentiellement des acides organiques, est souvent nécessaire pour protéger les produits et augmenter les dates limites de consommation (DLC). La demande croissante de la part des consommateurs pour des produits contenant moins de conservateurs et des méthodes plus « naturelles » de préservation, incite les industriels à explorer d'autres possibilités de conservation. Parmi les technologies alternatives à l'utilisation de ces additifs, la biopréservation, qui consiste à ajouter des flores de biopréservation destinées à limiter le développement des flores indésirables est une solution de plus en plus étudiée. Les micro-organismes utilisés, appartenant pour la plupart au groupe des bactéries lactiques, sont sélectionnés sur des critères physiologiques et métaboliques singuliers, et sont capables d'inhiber la croissance des flores indésirables par le biais de la production de peptides inhibiteurs, d'autres métabolites ou par des phénomènes de compétition. Dans les produits de la mer, la technologie de biopréservation a surtout été étudiée pour maîtriser le développement de bactéries pathogènes telles que *Listeria monocytogenes* dans les produits sensibles comme le poisson salé fumé à froid. Les applications de la biopréservation pour limiter le développement des flores d'altération sont plus restreintes mais se sont développées également ces dernières années (Pilet et Leroi, 2011). Dans une étude récente menée pour élargir les applications de cette technologie de barrière à la maîtrise de l'altération,

(Matamoros *et al.*, 2009b) ont isolé une souche de bactérie lactique psychrotrophe, *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, qui présente une aptitude à inhiber en milieu modèle un certain nombre de bactéries pathogènes et altérantes présentes dans les produits de la mer. Par ailleurs cette souche a montré des capacités à retarder l'altération sensorielle de saumon fumé et de crevettes cuites naturellement contaminés, sans qu'il ait été possible de faire le lien avec l'inhibition spécifique de micro-organismes classiquement utilisés comme indicateurs d'altération (Matamoros *et al.*, 2009a). Les études préliminaires concernant cette souche ont montré que l'inhibition n'est pas liée à une production de bactériocine contrairement à la plupart des bactéries bioprotectrices actuellement décrites. Dans un contexte réglementaire encore imprécis pour l'utilisation de souches de bactéries lactiques comme agents de bioprotection, il s'avère nécessaire d'accumuler un maximum de connaissances scientifiques sur le comportement de cette souche et ses propriétés antibactériennes. Ainsi les travaux qui ont été réalisés dans ce projet s'articulent autour de trois axes principaux :

- Dans une première partie, nous avons souhaité élargir la connaissance du spectre d'activité de la souche protectrice *L. piscium* CNCM I-4031 notamment contre des bactéries caractéristiques de la flore d'altération de la crevette qui n'avaient pas été testées dans les travaux précédents. Le caractère altérant de *Brochothrix thermosphacta* sur la crevette ayant récemment été montré, l'interaction de la souche protectrice avec cette espèce a été étudiée de façon plus approfondie afin d'établir un lien avec l'amélioration sensorielle précédemment observée.
- Dans une deuxième partie, dans le but d'optimiser cette interaction, nous avons modélisé l'effet de différents paramètres physico-chimiques (température, pH, taux de NaCl) sur la croissance de la souche *L. piscium* CNCM I-4031 et de *B. thermosphacta*. Dans un premier temps, les valeurs cardinales pour chaque paramètre étudié ont été déterminées en milieu de culture puis validées en matrice crevette pour chacune des souches. Dans un deuxième temps, l'influence des paramètres physico-chimiques et du niveau d'inoculation de *L. piscium* sur l'interaction entre les deux bactéries a été étudiée en matrice crevette par l'approche des plans expérimentaux.
- Enfin, dans une troisième partie, nous avons tenté d'élucider les mécanismes d'action pouvant expliquer l'inhibition de bactéries par la souche bioprotectrice *L. piscium* CNCM I-4031. Cette étude a été ciblée sur l'interaction entre *L. piscium* et *L.*

monocytogenes. Après avoir confirmé l'inhibition en matrice crevette, un milieu chimiquement défini a été mis au point pour reproduire cette inhibition et tester certaines hypothèses de compétition nutritionnelle.

Bibliographie

1. La filière crevette

1.1 Généralités

Avec une demande de plus en plus croissante dans les années 70, le développement de l'élevage des crevettes tropicales dans le Sud Est Asiatique et en Amérique latine a permis de manière spectaculaire de compléter les besoins du marché. Il existe trois grands groupes de crevettes suivant leur origine : les espèces d'eau froide (nordiques), les espèces d'eau douce (lacs et rivière) et les espèces d'eaux chaudes (tropicales). Seules les crevettes appartenant à la famille des penaeidés (tropicales), et l'espèce d'eau douce *Macrobrachium rosenborgui* font l'objet d'élevage.

1.2 Données économiques

La production mondiale de crevette d'élevage et de pêche s'élève à quelques 6 millions de tonnes de produits dont environ 60% font l'objet d'échanges internationaux. La répartition est estimée à 3,4 millions de tonnes provenant de capture et 2,6 millions de tonnes issus de l'élevage. Stimulé par une demande croissante aux USA, au Japon et en Europe occidentale, le marché de la crevette représente actuellement plus de 14 milliard de dollars US pour plus de 3,6 millions de tonnes de produits échangés (<http://www.globefish.org>, consulté le 06/05/11). Représentant 15% de la valeur totale des produits de la mer soumis au commerce international, la crevette devient en termes de production de valeur le produit de la mer le plus commercialisé sur le marché international.

Le marché européen est le plus important en termes de volume d'importation avec 356 000 tonnes de produits importés en 2008. Les principaux pays européens qui absorbent cette demande sont l'Espagne, la France et le Royaume Uni. Malgré la crise économique mondiale de 2009, les importations de crevettes sont restées stables durant cette période à l'exception du marché espagnol qui a vu ses importations baisser.

En France, la crevette occupe le deuxième poste d'importation de produit de la mer en termes de valeur avec 525 millions d'euros dépensés en 2009, derrière le saumon (689 millions d'euros) (http://www.franceagrimer.fr/Projet-02/08publications/index89.htm#08pech-resto_tab_synt09, consulté le 06/05/11). Durant ces dernières années (2005-2008), les volumes d'importation de crevette sont restés stables et compris entre 101 000 et 108 000 tonnes (figure 1)

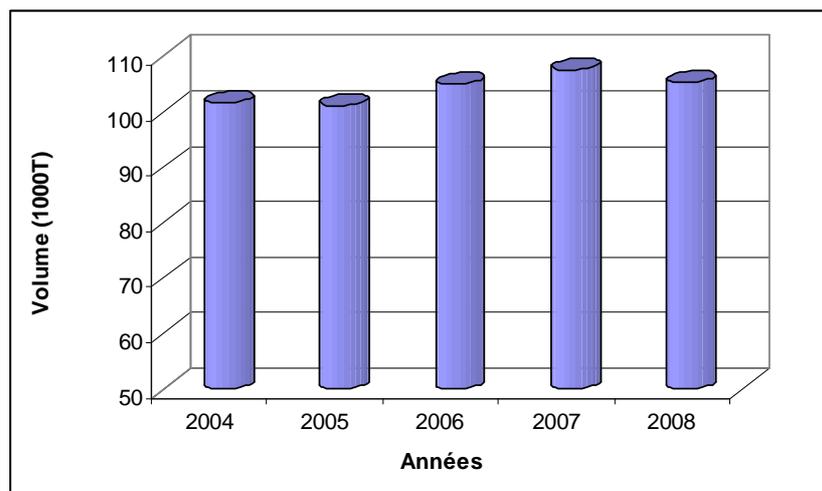


Figure 1 : Importations françaises de crevettes entre 2004-2008 selon Globefish (<http://www.globefish.org>, consulté le 06/05/11).

Une bonne majorité de ces importations sont sous forme crue congelée et l'espèce tropicale est la plus représentée. Les importations se répartissent en 80% de crevettes tropicales crues congelés, 15% de crevettes prêtes à consommer (toute origine) et 3% de crevettes cuites sous forme réfrigérée (toute origine) (tableau 1)

Les principaux pays fournisseurs de la France depuis 2005 sont respectivement l'Équateur, l'Inde, Madagascar, le Brésil, et la Colombie.

Tableau 1: Volumes d'importation et d'exportation de crevettes en France en 2008 (France Agrimer, 2008).

Origine	Produit	Importation (Tonnes)	Exportation (Tonnes)
	Congelé	218	3
Crevette grise	Frais, réfrigéré ou cuit	2221	177
	Autres présentation	23	2.9
Crevette nordique (<i>Pandalidae</i>)	Congelé	2408	469
	Non congelé	310	688
Crevette tropicale (<i>Penaeus</i>)	Congelé	87101	9104
	Non congelé	426	119
Divers crevettes	Conserve	12638	2277

1.3 Technologie de transformation

La transformation des crevettes en France est essentiellement de la cuisson et du conditionnement. Cette activité regroupe une vingtaine d'entreprises dont certaines sont regroupées sous l'association de cuiseurs de crevettes et crustacés (A3C).

Dans l'industrie française de transformation des crevettes, les produits sont généralement préparés suivant le diagramme présenté figure 2. Ce dernier constitue un socle commun, mais suivant les particularités de chaque industriel des variantes de ce modèle existent. Les crevettes nordiques sont uniquement pêchées puis cuites, décortiquées et congelées. En alternative à la congélation les crevettes peuvent être saumurées, égouttées et conditionnées sous atmosphère protectrice. Dans ce qui suit nous ne traiterons que de la crevette tropicale.

La matière première est réceptionnée généralement crue congelée entière ou décortiquée et étêtée. Les crevettes sont réceptionnées, puis mises en panier dans les bacs de décongélation

avec un traitement éventuel aux métabisulfites afin d'éviter le noircissement (mélanose). Elles sont ensuite cuites entre 70 et 75°C à cœur pendant 2 à 5 minutes, dans de l'eau salée pour atteindre en général 1 à 2% de sel dans le produit. Les crevettes sont par la suite refroidies dans un bain de saumure. Une partie des crevettes est vendue sur glace, mais elles sont souvent transportées chez les revendeurs sous atmosphère protectrice contenant 50% CO₂ et 50% N₂ et distribuées sous cette forme au rayon frais des grandes surfaces. Toute cette gamme de produits nouveaux, pratiques, à DLC allongée que sont les crevettes cuites décortiquées emballées sous atmosphère protectrice subissent souvent des traitements par trempage dans des bains de conservateurs ou par pulvérisation directe avant le conditionnement sous atmosphère. Ces conservateurs sont utilisés pour prolonger la durée de conservation des crevettes en luttant contre les flores impliquées dans l'altération. Les acides sorbique, benzoïque et citrique ou plus souvent leurs sels (benzoate de sodium, sorbate de potassium), sont les plus utilisés sur les crevettes cuites décortiquées. Ces produits sont indiqués sur les étiquettes sous la mention « additifs »: acide benzoïque (E210), sorbate (E200), acide citrique (E330). Pour des raisons sanitaires l'utilisation de ces molécules est limitée à 2 g/kg de produit au total pour les crevettes à l'exception de la crevette grise (<http://www.codexalimentarius.net>, consulté le 06/05/11).

Le sulfite est aussi utilisé comme conservateur dans la crevette cuite décortiquée à hauteur de 150 mg/kg (<http://www.codexalimentarius.net>, consultés le 06/05/11). L'ajout de colorants après cuisson des crevettes décortiquées est une pratique rare mais utilisée par certains industriels. Deux sortes de colorants sont utilisés: les colorants naturels ou les chimiques. Bien que très coûteux les colorants naturels permettent de reproduire le plus fidèlement possible la couleur originelle de la crevette avant cuisson. Les colorants naturels les plus utilisés sont des caroténoïdes tels que: le β -carotène (E160a), l'apocarotenol (E160e) et le rouge de betterave (E162).

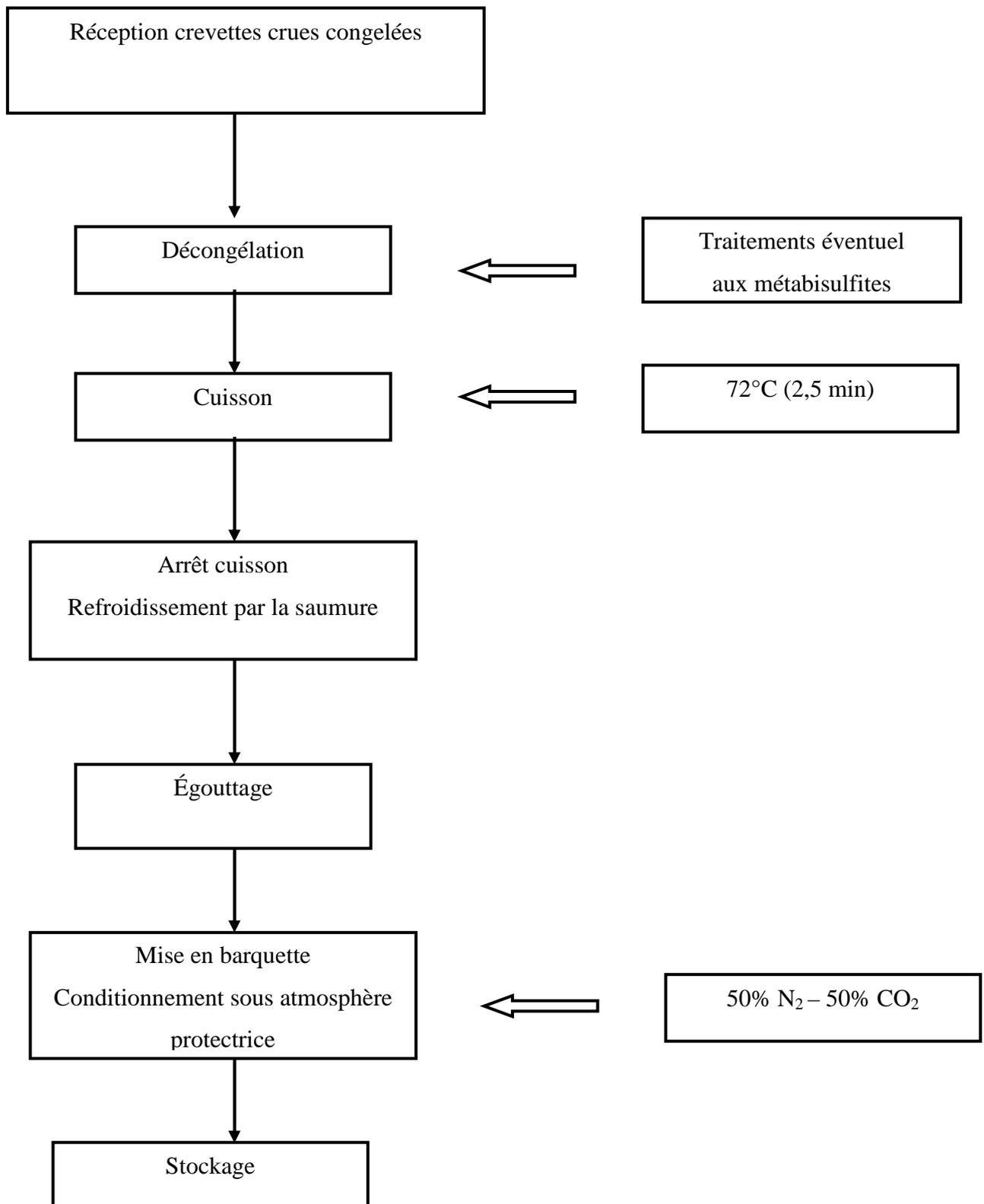


Figure 2 : Diagramme général du procédé de cuisson des crevettes selon l'A3C

2. Le produit crevette tropicale

2.1 Caractéristiques physico-chimiques et composition

La crevette cuite décortiquée est un produit à pH neutre ($\text{pH} \approx 7$) qui à l'instar des poissons est riche en protéines ($\approx 20\%$) mais a la particularité d'être pauvre en lipides ($\approx 1,1\%$). Elle renferme des composés azotés non-protéiques (acides aminés, bases). Parmi ces composés non-protéiques, on retrouve également de l'oxyde de triméthylamine (OTMA). La concentration de ce composé dépend de l'espèce de crevette. Dalgaard *et al.* (2000) et Laursen *et al.* (2006) ont démontré que les crevettes nordique (*Pandalus borealis*) renferment beaucoup plus d'OTMA (25 à 67 mg-N /100 g) que les crevettes tropicales (*Peneaus sp.*) (1.4 à 2.5 mg-N /100 g). La crevette est riche en glycine et arginine mais reste pauvre en cystéine, méthionine et proline (Chinivasagam *et al.*, 1998). Le sodium et le phosphore sont les minéraux les plus abondants et la niacine (vitamine B3) la vitamine principale. Nous verrons que tous ces caractères physicochimiques auront une incidence sur le processus de dégradation du produit.

2.2 Caractéristiques microbiologiques

2.2.1 Microbiote de la crevette fraîche vivante

En ce qui concerne les crevettes tropicales vivantes, la flore bactérienne initiale est constituée principalement de *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium* et une forte proportion d'*Aeromonas* (Jayaweera *et al.*, 1988; Jeyasekaran *et al.*, 2006; Vanderzant *et al.*, 1973). En Inde, Gopal *et al.* (2005) ont signalé la présence importante de différentes espèces de *Vibrio*, y compris *V. parahaemolyticus*. Benner *et al.* (2004) rapportent, lors d'une étude sur des crevettes du Nicaragua, la présence majoritaire de bactéries corynéformes et de *Moraxella* suivies, à un niveau plus faible, de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Shewanella*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas*. Ces résultats confirment ceux de Matches (1982) obtenus antérieurement. Chinivasagam *et al.* (1996) ont montré l'influence de la zone de capture sur la nature de la flore initiale avec une prédominance de bactéries à Gram positif sur les crevettes pêchées à faible profondeur et de *Pseudomonas* sur celles capturées en eau profonde. La nature de la flore initiale aura des conséquences sur la durée de conservation et sur les caractères organoleptiques liés à l'altération.

2.2.2 Microbiote de la crevette conservée crue

L'espèce de crevette, la contamination initiale et les conditions d'entreposage jouent un rôle déterminant dans l'évolution des micro-organismes du produit cru. Selon Chinivasagam *et al.* (1996) l'entreposage de crevettes tropicales crues dans de la glace conduit à l'émergence de *Pseudomonas fragi* ainsi que d'*Aeromonas hydrophila* et de *Shewanella putrefaciens* (Lalitha *et al.*, 2006), tandis qu'un stockage dans de la glace pilée favorise plutôt le développement de *Shewanella putrefaciens*. Jeyasekaran *et al.* (2006) ont démontré que la flore totale de crevettes indiennes entreposées dans de la glace carbonique était dominée par les genres *Flavobacterium* (43%), *Pseudomonas* (19%) et *Vibrio* (17%) alors que dans de l'eau glacée le genre *Pseudomonas* devenait majoritaire (38%) suivi du genre *Serratia* (26%). Malgré les différences observées entre toutes ces études, il se dégage que la flore dominante des crevettes tropicales crues conservées réfrigérées sous air est dominée par des bactéries marines à Gram négatif psychrotolérantes, dont la croissance est possible à 0°C, l'optimum se situant aux alentours de 25°C. Parmi ces bactéries, la majorité appartient à la sous-classe γ du phylum des proteobacteria (*Pseudomonas*, *Shewanella*, *Aeromonas*, *Vibrio*).

La durée de conservation de ces crevettes peut être relativement courte : 6 jours à 5 - 6°C (Chinivasagam *et al.*, 1996; Lannelongue *et al.*, 1982; Matches, 1982). Elle s'explique par un pH initial neutre permettant la croissance en condition aérobie de bactéries altérantes à Gram négatif telles que *Pseudomonas fragi* et *Shewanella putrefaciens*. Des études réalisées par Laghmari *et al.* (2005) sur la crevette *Parapenaeus longirostris* stockée dans de la glace et entreposée entre 4°C et 6°C ont montré aussi que la durée de conservation varie entre 3 et 5 jours. Des résultats similaires (4 à 7 jours) sont obtenus sur *Penaeus merguensis* (Yamagata *et al.*, 1995) entreposée dans de la glace. Des délais de conservation plus importants allant de 10 à 17 jours et même plus de 20 jours sont rapportés par Chinivasagam *et al.* (1996) sur des crevettes tropicales (*Penaeus*) venant d'Australie entreposées dans de la glace ou sous glace liquide.

2.2.3 Microbiote de la crevette conservée cuite

Le microbiote des crevettes tropicales cuites a été assez peu étudié et les principaux travaux ont démarré dans les années 2000. La cuisson des crevettes entraîne une réduction de la charge microbienne mais n'élimine pas totalement les germes présents. De même, les procédés de conservation (sel, conservateurs, emballage sous atmosphère protectrice) n'empêchent pas complètement la croissance microbienne au cours de la conservation du

produit. Bien que l'écosystème microbien soit assez peu décrit, différents travaux montrent que les bactéries lactiques sont souvent prédominantes à la fin de l'entreposage dans les crevettes cuites décortiquées, semi-préservées et conservées à basse température. Selon Dalgaard *et al.* (2003) sur 102 isolats bactériens prélevés au moment de l'altération de crevettes nordiques et tropicales cuites, saumurées et conservées sous atmosphère protectrice (14% de CO₂, 85% N₂, 1% O₂), plus de 78 isolats ont été identifiés comme étant des bactéries lactiques. L'utilisation de techniques classiques d'identification couplée à une analyse protéomique par SDS-PAGE a permis une identification précise au niveau de l'espèce. Les espèces majoritaires identifiées sont : *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium sp. nov.* et *Lactobacillus curvatus*. Matamoros *et al.* (2009b) ont également montré que le microbiote de deux lots de crevettes tropicales cuites décortiquées (*P. vanamei*) d'origine différente et conditionnées sous atmosphère était dominé par des bactéries lactiques (10⁸⁻⁹ UFC/g).

Parmi les facteurs physico-chimiques qui peuvent être influents dans l'évolution de la flore, la température en jouant sur la vitesse de croissance des micro-organismes est le plus discriminant. Suivant la température de conservation, la durée de conservation des crevettes peut aller de quelques jours à plusieurs mois (Dalgaard *et al.*, 2000) et influence fortement la composition du microbiote au moment de l'altération. Les trois espèces citées précédemment sont majoritaires en fin de conservation des crevettes stockées à 0, 5, 8°C tandis que pour des températures plus élevées de 15°C et 25°C, *Enterococcus faecalis* devient le germe dominant. Plus récemment, des techniques de biologie moléculaire aculturales comme la TTGE ont été utilisées pour l'étude des écosystèmes microbiens des crevettes. En utilisant cette approche, Jaffrès *et al.* (2009) ont démontré la présence majoritaire de bactéries lactiques au moment de l'altération sur des crevettes tropicales semi-préservées, cuites décortiquées et conservées à 5°C et 15°C. Ils ont mis en évidence en fin de conservation la présence de *C. divergens*, *C. maltaromaticum* ainsi que *B. thermosphacta* à 5°C puis *E. faecalis* et *E. faecium* à 15°C. Grâce à la TTGE, ces mêmes auteurs, ont décrit une nouvelle espèce, portant le nom de *Vagococcus penaei*, jamais décrite auparavant sur la crevette (Jaffrès *et al.*, 2010).

2.3 Altération de la crevette

2.3.1 Altération d'origine physico-chimique

La crevette est un produit sensible, qui subit une perte de fraîcheur en général liée à l'activité autolytique et à la dégradation de l'ATP. C'est un produit qui, vu sa faible teneur en lipide, n'est pas ou peu concerné par le rancissement observé chez certains poissons à la suite d'une auto oxydation des lipides au contact de l'air. En revanche, la cause majeure de l'altération précoce de la crevette est la mélanose qui se traduit par la formation de tâches noires au niveau du céphalothorax. Ce phénomène est lié à l'action de la polyphénol oxydase (Benner *et al.*, 1999) naturellement présente dans la crevette. Les benzoquinones produites réagissent avec plusieurs composés comme les amines, les acides aminés et l'oxygène pour former la mélanine responsable de cette coloration noire.

2.3.2 Micro-organismes responsables de l'altération

Parmi la flore totale, seule une partie est responsable de l'altération du produit qui se traduit surtout par l'apparition de mauvaises odeurs, saveurs et d'une texture pâteuse. Les variations des paramètres physico-chimiques dans la matrice crevette conduisent à la prédominance d'espèces ou de mélanges d'espèces altérantes spécifiques à chaque type de produit. Cependant, la présence d'une flore microbienne au moment de l'altération sensorielle n'implique pas forcément sa participation au processus d'altération, d'où la notion de micro-organisme spécifique d'altération. En effet, le développement de certains micro-organismes peut être totalement neutre sur les caractéristiques organoleptiques du produit. Pour les poissons marins frais conditionnés sous glace, sous vide ou sous atmosphère protectrice, les mécanismes d'altérations sont assez bien connus. Les germes responsables sont en général *S. putrefaciens* et *S. baltica* ainsi que *P. phosphoreum*. Ils produisent des composés soufrés (H_2S , méthylsulfure et diméthylsulfure) à partir de la cystéine et de l'ornithine, et également de la triméthylamine (TMA) dont l'odeur est typique de celle du poisson altéré (Dalgaard *et al.*, 1993; Gram *et al.*, 1987). La TMA est issue de la réduction de l'OTMA, molécule typiquement marine, qui joue le rôle d'accepteur d'électron lors de la respiration anaérobie dont sont capables *S. putrefaciens*, *P. phosphoreum* et les *Vibrionaceae*. Les différents types d'altération observés chez le poisson s'expliquent par la concentration en OTMA qui varie selon les espèces. Dans d'autres cas, l'altération est surtout liée à une production d'ammoniac.

L'altération des poissons légèrement préservés est nettement plus complexe car les paramètres physico-chimiques (sel, fumée, acide organique, cuisson, décontamination lors du procédé, emballage ...) favorisent l'émergence d'espèces bactériennes très différentes comme des bactéries lactiques, les enterobactéries, *B. thermosphacta* (Leroi, 2010) qui interagissent pour donner des odeurs parfois très différentes (beurre, aigre, acide, chou, pied...).

Sur la crevette cuite, au moment de l'altération, la plupart des auteurs ont isolé des bactéries lactiques et *B. thermosphacta* (Dalgaard, 2000; Jaffrès *et al.*, 2009; Matamoros *et al.*, 2009b). Afin de déterminer leur degré d'implication dans l'altération certains auteurs les ont inoculés dans des produits. Les études de Laursen *et al.* (2006) ont confirmé le pouvoir altérant de *C. divergens* et certains groupes de *C. maltaromaticum* à 5°C sur la crevette nordique décortiquée cuite. Ces deux souches, après dix jours sur ce produit, sont responsables de très fortes odeurs d'altération avec des odeurs chlorées, maltées et aigres. Elles produisent aussi de la tyramine ainsi que des amines volatiles. Dans cette même étude, l'activité altérante de *B. thermosphacta* sur la crevette a été démontrée. *B. thermosphacta* en croissance pure sur ce produit consomme la leucine et l'isoleucine ainsi que des composés organiques non identifiés. Son effet altérant, après dix jours avec un taux initial de 5 log UFC/g, se caractérise par une forte odeur de beurre caramel qui pourrait être liée selon les analyses en olfactométrie, à la production de diacétyl, butanediol, 3-méthyl-1-butanol et 3-méthyl-1-butanol. Ces mêmes odeurs ont été aussi décrites par Mejlholm *et al.* (2005) sur le même produit.

L'interaction de ces deux genres bactériens conduit au développement d'odeur d'altération de type beurre et «chien mouillé». Contrairement à ce qu'on pourrait penser, une plus faible production de diacétyl et 3-méthyl-1-butanol est observée. Cependant, d'autres molécules telles que l'ammoniac et l'acide acétique ont été produites en grande quantité. Lors d'études sur le potentiel altérant de bactéries isolées de crevette cuite, Jaffrès *et al.* (2011) ont démontré le caractère altérant de *B. thermosphacta*, *Serratia liquefaciens*-like et *C. maltaromaticum* inoculés en culture pure sur ce produit. Des odeurs de fromage/pied et aigre/fermenté ont été imputées à *B. thermosphacta* après 9 jours de stockage à 8°C et à *C. maltaromaticum* après 16 jours de stockage. *St. liquefaciens*-like présentait des odeurs de choux/ail, amine/urine et serpillère à 13 jours d'entreposage. Les molécules associées aux odeurs émises par *B. thermosphacta* et *C. maltaromaticum* sont le 2,3-heptadione (fromage, beurre), le 2,3 butanedione (beurre), 3-méthyl-1-butanol (malt). *St. liquefaciens*-like produisait du 2,3-butanedione et de la TMA.

2.3.3 *Brochothrix thermosphacta*, une bactérie spécifique d'altération de la crevette

B. thermosphacta est une bactérie à Gram positif et catalase positive appartenant à la famille des *Listeriaceae*. Elle se présente sous forme de bâtonnet fin de 0.6-0.8 µm de diamètre et 1-2 µm de long. C'est un microorganisme immobile et non sporulé. Il est anaérobie facultatif. C'est une bactérie psychrotrophe, qui peut vivre à des températures variant entre 0°C à 30°C, avec un optimum proche de 25°C. Elle est thermosensible et ne survit pas quand elle est exposée à 63°C pendant 5 minutes. *B. thermosphacta* est le germe le plus impliqué dans le processus d'altération de la viande et des produits carnés entreposés sous vide ou sous atmosphère protectrice à des températures réfrigérées. La résultante de son activité sur ce type de produit est la production de métabolites malodorants tels que l'acétoïne qui est associée à l'odeur aigre douce très offensive en condition aérobie (Dainty *et al.*, 1977 ; Stanley *et al.*, 1981). Cette bactérie a été également considérée comme participant à l'altération du saumon fumé (Stohr *et al.*, 2001), où elle est associée à la production de 2- heptanone et de 2- hexanone qui sont responsables des odeurs de beurre et fromage bleu observées sur ce produit. Sur la crevette, l'étude de Jaffrès *et al.* (2011) a montré son caractère altérant. Son type de métabolisme, aérobie ou anaérobie est essentiellement influencé par la composition en oxygène et dioxyde de carbone. En absence de CO₂, la quantité d'oxygène nécessaire pour un métabolisme aérobie est estimée entre 9-17% (Pin *et al.*, 2002). Ce même type de métabolisme est prioritaire, lorsqu'elle est en présence de 35% de CO₂ et d'une quantité d'O₂ supérieure à 30%. Gill et Newton (1977) ont démontré que le glucose est le substrat utilisé préférentiellement par *B. thermosphacta* dans la viande. En condition anaérobie, le métabolisme du glucose par *B. thermosphacta* conduit essentiellement à la formation d'acide lactique, alors qu'en condition aérobie l'acétoïne, le 3 méthyl-butanol et le 2 méthyl-butyrate sont les produit majeurs (Pin *et al.*, 2002). *B. thermosphacta* utilise peu d'acides aminés pour sa croissance. Sur la crevette nordique, Laursen *et al.*, (2006) ont démontré qu'elle n'utilisait que la leucine et l'isoleucine.

2.3.4 Méthodes d'évaluation de l'altération

Pour mesurer l'état d'altération des produits de la mer, l'azote basique volatil total (ABVT) et la TMA responsables des mauvaises odeurs observées chez le poisson en putréfaction sont généralement dosées. L'ABVT est notamment constituée par un ensemble de composés azotés comprenant l'ammoniaque et diverses amines volatiles provenant respectivement de la désamination et de la décarboxylation des acides aminés. La TMA résultant de la réduction

d'origine bactérienne de l'OTMA en conditions anaérobies (Dalgaard *et al.*, 1993) est également prise en compte dans le dosage de l'ABVT, mais constitue lorsqu'elle est dosée spécifiquement un bon indicateur d'altération de certains produits. Ainsi dans le poisson des limites d'acceptabilité ont été fixées entre 25 et 35 mg N/100 g selon les espèces pour l'ABVT (règlement européen 1022/2008/EC) et 5 mg N/100 g pour la TMA (Malle *et al.*, 1989). Des taux d'ABVT et de TMA élevés peuvent être obtenus dans de la crevette crue entière (López-Caballero *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2005; Tsironi *et al.*, 2009). Il a été montré qu'une valeur de 30 mg-N/100g of TVBN pouvait constituer un seuil d'acceptabilité pour la crevette nordique (Angel *et al.*, 1981). Cependant, selon une autre étude, Cobb *et al.* (1976), le taux initial d'ABVT dans les crevettes fraîches stockées dans de la glace est compris entre 13 et 38 mg-N/100g. Des études plus récentes ont finalement considéré que l'ABVT n'était pas un indicateur pertinent pour évaluer l'altération microbienne des crevettes cuites (Dalgaard *et al.*, 2000; Mejlholm *et al.*, 2005) ni des crevettes crues fraîches de l'espèce *Penaeus kerathurus* (Sadok *et al.*, 2004). Par ailleurs, la production de TMA est liée à la concentration initiale d'OTMA qui semble être très dépendante de l'espèce de crevette considérée : la crevette tropicale (*Penaeus* sp.) en contient des taux assez faibles (1.4 mg-N/100g) comparée à la crevette nordique (*Pandalus borealis*) qui peut atteindre 25 à 67 mg-N/100g (Laursen *et al.*, 2006).

L'analyse sensorielle reste l'outil qui semble le mieux adapté pour évaluer l'altération. Elle a été utilisée pour déterminer l'impact de *Carnobacterium* sp. et *B. thermosphacta* sur l'altération de crevettes cuites décortiquées avec un jury entraîné de 6 personnes notant des caractéristiques de texture, odeur et flaveur (Laursen *et al.*, 2006). De la même façon, un jury entraîné de 7 à 10 personnes a permis de déterminer l'effet positif de flores bioprotectrices pour retarder l'altération de crevettes cuites décortiquées (Matamoros *et al.*, 2009a). Les principaux descripteurs d'odeurs utilisés dans ces études sont des odeurs de malt, aigre/fermenté, serpillière, soufre/chou correspondant aux produits altérés alors que les produits frais se caractérisent par des odeurs riz, crustacé, surimi.

2.4 Les micro-organismes pathogènes

La plupart des germes pathogènes susceptibles d'être retrouvés dans les crevettes cuites décortiquées peuvent provenir de la matière première ou de recontaminations en usine au cours du procédé de transformation. Durant ces étapes, le produit reste exposé à la flore bactérienne de l'environnement et des manipulateurs ce qui augmente le risque de

contamination. Les étapes de la chaîne de transformation où les risques de contamination sont les plus élevés sont le décorticage et l'ensemble des étapes du conditionnement après cuisson (Gudmundsdóttir *et al.*, 2006a). La présence de bactéries pathogènes dans des crevettes après une étape de congélation a été décrite par Duran *et al.* (2005). Les micro-organismes pathogènes isolés de la crevette, *Vibrio (cholerae, parahaemolyticus)*, *Salmonella*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Duran *et al.*, 2005) sont naturellement présents dans l'environnement de la crevette depuis l'élevage jusqu'à la transformation mais leur présence varie selon l'origine géographique (tropicale ou nordique). Dans les élevages de crevettes, on trouve essentiellement des *Vibrio* pathogènes et *Salmonella*. Lors d'études sur la prévalence de ces bactéries dans les crevettes thaïlandaises, Dalgaard *et al.* (1995) rapportent que sur 107 échantillons testés (eau, sédiment, crevette) 33 % étaient positifs à *Vibrio cholerae*. Malgré la charge importante en coliformes fécaux, aucune salmonelle n'a été isolée. Toutefois, dans une autre étude réalisée par Reilly *et al.* (1992) dans une ferme d'aquaculture de crevettes dans le Sud-est asiatique, 16 % des crevettes testées et 22 % d'échantillons d'eau étaient contaminés par des salmonelles. La présence de salmonelles dans ces fermes d'aquaculture serait liée à l'utilisation de fiente fraîche de poulet comme fertilisant dans les zones de ponte, contrairement aux pratiques des élevages thaïlandais qui utilisent des fientes sèches.

Les *Vibrio* sont des bactéries d'origine marine très abondantes dans les eaux chaudes et très présentes dans les produits de la mer tropicaux. Le genre *Vibrio* est le pathogène le plus abondant sur les crevettes des côtes Est et Ouest de l'Inde avec l'espèce *parahaemolyticus* (Shubha *et al.*, 2005). Gopal *et al.* (2005) ont démontré que 38 à 81 % de la flore totale de la crevette indienne est constituée par des bactéries du genre *Vibrio* qui peuvent atteindre 10^4 UFC/g. Deux à 12 % de ces *Vibrio* sont identifiés comme appartenant à l'espèce *parahaemolyticus*. Cette bactérie pathogène n'est pas résistante à la chaleur et est normalement éliminée lors de la cuisson des crevettes, mais le risque de contamination croisée entre produits cuits et produits crus contaminés demeure important.

Clostridium botulinum de type E est une autre bactérie pathogène d'origine marine trouvée dans les crevettes nordiques conditionnées sous atmosphère protectrice (http://www4.fao.org/faobib_fr/index.html, consulté le 10/05/11). Ce pathogène est capable de former des toxines pouvant causer des intoxications mortelles (botulisme). Sachant que les conditions de cuisson des crevettes ne permettent pas d'inactiver totalement les spores, C.

botulinum pourrait constituer un risque sanitaire pour les consommateurs. Cependant, la croissance de *C. botulinum* et la production de toxine associée sont limitées aux températures réfrigérées ($T < 3,3^{\circ}\text{C}$). Selon Huss (1997) et Huss et al. (2000) le développement de *C. botulinum* de type E dans les crevettes cuites, semi préservées et entreposées sous atmosphère protectrice est inhibé à 5°C si le taux de sel est supérieur à 3% en phase aqueuse. Par ailleurs aucun cas de botulisme lié à la consommation de crevette n'a été signalé à ce jour.

Plus récurrent dans les produits de la mer, *Listeria monocytogenes* est une bactérie ubiquiste qui colonise plusieurs niches écologiques (eaux douces, eau de mer, sol, végétaux etc.). Sa présence dans les produits alimentaires peut être expliquée par une contamination de la matière première ou par une recontamination lors de la transformation du fait de la présence de cette bactérie sur les matériels et les surfaces (Gudmundsdóttir *et al.*, 2006a). Sa capacité à croître à des températures réfrigérées, en aérobiose et anaérobiose, dans une large gamme de pH (4,5 à 9) et en présence de fortes concentrations en NaCl (jusqu'à 10%) en font un danger à prendre systématiquement en compte dans les produits prêts à consommer. *L. monocytogenes* est responsable de la listériose humaine (zoonose alimentaire), maladie rare mais mortelle dans plus de 25% des cas présumés pour la population à risque (Farber, 2000). La transmission de *L. monocytogenes* à l'homme se fait majoritairement par voie alimentaire. La plupart des cas de listériose résultent de l'ingestion d'aliments contaminés pouvant contenir jusqu'à 10^{6-8} germes/g de produit. Si dans certains pays une exigence "zéro listeria" est imposée (USA, Canada, Danemark), en Europe, le seuil réglementaire est fixé à 10^2 germes/g de produit jusqu'à la fin de la DLC pour les produits prêts à consommer favorables à la croissance de *L. monocytogenes*, ce qui est le cas de la crevette cuite (règlement européen CE 2073/2005). *L. monocytogenes* est présente dans les crevettes fraîchement pêchées provenant des côtes du golfe des USA à hauteur de 11% (Gecan *et al.*, 1994; Motes, 1991) et dans les crevettes crues au Chili à 28,8% (Cordano *et al.*, 2001) (Tableau 2). L'étude de Gudmundsdóttir *et al.* (2006a) estime sa prévalence dans la crevette nordique crue (*P. borealis*) à 20,9 %. Cette même étude montre que *L. monocytogenes* est détectée sur certains équipements pendant le procédé de transformation mais aucun des 82 échantillons de produits finis ne présente de contamination. En revanche, la présence de cette bactérie pathogène dans des crevettes cuites et décortiquées prêtes à consommer a été démontrée dans les travaux de Valdimarsson *et al.* (1998). Dans cette étude, sur 3331 échantillons de crevette testés, 270 (8,1 %) étaient positifs à la recherche de *Listeria* spp. dont 26,5 % appartiennent à

l'espèce *monocytogenes* (Tableau 2). De même, une étude menée en Australie par l'agence des standards alimentaires en 2002 relate une faible prévalence de 3% de *L. monocytogenes* dans les crevettes cuites décortiquées ou entières (<http://www.foodstandards.gov.au/educationalmaterial/monitoringandsurveillance/foodsurveillancenewsletter/spring2003.cfm>, consulté le 10/05/11). Il a été démontré par Mejlholm *et al.* (2005) que pour limiter le développement de *L. monocytogenes* dans les crevettes cuites décortiquées sous atmosphère protectrice, un stockage à une température de 2°C est efficace. Cependant de telles températures sont rarement maintenues tout au long de la chaîne de distribution notamment dans les réfrigérateurs ménagers dont la température moyenne est voisine de 7°C en France.

Tableau 2 : Prévalence de *Listeria monocytogenes* dans la crevette

*nd = non déterminé

Nature de la crevette	Nombre d'échantillons testés	Échantillons positifs à <i>Listeria</i> spp. (%) *	Présence de <i>L. monocytogenes</i> (%)	Références
Crevette crue	59	nd	28,8	Cordano et Rocourt (2001)
Crevette crue	43	23,2	20,9	Gudmundsdottir et al., (2006)
Crevette crue (<i>P. monodon</i>)	30	73,3	6,7	Moharem et al., (2007)
Crevette cuite	274	nd	1,5	Farber (2000)
Crevette cuite entière/décortiquée	380	nd	3	Anon (2002)
Crevette cuite décortiquée	3331	8,1	26,5 [†]	Valdimarsson et al., (1998)

3. Maîtrise des micro-organismes d'altération et des pathogènes par des micro-organismes protecteurs

3.1 La biopréservation : une technologie de barrière alternative pour les produits de la mer

La maîtrise du développement des bactéries indésirables dans les produits de la mer a été, ces dernières décennies, l'un des challenges les plus marqués pour l'industrie agroalimentaire. Cela passe par une première étape de minimisation de la contamination durant le procédé. L'utilisation du "guide des bonnes pratiques d'hygiène" créé par l'A3C en 2006 et l'application des principes HACCP à la cuisson des crustacés y a grandement contribué. Malgré tout, les traitements technologiques utilisés pour la fabrication des crevettes tropicales cuites décortiquées, ne sont pas suffisants pour garantir une absence totale de micro-organismes en sortie d'usine. La réfrigération, le conditionnement sous atmosphère protectrice et l'utilisation de conservateurs permettent une durée de vie des produits de l'ordre de 10 jours. Les acides organiques malgré leur efficacité notamment pour limiter la croissance de *L. monocytogenes* (Mejlholm *et al.*, 2008) restent toujours mal perçus par les consommateurs car ils font partie des additifs et sont mentionnés dans l'étiquetage avec la nomenclature "E". En solution alternative à l'utilisation des conservateurs, certaines techniques "douces" de décontamination comme la lumière pulsée (Elmnasser *et al.*, 2007) ou les hautes pressions existent mais sont encore au stade exploratoire pour la filière produits de la mer.

Les composés antimicrobiens naturels (huiles essentielles, extraits de plantes, chitosan...) sont des barrières qui peuvent être utilisées en complément des procédés classiques pour freiner le développement microbien. L'utilisation d'huile d'origan à 0,05 % m/V s'est révélée efficace sur *P. phosphoreum* dans des filets de poisson naturellement contaminés et emballés sous atmosphère modifiée et entreposés à 2°C (Mejlholm *et al.*, 2002). Sur des filets de carpe séchés, la combinaison d'une solution saline électrolysée à un mélange égal de thymol et de carvacrol a permis une bonne préservation des filets durant le procédé de séchage (Mahmoud *et al.*, 2006). L'association d'origan, de canneberge et d'acide lactique est aussi efficace contre *V. parahaemolyticus* sur des filets de morue et de la crevette crue (Lin *et al.*, 2005). Des extraits de romarin combinés avec de la réglisse ont montré leur efficacité contre *L. monocytogenes* dans la viande de porc fraîche et dans des tranche de jambon en réduisant sa croissance de 3.1 log UFC/g en 28 jours à 4°C (Zhang *et al.*, 2009). Cependant, les études de Barbosa *et al.* (2009) ont montré les limites des huiles essentielles dans la biopreservation

contre les pathogènes car seulement 1.3 log UFC/g d'inhibition ont été obtenus contre *L. monocytogenes* dans la viande. Dans ce contexte, l'utilisation de micro-organismes protecteurs via la biopréservation constitue une alternative possible.

3.1.1 Définition de la biopréservation

Sous le vocable biopréservation, il faut comprendre l'utilisation de micro-organismes à activités bactéricides ou le plus souvent bactériostatiques contre les flores pathogènes et/ou altérantes d'un produit pour garantir sa sécurité, améliorer sa qualité et parfois même prolonger sa durée de conservation. En général, les bactéries qui se prêtent le mieux à cette technologie sont les bactéries lactiques. Ces bactéries produisent souvent des composés inhibiteurs comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, des bacteriocines, du gaz carbonique. Bénéficiant du statut GRAS (Generally Recognised as Safe) délivré par la US-Food and Drug Administration, elles bénéficient d'une bonne image auprès des consommateurs du fait de leur utilisation dans les produits fermentés (Rodgers, 2001). Dans ces produits, l'acidification liée à la présence des bactéries lactiques joue un rôle majeur dans la préservation du produit mais s'accompagne de modifications importantes des propriétés nutritionnelles et organoleptiques. En revanche l'application de la biopréservation dans les produits non fermentés implique d'utiliser des bactéries capables d'empêcher le développement de germes indésirables sans altérer les caractéristiques sensorielles et organoleptiques souvent délicates de ces produits.

3.1.2 Exemples d'application de la biopréservation dans des produits de la mer

Beaucoup de recherches en biopréservation prometteuses en milieu liquide n'ont pas trouvé d'application en produit soit parce que les bactéries protectrices ne se développaient pas à basse température en matrice poisson, soit parce qu'elles donnaient de mauvaises odeurs. Depuis, de nombreux essais ont été réalisés avec des souches sélectionnées directement des produits à biopréserver, donc adaptées à la matrice, et des tests en produits ont donné des résultats très prometteurs (Pilet et Leroi, 2011). La plupart des essais ont porté sur des souches de carnobactéries non acidifiantes, néanmoins certaines applications ont été réalisées avec d'autres genres bactériens.

L'essentiel des études porte sur l'inhibition de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé. Nilsson et al. (1999) ont isolé deux souches de *C. maltaromaticum* capables de limiter le développement de *L. monocytogenes* pendant 31 jours à 5°C. Brillet et al. (2005) ont aussi démontré l'efficacité de *C. divergens* V41 contre *L. monocytogenes* dans le saumon fumé à froid, en maintenant sa population à moins de 50 UFC/g pendant 1 mois à 4 et 8°C. Toujours dans le saumon fumé à froid, Yamazaki et al. (2003) ont mis en évidence une baisse de la population de *L. monocytogenes* de 10³ à 50 UFC/g en présence *C. maltaromaticum* CS526 après 7 jours à 4°C. Katla et al. (2001) ont aussi démontré l'efficacité de *Lactobacillus sakei* Lb790 qui était capable de limiter le développement de *L. monocytogenes* pendant 28 jours 10°C sur du saumon fumé à froid. Selon Vescovo et al. (2006), *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum* réduisent le développement de *L. innocua* de 3.3 et 2.8 log UFC/g respectivement, dans le saumon fumé à froid stocké à 4°C.

Beaucoup moins d'études sont consacrées à l'inhibition des flores d'altération. Contrairement à ce qui est observé pour l'inhibition de *L. monocytogenes*, les bactéries du genre *Carnobacterium* montrent généralement peu d'efficacité pour retarder les flores d'altération. Dans l'étude de Leroi et al. (1996) certaines souches de carnobactéries se sont révélées efficaces pour limiter l'altération sensorielle du saumon fumé mais les résultats étaient variables selon les lots traités. Une souche de *Bifidobacterium bifidum* a montré une activité inhibitrice vis-à-vis de *Pseudomonas* sp. et de *P. phosphoreum* dans des filets de plie conditionnés sous vide et réfrigérés (Altieri et al., 2005). Les travaux effectués par Matamoros et al. (2009a; 2009b) ont permis d'isoler deux souches de *Leuconostoc gelidum* et de *Lactococcus piscium* montrant une efficacité à limiter l'altération sensorielle de crevettes cuites décortiquées et de saumon fumé. Dans cette étude, les souches de *L. piscium* ont montré les activités les plus intéressantes permettant à la fois d'inhiber des bactéries pathogènes comme *L. monocytogenes* et *S. aureus* et de retarder l'altération sensorielle.

3.1.3 *Lactococcus piscium*, une espèce d'intérêt pour la biopréservation ?

Appartenant au groupe des bactéries lactiques, les lactocoques sont des bactéries ubiquistes affiliées au phylum des Firmicutes. De taille comprise entre 0,5 et 1,5 µm, leur morphologie (coque ou cocoïde) varie en fonction des conditions de culture (Dalgaard et al., 2003).

Proposé par Schleifer et al. (1987) le genre *Lactococcus* regroupe, sur des critères moléculaires et biochimiques, les streptocoques du groupe N non mobiles, anciennement classées dans le genre *Streptococcus*. Au niveau du genre cinq espèces étaient initialement

reconnues : *L. lactis*, *L. piscium*, *L. garviae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*. Une sixième espèce a été décrite récemment, il s'agit de *L. chungangensis* (Cho *et al.*, 2008). L'espèce *L. lactis* est la plus étudiée et la plus utilisée dans l'industrie laitière. Elle comprend trois sous espèces (*lactis*, *cremoris*, et *hordniae*).

Habituellement, les lactocoques croissent dans 0,5 à 4% de NaCl, voire 6,5% de NaCl pour certaines espèces telle que *L. lactis subsp. lactis* (Hamasaki *et al.*, 2003). Leur croissance est inhibée à des pH inférieurs à 4,4. La plupart des espèces sont mésophiles leur température optimale étant voisine de 30°C, mais elles se développent généralement à 10°C. *L. piscium* est psychrotolérante et capable de croître à des températures de 5°C (Williams *et al.*, 1990) mais certaines souches ont un caractère psychrotrophe plus marqué et ne se développent pas à 30°C (Garnier *et al.*, 2010; Matamoros *et al.*, 2009a).

Dans les produits de la mer, les lactocoques trouvés sont : *L. lactis*, *L. garviae* et *L. piscium*. *L. garviae* a été déclaré comme pathogène du poisson dans certaines conditions (Kusuda *et al.*, 1991). *L. piscium* a été décrit la première fois par William *et al.* (1990) dans du poisson (la truite arc-en-ciel). Présentée comme une bactérie capable de pousser entre 5 et 30°C mais incapable de croître à 40°C, *L. piscium* est capable de fermenter un grand nombre de sucre. Elle ne produit pas de H₂S, n'hydrolyse pas l'arginine et ne possède pas d'uréase. Sa composition en G+C% est de 38,5. Bien qu'isolé parfois de poissons malades, *L. piscium* tout comme *L. raffinolactis* n'a pas, contrairement à *L. garviae*, été mis en cause dans des pathologies du poisson (Michel *et al.*, 2007). Par ailleurs, *L. piscium* est une bactérie présente sur des matrices alimentaires puisqu'elle a été isolée de filets de saumon conditionnés sous atmosphère protectrice (Matamoros *et al.*, 2009a) et de viande fraîche emballée sous vide (Sakala *et al.*, 2002).

***Lactococcus piscium* CNCM I-4031**

Récemment, lors d'études de screening de bactéries à activité antimicrobienne, une souche bactérienne à profil psychrotrophe a été isolée de pavé de saumon frais par Matamoros *et al.*, (2009b). Des tests d'inhibition sur milieu modèle ont montré qu'elle possédait un profil antibactérien intéressant sur des bactéries pathogènes et altérantes de produits de la mer (Matamoros *et al.*, 2009b). Une première identification par le séquençage du gène codant pour l'ARN16S a permis de l'affilier au genre *Lactococcus* avec une similarité de séquence de 99% avec l'espèce *L. piscium* (souche DSM6634). Elle peut croître à des températures inférieures à 0°C avec un optimum à 26°C, cependant, aucune croissance n'est observée au

delà de 28°C. Les cellules sont immobiles, de petite taille (0,5 à 1 mm de diamètre) de forme ronde, seuls ou en courtes chaînes (2 à 8 cellules).

La caractérisation biochimique de la souche, a permis de mettre en évidence la fermentation des sucres suivants : glucose, fructose, maltose, lactose, sucrose, trehalose L-arabinose, ribose, D-xylose, galactose, mannose, mannitol, N-Acetyl-Glucosamine, amygdaline, arbutine, salicine, melibiose, melezitose, raffinose, gentiobiose, D-turanose, et gluconate. L'hybridation ADN-ADN réalisée a révélé une homologie de séquence de 68% avec la souche de référence, identifiant ainsi la souche de *Lactococcus sp.* EU2241 comme appartenant à l'espèce *piscium*. *Lactococcus sp.* EU2241 fut enregistrée sous le nom *L. piscium* CNCM I-4031. Lors d'application en biopréservation sur saumon fumé et crevettes cuites naturellement contaminées, sous vide (Matamoros *et al.*, 2009a), *L. piscium* CNCM I-4031 a montré des capacités à retarder l'altération sensorielle de ces produits. Les études préliminaires de détermination des voies d'inhibition des flores, ont montré que cette souche n'utilisait pas les moyens classiques d'inhibition, comme la production de bactériocines. L'utilisation d'une telle souche naturellement présente dans le poisson frais, pour la biopréservation semble prometteuse, mais l'étude de ses capacités bioprotectrices et l'identification des mécanismes d'inhibition doivent être approfondis.

3.2 Mécanismes d'interactions bactériennes

3.2.1 Production de métabolites inhibiteurs

Les bactériocines

Les bactériocines sont des molécules peptidiques extracellulaires qui sont synthétisées par certaines bactéries et dirigées contre des espèces taxonomiquement proches. La production de bactériocine est observée chez presque tous les genres représentant des bactéries lactiques. On distingue trois catégories de bactériocines classées suivant leur poids moléculaire et leur nature: les lantibiotiques, les peptides de classe II et les peptides de classe III.

Beaucoup de cas d'inhibition de *L. monocytogenes* par des bactéries lactiques sont liés à la production de bactériocines. L'activité anti-listeria des souches de *C. divergens* V41, *C. maltaromaticum* V1 et SF668 dans du saumon fumé (Brillet *et al.*, 2004; Duffes *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2004) est liée à la production de divercine V41 caractérisée par Métivier *et al.* (1998) et de piscicolines V1a et V1b décrites par Bhugaloo.Vial *et al.* (1996). Le caractère amphiphile des bactériocines contribue à limiter leur utilisation comme agent bioprotecteur.

Les bactériocines peuvent en effet interagir avec les protéines de la matrice alimentaire par une réaction d'adsorption. Dans d'autres cas, elles subissent une dégradation protéolytique sur ces aliments. Ainsi, selon les propriétés physico-chimiques de la matrice alimentaire, leur efficacité est mise à mal. Aasen et al. (2003) ont démontré en plus d'une rapide dégradation due à l'activité protéolytique, que 80% de la sakacine P et de la nisine utilisées dans du saumon fumé pour lutter contre *L. monocytogenes* s'adsorbent avec les protéines du saumon.

Les acides organiques

Les acides organiques concernés (lactique, acétique, propionique etc.) sont tous issus de l'activité fermentaire des bactéries avec des sucres comme substrats. Cette production d'acide se traduit par l'abaissement du pH dans le milieu, induisant un ralentissement de la croissance ou la mort cellulaire de micro-organismes sensibles aux pH acides (Abdalla *et al.*, 1993; Jeppesen *et al.*, 1993). Le mode d'action sur les cellules cibles est l'endommagement de la membrane externe causant ainsi une perturbation du potentiel membranaire de la cellule.

Le peroxyde d'hydrogène

C'est un métabolite qui a un effet bactériostatique sur certaines espèces telles que *L. monocytogenes* ou *Salmonella enterica* (Pridmore *et al.*, 2008). C'est un agent oxydant très puissant qui inhibe l'organisme cible en oxydant les protéines essentielles. Dans le cas de *L. monocytogenes*, dans le lait, l'inhibition est renforcée par la réaction de l' H_2O_2 avec les ions thiocyanates (formation d'hypothiocyanate) grâce à l'enzyme lactoperoxydase (Ekstrad, 1994).

Le dioxyde de carbone

Intermédiaire de fermentation de certains substrats par les bactéries lactiques hétérofermentaires, le CO_2 crée des conditions anaérobies dans le milieu, pouvant conduire à l'élimination de bactéries aérobies strictes. Ceci peut en revanche aussi favoriser dans le même temps le développement de flores anaérobies qui peuvent être parfois néfastes.

3.2.2 Compétition nutritionnelle

C'est une relation naturelle impliquant les flores présentes dans un écosystème donné. Afin d'assurer leur croissance, les micro-organismes entrent en compétition pour des éléments limitants, de nature minérale ou organique. Dans le cas des organismes auxotrophes à certains acides aminés, la présence de micro-organismes nécessitant cette source peut déclencher une compétition pour cet élément. Dans le poisson, la faible teneur en fer entraîne une compétition entre *S. putrefaciens* et *Pseudomonas* spp. pour l'acquisition du fer (Ellis et al, 2000). *Pseudomonas* arrive à inhiber *S. putrefaciens* par compétition lorsque la taille de l'inoculum atteint 10^8 UFC/g (Gram et Melchiorson, 1996). Par ailleurs, *Lactobacillus* peut inhiber l'action altérante de *B. thermosphacta* par compétition au niveau du substrat dans la viande conservée à 10°C en condition aérobie (Gardner, 1980). Dans la biopréservation, l'utilisation de bactéries lactiques dans l'inhibition de flores pathogènes ou altérantes par des phénomènes de compétitions est très rarement décrite. Cependant, il a été démontré en milieu modèle par Nilsson et al. (2005) que l'activité inhibitrice de *C. piscicola* A9b, qui est une souche bactériocine négative, contre *L. monocytogenes* est due à une compétition pour le glucose.

3.2.3 La métabiose

Cette forme d'interaction est la plus rencontrée dans la nature. Qualifiée de relation d'interdépendance ou de proto-coopération, elle consiste en la création de conditions favorables pour une bactérie par une autre. Contrairement à l'antagonisme, ici, la modification du pH, la création de l'anaérobiose et la mise à disposition de substrats intermédiaires de dégradation, contribuent au développement de certaines populations bactériennes et non à leur inhibition. S'agissant des substrats, dans plusieurs cas la bactérie dépendante ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire pour s'attaquer à de grosses molécules, et de ce fait dépend d'une autre bactérie capable de dégrader ces molécules. Dans la littérature des interdépendances entre les bactéries lactiques et entérobactéries sont très relatées. Borch et al. (1996) ont montré qu'en co-culture les bactéries lactiques et *Hafnia alvei* pouvaient causer une altération de la viande sous vide contrairement aux cultures pures. Dans le saumon fumé à froid, Joffraud et al. (2006) ont mis en évidence la perte du caractère altérant de *L. sakei* et *S. liquefaciens* lorsqu'elles sont mises en co-culture comparé aux cultures pures dans lesquels leur pouvoir altérant était très marqué. Ils ont aussi démontré dans la même étude que l'association de souches de *C. piscicola* et *Vibrio* sp., deux germes non altérants en culture pure, provoquait l'apparition de mauvaises odeurs très marquées. Jorgensen et al. (2000) ont

démontré que l'augmentation de la production de putrescine dans le saumon fumé quand les souches de *Hafnia alvei* ou *S. liquefaciens* sont en co-culture avec *L. sakei* ou *C. divergens* était liée à un métabolisme inter espèce de l'arginine. Dans le lait réfrigéré, la production d'acide lactique par les lactocoques présents accélère la croissance de *P. fluorescens*. Cette espèce de *Pseudomonas* est incapable d'utiliser les sources de carbone et d'azote du milieu quand sa population est inférieure à 10^5 UFC/ml. La présence des lactocoques lève cette inhibition par la production d'acide lactique, qui est métabolisé par *P. fluorescens* (Sanjose *et al.*, 1987). En retour, la création de l'anaérobiose par *Pseudomonas* dans le biofilm formé avec les lactocoques stimule la croissance de ces derniers.

3.3 Réglementation de l'utilisation des microorganismes protecteurs

En Europe, les ferments incorporés traditionnellement (avant Mai 1997) dans les denrées alimentaires, si elles participent à la fabrication du produit par la fermentation ou sont utilisées pour un effet probiotique, sont jusqu'à présent considérées comme des ingrédients. Selon Wessels *et al.* (2004) l'utilisation non traditionnelle de cultures dans l'industrie alimentaire dans l'unique but d'exercer un effet conservateur sur l'aliment ne relève pas du règlement sur les nouveaux aliments (règlement Novel Food).

En revanche, elle soulève la question du statut et de la sécurité de ces cultures pour lequel il n'existe pas de réglementation en vigueur à l'heure actuelle en Europe, même si des discussions sont en cours. Le statut de GRAS (generally recognized as safe) importé des USA, ne trouve pas exactement son équivalent en Europe même si depuis 2007, la notion de QPS (Qualified Presumption of Safety) qui est une méthodologie pour justifier de la sécurité ou de l'innocuité des micro-organismes utilisés s'en approche. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments a en effet établi des critères d'acceptabilité pour élaborer une liste de 73 espèces bactériennes bénéficiant du statut QPS, dont 47 appartiennent aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Propionibacterium* (EFSA 2007 et 2008). Pour l'instant le statut QPS ne concerne que les micro-organismes entrant dans la chaîne alimentaire qui font l'objet d'une demande d'autorisation auprès de l'EFSA (microorganismes producteurs d'additifs pour l'alimentation humaine ou animale, d'enzymes alimentaires, ou utilisés pour la protection des végétaux). Il ne concerne donc pas les microorganismes utilisés comme ferments ou cultures protectrices

directement dans les aliments. Pour cette raison, des demandes de statut QPS pour des bactéries potentiellement bioprotectrices, telles que *C. maltaromaticum* et *divergens*, *L. piscium* ou *L. gelidum* qui ne font pas partie de la liste actuelle ne sont donc pas recevables.

Actuellement, un ferment LLO (BIOCEANE) est commercialisé en France pour augmenter la DLC des crevettes tropicales cuites décortiquées emballées sous atmosphère protectrice sans ajout d'additif chimiques. Des applications à la coquille St Jacques sont également développées. Des ferments bioprotecteurs généralement à activité anti-*Listeria* sur la viande sont aussi commercialisés comme HOLDBAC™ (Danisco, DK), SafePro® (CHR Hansen, DK), Bovamine Meat Culture™ (NPC, US).

Dans l'attente d'une réglementation plus précise, le statut QPS peut cependant être utilisé comme base pour déterminer les informations requises pour l'innocuité des souches bioprotectrices.

4. La microbiologie prévisionnelle pour prévoir le développement et les interactions bactériennes

La microbiologie prévisionnelle consiste à utiliser des modèles mathématiques pour décrire l'évolution des micro-organismes en fonction de l'effet des paramètres physico-chimiques régissant leur développement. La microbiologie prévisionnelle permet aux industriels et aux scientifiques du monde de l'alimentaire de répondre à des questions ou de donner des explications sur les phénomènes d'altération et/ou de prévoir le développement de bactéries pathogènes et ainsi d'optimiser la qualité des produits. En résumé, elle permet de répondre entre autres aux questions essentielles suivantes :

- Comment maîtriser le développement microbien dans un produit en modifiant sa composition tout en gardant ses qualités organoleptiques?
- Quels sont les facteurs essentiels les plus influents sur la qualité des produits?
- Quelles combinaisons microbiologiques et/ou physico-chimiques, permettent d'obtenir une meilleure sécurité des aliments?
- Quel est le seuil de tolérance de contamination microbiologique durant les procédés de fabrication ou de transformation?
- Comment peut-on déterminer la durée de vie optimale d'un aliment?

La résolution de ces interrogations constitue un enjeu capital pour la maîtrise de la qualité des produits de la mer.

4.1 Les modèles prédictifs

Les modèles mathématiques existant pour la prédiction du comportement microbien dans des conditions précises sont réunis en deux groupes : les modèles cinétiques et les modèles probabilistes. Ces deux types de modèle diffèrent par leurs principes de base. Les modèles cinétiques sont plutôt orientés vers une estimation de la réponse (croissance, survie etc.) d'une population microbienne soumise à des conditions environnementales quelconques. Les modèles probabilistes évaluent la probabilité qu'un germe pathogène puisse, par sa dynamique de croissance, être responsable d'une toxi-infection alimentaire. Au sein du modèle cinétique, on distingue trois niveaux de modèles : les modèles primaires, les modèles secondaires et les modèles tertiaires. Les modèles tertiaires cherchent à faire un lien entre les primaires et les secondaires. Dans ce qui suit ne seront traités que les modèles cinétiques.

4.1.1 Les modèles primaires

Les modèles primaires décrivent le changement de la densité microbienne en fonction du temps dans des conditions environnementales constantes. Les modèles primaires permettent la détermination des paramètres de croissance de la souche étudiée : le temps de latence (lag), le taux de croissance maximum (μ_{\max}), le nombre de cellules maximum (N_{\max}). Pour la détermination de ces paramètres, les modèles primaires les plus utilisés sont ceux de Gompertz (1825), Baranyi (1993) et Rosso (1995).

4.1.2 Les modèles secondaires

Les modèles secondaires permettent d'étudier l'effet des facteurs environnementaux biotiques et abiotiques sur les paramètres de croissance microbienne. Il en existe deux types : les modèles polynomiaux et les modèles progressifs.

Les modèles polynomiaux

La première approche dite polynomiale vise à déterminer simultanément l'impact des facteurs environnementaux en combinaison sur les paramètres de croissance. C'est une approche qui demande beaucoup de manipulations. Elle fait appel aux plans d'expérience qui peuvent être difficiles à mettre en place. Certes très adaptés pour déterminer les interactions qui peuvent exister entre différents facteurs, ses limites résident dans son domaine de validité. Il est donc

nécessaire de définir un domaine d'expérimentation bien précis. En effet c'est une approche qui n'est valable que dans le domaine d'expérience étudié et dans la matrice où ont été faites les expériences. L'équation des modèles secondaires de type polynomiaux s'écrit comme suit :

$$\mu = a_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

Avec a_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_{12} , b_{13} , b_{23} les constantes qui traduisent les effets propres de chaque facteur (x_1 , x_2 , x_3) et leurs éventuelles interactions (x_1x_2 , x_2x_3).

Les modèles progressifs

Pour cette deuxième approche secondaire qualifiée de progressive, la démarche consiste à étudier l'effet de chaque facteur indépendamment sur les paramètres de croissance. Un modèle global multiplicatif (appelé gamma concept) intégrant chacun des modèles décrits pour chaque facteur est ensuite établi. Cette approche implique l'indépendance de l'effet des facteurs environnementaux. Cependant des modèles prenant en compte les interactions entre les facteurs sont récemment proposés. Ce genre d'approche est plutôt avantageux en milieu liquide. Exemple d'équation intégrant les facteurs température, pH et sel.

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot \gamma(T) \cdot \gamma(\text{pH}) \cdot \gamma(\text{NaCl})$$

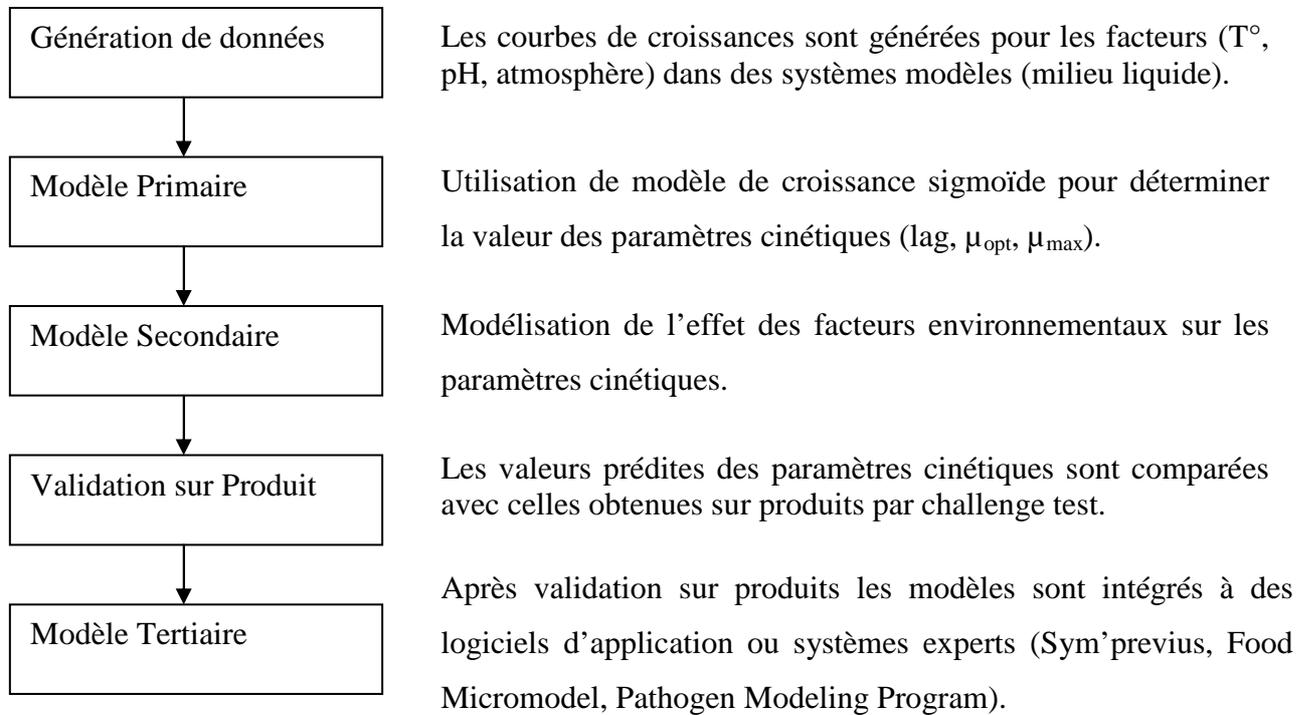
$$\gamma(x) = \frac{(x - x_{\max})(x - x_{\min})^2}{(x_{\text{opt}} - x_{\min}) \left[(x_{\text{opt}} - x_{\min})(x - x_{\text{opt}}) - (x_{\text{opt}} - x_{\max})(x_{\text{opt}} + x_{\min} - 2x) \right]}$$

Avec x_{opt} , la valeur de x permettant une croissance optimale; x_{\min} et x_{\max} , la valeur de x où aucune croissance n'est possible.

4.2 Méthodologie pour des modèles progressifs

La démarche en microbiologie prévisionnelle suit un certain cheminement allant de la génération de données à la validation sur produit en passant par des postulats modulaires de niveau primaire, secondaire et tertiaire. Tous les paramètres ne sont pas modélisés dans la littérature. Seuls ceux qui sont jugés déterminants c'est à dire jouant un rôle clé dans le

comportement des micro-organismes le sont. Les facteurs les plus étudiés sont: la température ($T^{\circ}\text{C}$), l'activité de l'eau (a_w) et le pH. Cependant autres facteurs tels que la concentration en acides organiques et en dioxyde de carbone deviennent de plus en plus décrits.



La prédiction du comportement d'un germe, nécessite plusieurs étapes correspondantes à celles énumérées ci-dessous. Dans un premier temps, Il est primordial de bien choisir le milieu de culture et les paramètres physico-chimiques (facteurs environnementaux) à étudier (T° , pH, A_w etc.). La connaissance de ces facteurs doit permettre de poser pour chaque facteur des niveaux de valeurs correspondants à un intervalle dans lequel le germe étudié peut vivre. Ce choix est réalisé en se basant sur les données bibliographiques existantes. Les milieux de culture utilisés sont en général des milieux modèles (Brain Heart Infusion, Elliker ...). Cependant, certains auteurs utilisent des broyats ou des extraits liquides du produit étudié.

Les données recueillies après expérimentations sont utilisées pour modéliser les paramètres de croissance bactérienne et les interactions de certains facteurs s'il en existe. La détermination des paramètres de croissance est souvent faite par le biais des modèles primaires. Néanmoins ils peuvent être déduits graphiquement ou par méthode statistique. Pour déterminer les

éventuelles interactions et les effets des facteurs sur le comportement du germe les modèles secondaires les plus appropriés sont mis à contribution. Cependant avant toute utilisation pour prédire le comportement du germe, le modèle choisi devra être validé en utilisant des tests sur la matrice alimentaire par mise en place de challenge test. Ainsi les valeurs prédites et les valeurs obtenues sur produits seront confrontées et suivant les écarts observés (calcul du facteur de biais) le modèle pourra être validé ou rejeté.

4.3 Application

Pour certains produits comme les produits de la mer, propices au développement de bactéries pathogènes et altérantes, posséder un outil qui permet de prédire le comportement de ces dernières est essentiel pour en assurer la sécurité et la qualité. Actuellement des bases de données et des programmes permettant de prédire les réponses bactériennes à des conditions environnementales variables sont disponibles, les plus utilisés étant: Symprevius, Combase, Seafood Spoilage and Safety Predictor. Dans la littérature, beaucoup de modèles prédictifs existent, la plupart étant destinés à l'étude de bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes* (Augustin *et al.*, 2005; Cornu *et al.*, 2006; Mc Clure *et al.*, 1997; Wijtzes *et al.*, 1993). Cornu *et al.* (2006) ont modélisé la croissance de *L. monocytogenes* sur le saumon à 4°C et 8°C en fonction de la température, du taux de sel et des composés phénoliques. Certains auteurs tels que Breidt *et al.* (1998), Gimenez *et al.* (2004) ont développé des modèles permettant de prendre en compte le comportement des bactéries en co-culture. Dans l'étude de Breidt *et al.* (1998), il a été démontré que le pH était le facteur clé limitant la vitesse de croissance de *L. monocytogenes* en co-culture avec *L. lactis* LA221. L'étude de Gimenez *et al.* (2004) a permis de mettre en évidence que la croissance de *L. monocytogenes* est contrôlée par le développement simultanée des bactéries lactiques en fonction des facteurs environnementaux. Certains modèles étudiant le comportement des bactéries pathogènes en cultures mixtes avec les bactéries lactiques ont été intégrés dans des logiciels et mis en ligne (Seafood Spoilage and Safety Predictor, Dalgaard *et al.*, 2002). Malgré l'abondance de modèle de prédiction, peu de données existent sur les flores d'altérations. Les travaux de Dalgaard (1995) ont permis de prédire la durée de vie de la morue fraîche en cas de croissance des bactéries d'altération comme *P. phosphoreum* ou *S. putrefaciens*. D'autres auteurs (Baranyi *et al.*, 1996; Mc Clure *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2009) ont développé des modèles permettant de prédire le comportement de la bactérie d'altération *B. thermosphacta* en fonction des paramètres environnementaux. Mc Clure *et al.* (1993), en utilisant un modèle

secondaire polynomial ont défini l'optimum de croissance de *B. thermosphacta* dans les intervalles suivants: $23 \leq T^{\circ} \leq 24$; $6.8 \leq \text{pH}_{\text{opt}} \leq 6.9$; $\text{NaCl}_{\text{opt}} \leq 0.7\%$. Des données de croissance de *B. thermosphacta* sont disponibles sur la viande dans laquelle elle est considérée comme l'altérant majeur. Néanmoins, des données sur les produits de la mer et spécialement la crevette cuite décortiquée où elle a été identifiée comme l'un des altérants majeurs, restent à produire. Si des modèles prédictifs sur les interactions entre bactéries pathogènes et bactérie lactiques existent, rien n'est développé pour prédire le comportement de bactéries lactique à profil bioprotecteur comme *L. piscium* CNCM I-4031.

Chapitre I

Activité antimicrobienne de *L. piscium* contre *B. thermosphacta*

1-1 Inhibition de *Brochothrix thermosphacta* et amélioration de la qualité organoleptique de la crevette tropicale cuite décortiquée par *Lactococcus piscium* CNCM I – 4031.

Publication 1 : Fall, P.A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F., Pilet, M.F., 2010.
Letters in Applied Microbiology 50, 357-361.

1-2 Évolution physico-chimique et sensorielle de la crevette tropicale cuite décortiquée inoculée avec *Lactococcus piscium* CNCM I – 4031 et *Brochothrix thermosphacta* et entreposée à 8°C.

Publication 2: Fall, P.A., Pilet, M.F., Leduc, F., Cardinal, M., Guérin, C., Duflos, G., Leroi, F., 2011. International Journal of Food Microbiology in Press.

Introduction

Les produits de la mer légèrement préservés (saumon fumé, carpaccio de poisson, crevette cuite...) du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques, constituent des niches écologiques très appréciées des bactéries pathogènes ou d'altération. L'utilisation des bactéries à activité antimicrobienne pour lutter contre cette flore indésirable est de plus en plus décrite dans la littérature (Calo-Mata *et al.*, 2008; Dortu et Thonart, 2009). Cependant, les applications de cette technologie concernent en priorité la lutte contre les flores pathogènes. Plusieurs études ont montré l'efficacité d'un certain nombre de bactéries lactiques (*C. divergens*, *C. maltaromaticum*, *L. piscium*...) contre *L. monocytogenes* (Brillet *et al.*, 2005 ; Matamoros *et al.*, 2009b). Très rarement décrite, l'investigation de l'inhibition des flores d'altération par des souches de bactéries lactiques est ici menée. La souche, *L. piscium* CNCM I-4031 isolée par Matamoros *et al.* (2009b) a montré des capacités d'amélioration de la qualité organoleptique de crevettes naturellement contaminées sans qu'il soit possible d'identifier précisément les microorganismes d'altération spécifiquement inhibés. L'objectif de ces travaux est d'étudier les interactions possibles entre la souche bioprotectrice *L. piscium* CNCM I-4031 et *B. thermosphacta* l'une des bactéries altérantes majeures de la crevette cuite.

Dans une première étude, le spectre d'activité de la souche de *L. piscium* a été testé en milieu Elliker gélosé et en jus de crevette gélosé sur 25 bactéries indésirables choisies parmi la microflore pathogène et altérante, isolée de produits de la mer. Afin d'élucider les raisons de son activité spécifique, son application à l'inhibition de *B. thermosphacta* ensemencé à 10^3 UFC/g sur crevette tropicale a été suivie pendant 21 jours à 8°C. Au final la matrice crevette a été chimiquement caractérisée afin de réaliser un milieu chimiquement défini pouvant permettre d'élucider des mécanismes d'action qui seront éventuellement impliqués dans l'inhibition de la souche indésirable.

Dans une deuxième partie, pour confirmer l'activité spécifique de *L. piscium* (10^6 UFC/g) sur *B. thermosphacta* (10^3 UFC/g), une deuxième application sur crevettes stériles contaminées artificiellement par *B. thermosphacta* a été réalisée en triplicats et suivie pendant 31 jours à 8°C. Dans cette partie, l'impact du métabolisme de chaque souche sur la qualité organoleptique du produit a été suivi. Pour ce faire, une analyse sensorielle permettant de suivre l'évolution organoleptique du produit par un jury entraîné, a été entreprise, ainsi que le dosage des composés volatils produits. Dans le but de vérifier l'hypothèse d'une compétition

nutritionnelle entre les deux souches, la production d'acide lactique, le pH, le dosage du glucose et des acides aminés libres ont été suivis au cours de l'expérimentation.

Principaux résultats

Dans la première étude (publication parue dans *Letters in Applied Microbiology*) le spectre d'activité de la souche de *L. piscium* face à des flores pathogènes et altérantes isolées de produits de la mer a été réalisé en employant la technique de la double couche sur gélose molle. Cette technique consiste à déposer 3 spots de 10 µl de la souche étudiée sur un milieu gélosé puis au bout de 10 jours de croissance à 15°C, un milieu à gélose molle contenant la souche cible est coulé au dessus de la première. L'inhibition de la souche cible se manifeste par la présence d'une zone translucide autour du spot de la souche protectrice. Les résultats du profil antimicrobien de *L. piscium* sur milieu Elliker, ont montré qu'elle exerce un pouvoir inhibiteur sur 16 des 25 souches testées incluant des bactéries à Gram négatif. En milieu jus de crevette aucune inhibition de ces souches n'a été observée, malgré une baisse de pH similaire dans les deux cas.

Sur matrice crevette, lorsqu'elles sont inoculées en culture pure, *L. piscium* (10^6 UFC/g) et *B. thermosphacta* (10^3 UFC/g) s'implantent rapidement sur le produit en atteignant une population maximale de 9 Log UFC/g en 3 et 14 jours respectivement. Cependant, dans la culture mixte, la croissance de *B. thermosphacta* est inhibée de 4 Log UFC/g au bout de 14 jours. Les résultats de l'évolution du pH montrent une diminution allant de 6,6 à 5,9 dans les trois lots inoculés, avec une acidification plus élevée dans les lots inoculés avec *L. piscium* par rapport aux lots inoculés avec *B. thermosphacta* en culture pure.

La comparaison des compositions de la crevette et du jus de crevette a mis en évidence une quantité équivalente d'hydrates de carbones (glucose essentiellement) mais une diminution importante des teneurs en protéines et acides aminés dans le jus de crevette lié à l'étape d'ébullition. L'hypothèse de l'implication de ces composés dans l'inhibition observés sur matrice crevette reste cependant à vérifier. La caractérisation de ces matrices permettra de mettre au point un milieu chimiquement défini de composition proche de la crevette pour l'étude des interactions bactériennes.

Dans la deuxième série d'expérimentation (publication soumise dans *International Journal of Food Microbiology*), *L. piscium* a confirmé son pouvoir inhibiteur envers *B. thermosphacta* en l'inhibant de 4 log UFC/g comme précédemment, l'inhibition étant maintenue pendant 31 jours de stockage.

Les résultats issus de l'analyse sensorielle confirment le caractère altérant de *B. thermosphacta*, qui arrive à altérer le produit après 11 jours d'incubation à 8°C avec une émission de forte odeur de beurre caramel pouvant être liée à la production des molécules suivantes : 2,3 butanedione, cyclopentanol, 3-methylbutanol, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 4-methyl-3chloro-3-pentanol, ethanol et diacétyle. Ce caractère altérant est noté lorsque la population de *B. thermosphacta* atteint 8 Log UFC/ml. Par ailleurs, lorsqu'elle est co-inoculée avec *L. piscium*, *B. thermosphacta* n'atteint pas un niveau de population lui permettant d'altérer le produit, il en résulte une amélioration de la qualité organoleptique des crevettes et une extension de leur durée de conservation de plus de 20 jours. Quand au lot inoculé avec *L. piscium* en culture pure (témoin), il a été déclaré non altéré par le jury durant les 31 jours d'incubation. Afin de déterminer les mécanismes d'action impliqués dans cette inhibition, la croissance de *B. thermosphacta* a été suivie en présence de la quantité d'acide lactique (1850 mg/kg) produite par *L. piscium*. Les résultats obtenus n'ont pas permis de démontrer l'implication de l'acide lactique dans cette inhibition car la croissance de *B. thermosphacta* n'est pas affectée par la présence de l'acide. Par ailleurs, une compétition pour les acides aminés libres ne semble pas être non plus à l'origine de l'inhibition car les profils observés dans les différents lots sont similaires.

Les tentatives d'élucidation des mécanismes d'action impliqués dans cette inhibition, n'ont pas été concluantes sur milieu chimiquement défini proche de la crevette (Voir composition et condition dans le chapitre 3), du fait de l'absence totale de croissance de la souche de *B. thermosphacta* dans ce milieu.

1-1 Inhibition de *Brochothrix thermosphacta* et amélioration de la qualité organoleptique de la crevette tropicale cuite décortiquée par *Lactococcus piscium* CNCM I – 4031.

Publication 1 : Fall, P.A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F., Pilet, M.F., 2010.
Letters in Applied Microbiology 50, 357-361.

ORIGINAL ARTICLE

Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031

P.A. Fall¹, F. Leroi¹, M. Cardinal¹, F. Chevalier¹ and M.F. Pilet²

¹ Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, Ifremer, Nantes, France

² UMR INRA 1014 Secalim ENVN/ENITIAA. ENITIAA, Nantes, France

Keywords

biopreservation, *Brochothrix thermosphacta*, inhibition spectrum, *Lactococcus piscium*, *Penaeus vanamei*, shrimp composition.

Correspondence

Françoise Leroi, Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, Ifremer, Rue de l'île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France. E-mail: Francoise.leroi@ifremer.fr

2009/1737: received 2 October 2009, revised 21 December 2009 and accepted 23 December 2009

doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02801.x

Abstract

Aims: To investigate the antimicrobial spectrum of *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 and its protective effect in cooked and peeled shrimp against *Brochothrix thermosphacta*.

Methods and Results: Sixteen pathogenic and spoiling bacteria were inhibited in Elliker, but not in shrimp juice agar plates. In shrimp packed under modified atmosphere and stored at 8°C, *B. thermosphacta* (10^3 CFU g⁻¹) was inhibited by 4.1 log CFU g⁻¹ when co-inoculated with *L. piscium* (10^6 CFU g⁻¹). *Brochothrix thermosphacta* spoiled the product after 11 days, with the emission of strong butter/caramel off-odours. In co-culture with *L. piscium*, sensory shelf-life was extended by at least 10 days. The inhibition was partially explained by a drop in pH from 6.6 to 5.6. The physicochemical composition of shrimp and shrimp juice was established to identify the inhibition mechanisms involved.

Conclusion: *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 has a wide antimicrobial spectrum. The strain inhibits *B. thermosphacta* in shrimp and significantly prolongs sensory shelf-life.

Significance and Impact of the Study: *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 is shown to be a promising agent for improving shrimp quality and may be tested against pathogens and in other food matrices. Knowledge of the physicochemical composition of shrimp and shrimp juice will allow the development of a chemically defined model medium for determining the inhibition mechanisms involved.

Introduction

Lightly preserved seafood products like cold-smoked fish, fish carpaccio and cooked shrimp are highly perishable, because of their physicochemical parameters that allow the growth of pathogenic and spoiling bacteria. Preserving food products against unwanted micro-organisms by using endogenous and selected protective micro-organisms is subject to increasing investigation (Calo-Mata *et al.* 2008; Dortu and Thonart 2009). In seafood, many studies have underlined the efficiency of lactic acid bacteria (LAB) such as *Carnobacterium maltaromaticum*, *C. divergens*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc gelidum* and

Lactococcus piscium in inhibiting the growth of pathogens such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* (Brillet *et al.* 2005; Matamoros *et al.* 2009a). By contrast, the inhibition of spoiling micro-organisms has rarely been reported.

In a recent study, the strain of *L. piscium* CNCM I-4031 (previously named EU2241) showed itself capable of delaying the sensory spoilage of naturally contaminated vacuum-packed cooked and peeled tropical shrimp (Matamoros *et al.* 2009a). However, this sensory improvement could not be correlated to the microbial flora enumerated, and the inhibition mechanism was not elucidated, though, interestingly, no bacteriocin was produced.

The aim of this study was to bring to light factors capable of explaining the bioprotective effect of *L. piscium* CNCM I-4031. The inhibitory spectrum of *L. piscium* against a wide selection of spoiling and pathogenic bacteria isolated from seafood products was performed *in vitro*. Inhibition activity against one of the most spoiling bacteria, *Brochothrix thermosphacta*, recently identified in shrimp (Laursen *et al.* 2006), was investigated in peeled and cooked shrimp packed under modified atmosphere (MA). Finally, the physicochemical composition of shrimp was determined to develop a chemically defined model broth that will be useful for studying the inhibition mechanisms involved.

Materials and methods

Strains

Lactococcus piscium EU2241 was isolated from commercial (supermarket) fresh salmon steak packed under MA and identified with phenotypic and molecular tests (complete 16S rRNA gene sequencing) by Matamoros *et al.* (2009b). This strain was deposited in the national collection of micro-organisms cultures of Pasteur Institute (Paris, France) with the reference number CNCM I-4031.

Twenty-five strains including pathogenic and spoiling micro-organisms isolated from commercial seafood products and two reference strains were tested for their sensitivity to *L. piscium* CNCM I-4031: *Staph. aureus* CIP 76:25 and *Escherichia coli* CIP 76:24 (Pasteur collection, Paris, France), *B. thermosphacta*, *C. divergens*, *C. maltaromaticum*, *C. alterfunditum*, *Carnobacterium* sp., *Vagococcus fluvialis*, *V. carniphilus*, *Enterococcus faecalis*, *Lact. sakei*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia* sp., two *Vibrio* sp., *Photobacterium phosphoreum*, one Gram-, oxidase+, cocobacilli and three unidentified Gram-, oxidase+ rods (Ifremer collection, Nantes, France), *L. monocytogenes*, *Salmonella* Weltevreden, *Salm. enterica* serovar Typhimurium, *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* (CEVPM collection, Boulogne, France). All the strains were isolated from raw or cooked shrimp except *P. phosphoreum* and *Lact. sakei* from cold-smoked salmon.

Media and culture conditions

For all the experiments, the strains were cultivated during two successive periods of 24 h in Elliker broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and shrimp juice. The incubation temperatures were 15°C for *P. phosphoreum* and 20°C for the other strains.

Shrimp juice was prepared by crushing 2.3 kg of thawed raw peeled shrimp from Columbia (farmed *Penaeus vanamei*, without sulfite, purchased from industry,

Nantes, France) in a Waring Blender (New Hartford, CT, USA) with 4.6 l of distilled water. The mixture was boiled for 2 min and filtered through a filter (no. 127, Durieux Paris, France). NaCl 20 g l⁻¹ was added to the clear broth obtained before autoclaving at 100°C for 30 min. 2.8 l of juice was obtained from 2.3 kg of shrimp. For the shrimp agar and shrimp molten agar preparations, 15 and 10 g l⁻¹ of agar (Biokar diagnostics) respectively were added to the shrimp juice.

Inhibitory spectrum

The inhibitory spectrum of *L. piscium* was obtained by using a double-layer technique proposed by Matamoros *et al.* (2009b) with some modification. Briefly, 10 µl of *L. piscium* precultivated in Elliker and shrimp juice was spotted onto Elliker and shrimp agar plates respectively (three spots/plate) and incubated aerobically at 15°C for 10 days. The 25 target strains were precultivated in Elliker and shrimp juice. One millilitre of a thousand-fold dilution of these cultures was then added individually to 15 ml of Elliker and shrimp molten agar respectively and spread onto previously incubated Elliker and shrimp agar plates. After 24 h of aerobic incubation at the appropriate target strain temperature, the plates were examined for evidence of an inhibition zone.

Challenge tests

Frozen peeled shrimp (the same batch as for the shrimp juice) were cooked in 3% (w/v) of salt water at 100°C for 2.5 min and rapidly cooled to 4°C. The final salt concentration in the meat was 1.2% (w/w). Three batches of cooked shrimp were then inoculated at 2% (v/w) with cultures of the following strains: *L. piscium* (1.8 × 10⁶ CFU g⁻¹), *B. thermosphacta* CD340 alone (2.9 × 10³ CFU g⁻¹) and a mixture of *L. piscium* and *B. thermosphacta*. The shrimp were packed (90 g per sample) under MA (50% N₂-50% CO₂) and then stored at 8°C for 3 weeks. A noninoculated batch for sterility control was also prepared. Every 3 days, samples from each batch were analysed for microbial content, sensory analysis and pH, trimethylamine oxide (TMA-O), trimethylamine (TMA) and total volatile basic nitrogen (TVBN) (Conway and Byrne 1933). For microbial counts, 20 g of each batch was blended with 80 ml of physiological solution (0.85% NaCl, 0.1% peptone) with a stomacher 400 (Seward Medical, London, UK) for 2 min. *Lactococcus piscium* was enumerated by spread plating onto Elliker agar plates incubated at 25°C for 48 h under anaerobiosis, while *B. thermosphacta* were spread plated on streptomycin sulfate thallous acetate agar (STAA) with selective supplement (Oxoid, Hampshire, UK) (20°C, 48 h). In the

control, total viable count was enumerated by pour plating in Plate Count Agar (PCA, Biokar) (30°C, 72 h).

Sensory analysis

Shrimp inoculated with *L. piscium* and *B. thermosphacta* in single and mixed cultures were sensory evaluated during storage time by eleven trained judges from Ifremer. Each panellist evaluated three portions (15 g) of shrimp from each batch at each time of analysis. Off-flavours of samples were evaluated by using a scale with four classes (class I: nonspoiled, class II: very lightly spoiled, class III: lightly spoiled and class IV: strongly spoiled). The sensory rejection time was estimated when samples were placed in class IV by 50% of the panellists. Odour descriptors, evaluated as described by Matamoros *et al.* (2009a), were rice/crustacean, butter/caramel, pyrrolidin/sperm, floorcloth, sour/fermented, amine, cheese/foot and cabbage/H₂S.

Shrimp meat and shrimp juice composition

Water, protein, salt, carbohydrate and total amino acids were determined in triplicate in fresh shrimp and shrimp juice. For water content, 8 g of sample was dried at 105°C overnight. Mineral content was determined by heating dried samples in a muffle furnace at 550°C until they became white. The Kjeldahl method (Crooke and Simpson 1971) was used to determine total proteins. Salt content was measured with a chlorine analyser (Sherwood MK II analyser 926, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instruction. Total amino acid composition was measured on a lyophilized sample by digestion of 15 mg in 6 mol l⁻¹ HCl at 110°C overnight in a sealed hydrolysis vial purged with nitrogen. Samples were then derivatized with EZ, using a fast kit (Phenomenex, Le Pecq), and analysed by gas chromatography (Perkin ELMER Autosystem XL, Norwalk, USA) with a Zebron ZB-AAA column (10 m × 0.25 mm), a flame ionization detector and helium as gas vector. The column temperature was increased from 110 to 320°C at 32°C min⁻¹. Sugar content was measured by the colorimetric method of Dubois *et al.* (1956) modified by Chaplin (1986). The nature of the sugar was identified by gas chromatography using the method of Kamerling *et al.* (1975) modified by Montreuil *et al.* (1986). The injection of compounds derived from glycoside residues was performed on an AT 6890N chromatograph (Agilent Technologies, USA) equipped with an automatic sample loader, a CP-Sil-5CB column of molten silica (Chrompack) with helium as carrier gas and a flame ionization detector. The temperature profile was programmed as follows: 50°C for 1 min, from 50°C to 120°C at 20°C min⁻¹, from 120 to 240°C at 2°C

min⁻¹, from 240 to 280°C at 10°C min⁻¹ and 280°C for 10 min.

Results

Lactococcus piscium demonstrated antagonistic activity against 16 of the 25 strains tested on Elliker agar plates, but no inhibition was recorded in shrimp agar (data not shown). All the Gram-positive bacteria were inhibited except for one *Carnobacterium* sp. strain. As for the Gram-negative bacteria, *E. coli*, *Salm. Weltevreden*, *Salm. enterica* serovar Typhimurium and *Serratia* sp. were inhibited, whereas the different *Vibrio*, *P. phosphoreum* and three unidentified Gram-, oxidase+ rods were not.

In the control, no colony was enumerated on PCA (threshold 5 CFU g⁻¹). When inoculated alone in the shrimp matrix, *L. piscium* and *B. thermosphacta* grew very well, reaching 8.8 and 8.9 log CFU g⁻¹ after 4 and 14 days of storage respectively (Fig. 1). In batches co-inoculated with *L. piscium*, the growth rate of *B. thermosphacta* was lowered, and the maximum cell number was 4.8 log CFU g⁻¹ corresponding to a 4.1-log CFU g⁻¹ decrease. This inhibition lasted for 21 days of storage.

Sensory analysis indicated that the control and the batch inoculated with *L. piscium* remained unspoiled throughout the storage time, whereas the products inoculated with *B. thermosphacta* CD340 alone were characterized by a strong butter/caramel off-odour from 11 days onwards. In the latter batch, the product was classified as strongly spoiled by 40, 50 and 80% of the panellists after 11, 18 and 21 days respectively. On the contrary, when *B. thermosphacta* was co-inoculated with *L. piscium*, no off-odour was detected, and none of the judges classified the products as strongly spoiled until after 21 days. *Lactococcus piscium* and *B. thermosphacta* did not produce TVBN in either pure or co-culture. Initial TMAO content

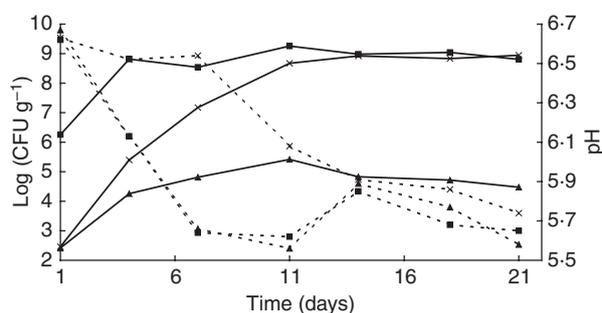


Figure 1 Growth (solid line) and pH (dotted line) of *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 (■), *Brochothrix thermosphacta* CD340 alone (×) and *B. thermosphacta* co-inoculated with *Lactococcus* sp. CNCM I-4031 (▲) in peeled and cooked shrimp packed under modified atmosphere and stored at 8°C.

was 8.4 mg-N 100 g⁻¹, and no TMA was produced. Initial pH was 6.6. A fall to 5.6 and 5.9 was observed respectively in samples with *L. piscium* (pure and mixed culture) after 7 days and *B. thermosphacta* alone after 14 days (Fig. 1).

Water, protein, sugar and amino acid content were compared between shrimp meat in which inhibition was observed and shrimp juice where no inhibition was recorded. Shrimp meat was constituted by 78.3% water and 18.9% protein, whereas only 1.9% protein was found in the shrimp juice. Shrimp meat and juice contained 2.4 g kg⁻¹ and 2 g l⁻¹ carbohydrates respectively, identified as glucose at 99%. Table 1 summarizes the total amino acid concentration in shrimp meat and juice. Arginine, asparagine and glutamine could not be measured with the method used in our study.

Discussion

According to Jaffrès *et al.* (2008), *Carnobacterium* spp., *Vagococcus* spp., *B. thermosphacta* and *S. liquefaciens* make up the majority of bacteria in spoiled cooked and peeled shrimp packed under MA and stored at chilled temperature. All of these species were inhibited in a model medium, indicating that *L. piscium* is a promising strain for sensory shelf-life extension. Potential pathogens, excepting *Vibrio* spp., were also inhibited, which is important for ensuring product safety, particularly ready-to-eat products with extended shelf-life. Its wide spectrum of activity,

especially against Gram-negative bacteria, which is not current for LAB, provides a particular advantage to this bioprotective strain. The absence of a bacteriocin-like component is also a positive point for gaining rapid authorization for food applications. Although pH decreased from 6.6 to 5.6 in 7 days, no odours were perceived by the panellists. Four of them ate the products and could not distinguish them from the sterile control.

The role of *B. thermosphacta* as spoiling bacteria in shrimp demonstrated by Mejlholm *et al.* (2005) was confirmed in this study, but no production of TVBN was detected. The butter/caramel off-odours have already been described in shrimp by Laursen *et al.* (2006) and may be linked to the production of 2-3 butanedione (diacetyl). The rapid inhibitory effect of *L. piscium* against *B. thermosphacta* without changing the product's characteristics is remarkable. Laursen *et al.* (2006) failed to prevent *B. thermosphacta* growth with a *C. maltaromaticum* strain previously selected for its antimicrobial properties and did not extend the sensory shelf-life of shrimp. Inhibition of *B. thermosphacta* by *Lact. sakei* in vacuum-packed beef meat slices stored at 4°C was observed by Katikou *et al.* (2005) but did not exceed 1.5 log. In cooked meat packed under MA at 7°C, a decrease of 3 log was recorded with a strain of *Lact. sakei* subsp. *carneus*, but only after 30-day storage (Vermeiren *et al.* 2006). In our study, *L. piscium* lowered pH from 6.8 to 4.3 in Elliker broth, which might explain the inhibitory activity observed with the double-layer method in agar plates. However, in shrimp juice, pH decreased in the same range, and no inhibition zone was observed in shrimp agar, anticipating other inhibition mechanisms. The decrease in pH in shrimp meat due to *L. piscium* may have contributed to the inhibition of *B. thermosphacta* but cannot totally explain it. Indeed, the model developed by Mc Clure *et al.* (1993), which includes the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature, accurately predicted the maximum cell number (N_{max}) of *B. thermosphacta* in shrimp: Predicted and observed Log₁₀(N_{max}) were respectively 9.3 and 8.9 in our experimental conditions (pH = 6.6, T°C = 8°C and NaCl = 1.2% w/w). In the presence of *L. piscium*, pH dropped to 5.6, and the model under-estimated the inhibition of *B. thermosphacta* (predicted and observed Log₁₀ (N_{max}) were 8.9 and 5.6 respectively) indicating that pH alone is unlikely to be responsible for all the inhibition. The absence of inhibition in shrimp juice agar suggests that compounds such as proteins, peptides and free amino acids present in shrimp meat but not in shrimp juice may be implicated in this competition. The results of shrimp characterization will be useful for setting up a chemically defined model medium to determine the nature of the interaction between these strains.

Table 1 Total amino acid content in fresh shrimp meat and shrimp juice. Values are averages of three analyses ± standard deviation

	Shrimp meat (g kg ⁻¹)*	Shrimp juice (g l ⁻¹)*
Asparagine	nd*	nd*
Aspartic acid	12.6 ± 3.6	0.9 ± 0.07
Arginine	nd*	nd*
Alanine	11.1 ± 0.7	1.2 ± 0.3
Cysteine	nd*	nd*
Glycine	14.2 ± 0.2	3.1 ± 0.6
Glutamic acid	20.3 ± 8.5	1.8 ± 1.2
Glutamine	nd*	nd*
Histidine	0.6 ± 0	0
Isoleucine	6.2 ± 0.9	0.3 ± 0.1
Leucine	13.4 ± 1	0.7 ± 0.1
Lysine	6.6 ± 1.1	0.3 ± 0.1
Methionine	5.3 ± 0.4	0.2 ± 0.0
Proline	8.5 ± 0.7	2 ± 0.8
Phenylalanine	7.8 ± 1.6	0.2 ± 0.0
Serine	5.2 ± 0.9	0.3 ± 0.1
Tyrosine	4.1 ± 0.7	0.3 ± 0.0
Threonine	6.2 ± 0.9	0.3 ± 0.1
Valine	5.8 ± 0.8	0.4 ± 0.1

*nd, not determined.

The protective effect of *L. piscium* CNCM I-4031 found by Matamoros *et al.* (2009a) in naturally contaminated shrimp may be explained by the inhibition of *B. thermosphacta*, a micro-organism that was not enumerated in that study. *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 is a promising strain for improving the quality of lightly preserved seafood products, and more knowledge concerning the inhibition mechanism of this strain is necessary to optimize its use as a protective culture under different environmental conditions and to extend it to other food matrices such as meat.

Acknowledgements

The authors thank Josiane Cornet for her help in sensory analysis, Claire Donnay-Moreno and Jean-Paul Gouyguo for amino acid determination and Jacqueline Ratiskol for carbohydrate analysis.

References

- Brillet, A., Pilet, M.F., Prévost, H., Cardinal, M. and Leroi, F. (2005) Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol* **104**, 309–324.
- Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A. and Barros-Velazquez, J. (2008) Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technol* **1**, 43–63.
- Chaplin, M.F. (1986) Monosaccharides. In *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach* ed Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. pp. 1–36 New York: Oxford University press.
- Conway, E.J. and Byrne, A. (1933) An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. The micro-determination of ammonia. *Biochem J* **27**, 419–429.
- Crooke, W.M. and Simpson, W.E. (1971) Determination of ammonium in Kjeldhal digests of crops by an automated procedure. *J Agric Food Chem* **226**, 497–509.
- Dortu, C. and Thonart, P. (2009) Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation. *Bio-technol Agron Soc* **13**, 143–154.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**, 350–356.
- Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prévost, H., Joffraud, J.J. and Dousset, X. (2008) Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol* **131**, 20–29.
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G. and Clamp, J.R. (1975) Characterization by gas-liquid chromatography mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in methanolysis of glycoproteins and glycopeptide. *Biochem J* **151**, 491–495.
- Katikou, P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P. and Georgakis, S.A. (2005) Effect of *Lactobacillus*-prospective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *J Appl Microbiol* **99**, 1303–1313.
- Laursen, B.G., Leisner, J.J. and Dalgaard, P. (2006) *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *J Agric Food Chem* **54**, 3604–3611.
- Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Kasbi Chadli, F., Cornet, J., Prevost, F. and Pilet, M.F. (2009a) Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *J Food Prot* **72**, 365–374.
- Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost, H. and Leroi, F. (2009b) Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiol* **26**, 638–644.
- Mc Clure, P.J., Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T.M. and Roberts, T.A. (1993) A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *Int J Food Microbiol* **19**, 161–178.
- 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. *J Appl Microbiol* **99**, 66–76.
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G. and Strecker, G. (1986) Glycoproteins. In *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach* ed Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. pp. 143–204 New York: Oxford University press.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., Rajtak, U. and Debevere, J. (2006) The sensory acceptability of cooked meat products treated with a protective culture depends on glucose content and buffering capacity: a case study with *Lactobacillus sakei* 10A. *Meat Sci* **74**, 532–545.

**1-2 Évolution physico-chimique et sensorielle de la crevette tropicale cuite
décortiquée inoculée avec *L. piscium* CNCM I – 4031 et *B. thermosphacta* et
entreposée à 8°C.**

Publication 2: Fall, P.A., Pilet, M.F., Leduc, F., Cardinal, M., Guérin, C., Duflos, G., Leroi, F., 2011. International Journal of Food Microbiology in press.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 during storage at 8 °C

Papa Abdoulaye Fall ^{a,b,c}, Marie France Pilet ^{b,c}, François Leduc ^d, Mireille Cardinal ^a, Guillaume Duflos ^d, Camille Guérin ^a, Jean-Jacques Joffraud ^a, Françoise Leroi ^{a,*}

^a Ifremer, Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, F-44311 Nantes, France

^b LUNAM Université, Oniris, UMR 1014 Secalim, Nantes, F-44307, France

^c INRA, Nantes, F-44307, France

^d Anses, Laboratoire des produits de la pêche, Boulogne/mer, F-62200, France

ARTICLE INFO

Available online xxxx

Keywords:

Biopreservation
Sensory quality
Volatile compounds
Biogenic amines
Amino-acid
TTGE

ABSTRACT

This study investigated the sensory quality and physicochemical evolution (pH, glucose, L-lactic acid, biogenic amine, free amino-acids and volatile compounds) during storage at 8 °C of cooked peeled shrimp inoculated with the specific spoilage bacteria *Brochothrix thermosphacta* alone or mixed with the protective strain *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. Growth of both bacteria was monitored at regular intervals during storage by microbial counts and the thermal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) technique. Bacterial counts showed that *L. piscium* and *B. thermosphacta* inoculated at 7 log CFU/g and 3 log CFU/g were well adapted to shrimp, reaching a maximum level of 9 log CFU/g after 4 days and 10 days respectively. In mixed culture, the growth of *B. thermosphacta* was reduced by 3.2 ± 0.1 log CFU/g. The TTGE technique allowed monitoring the colonisation of the strains on the shrimp matrix and confirming the dominance of *L. piscium* in mixed culture throughout the experiment. Sensory analysis confirmed that *B. thermosphacta* spoiled the product after 11 days, when its cell number attained 8 log CFU/g with the emission of strong butter/caramel off-odours. This sensory profile could be linked to the production of 2,3 butanedione, cyclopentanol, 3-methylbutanol, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 4-methyl-3-chloro-3-pentanol and ethanol, which were produced in more significant quantities in the *B. thermosphacta* batch than in the batches in which the protective strain was present. On the contrary, TVBN and TMA were not suitable as quality indicators for *B. thermosphacta* spoilage activity. In the products where the protective *L. piscium* strain was present, no adverse effect on sensory quality was noted by the sensory panels. Moreover, biogenic amine assessment did not show any histamine or tyramine production by this strain, underlining its safety profile. Both strains produced lactic acid (1850 mg/kg in *L. piscium* and *B. thermosphacta* batch on days 3 and 10 respectively; 3830 mg/kg on day 7 in mixed culture) and the pH decrease from 6.6 ± 0.0 to 5.9 ± 0.1 was similar in all batches. Lactic acid production or competition for free amino-acid was not involved in the inhibition mechanism; however rapid glucose consumption by *L. piscium* could partially explain the growth limitation of the spoilage micro-organism. This study demonstrated the spoilage characteristic of *B. thermosphacta* and the usefulness of *L. piscium* as a bioprotective culture for tropical cooked peeled shrimp without any adverse effect on the sensory quality of the product.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Seafood products permit the development of a wide range of undesirable microorganisms that include spoiling bacteria, due to

their physico-chemical characteristics (neutral pH, high content of small nitrogenous compounds) (Huis in't Veld, 1996). The growth of these unwanted bacteria leads to food spoilage which is a major economic problem. Therefore understanding bacterial mechanisms leading to sensory deterioration and developing methods to preserve seafood is obviously a priority. Ready-to-eat cooked and peeled shrimp packed under modified atmosphere is more and more popular in Europe. This product is highly perishable and shelf-life does not exceed 12 days at 4 °C when no preservatives are applied (French

* Corresponding author at: Ifremer, Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, Rue de l'île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France. Tel.: +33 240374172; fax: +33 240374071.

E-mail address: Francoise.leroi@ifremer.fr (F. Leroi).

company communication). The spoilage microflora of cooked shrimp has been studied recently and includes lactic acid bacteria (LAB) and the specific spoilage organism *Brochothrix thermosphacta* (Dalgaard et al., 2003; Jaffrès et al., 2009; Mejlholm et al., 2005; Laursen et al., 2006). As in most seafood products, microbial spoilage in shrimp often depends on the levels reached by the bacteria involved during storage. Minimising this level may help to fight against seafood product spoilage. To achieve this, the methods usually used are modified atmosphere packaging or the addition of chemical preservatives or often a combination of both these techniques (Al Dagal and Bazarraa, 1999; Mejlholm et al., 2008). In recent years a new approach called biopreservation consisting in preventing the growth of unwanted microorganisms in seafood, by using added microorganisms, generally LAB, has been increasingly investigated as an alternative to chemical preservatives. The microbial antagonism of LAB against undesirable microorganisms has been attributed in many cases to metabolic products such as organic acids or bacteriocin production (Diop et al., 2009; Greer and Dilts, 2006; Mataragas et al., 2003; Pridmore et al., 2008; Smith et al., 2005) and changes in the physico-chemical environment (pH, CO₂ production) or a combination of these factors. Recent works have shown that the inhibition of undesirable bacteria may be correlated to substrate competition (Nilsson et al., 2005). An atypical strain of *Lactococcus piscium* isolated from fresh salmon steak packed under modified atmosphere (Matamoros et al., 2009a) showed a wide spectrum of activity in a model medium including *B. thermosphacta*. This strain revealed capacities for enhancing the shelf life and sensory quality of naturally contaminated seafood product such as shrimp and salmon without bacteriocin production, but no correlation was found between microbial counts (total viable counts, Enterobacteriaceae, LAB) and sensory quality (Matamoros et al., 2009a). Fall et al. (2010a) demonstrated that, this strain could limit the growth of *B. thermosphacta* and thus improve the sensorial quality of cooked shrimp; however, these activities were not linked to any specific metabolism of the strains.

This study was performed to evaluate the spoiling potential of *B. thermosphacta* and the relationship between its growth, metabolite production and sensory degradation observed during storage of tropical cooked peeled shrimp. The metabolism of *L. piscium* and its role as a protective culture were also investigated, as well as the mechanisms involved in its antagonistic effect on *B. thermosphacta*.

2. Materials and methods

2.1. Strains, media and culture conditions

Isolates came from the Ifremer/Oniris culture collection. *L. piscium* CNCM I-4031 (formerly *L. piscium* EU2241) was isolated from fresh salmon steak packed under MA (Matamoros et al., 2009b) and *B. thermosphacta* CD 340 from brined tropical cooked peeled shrimp packed under MA (Jaffrès et al., 2009). For all the experiments, strains were subcultured twice successively for 24 h at 26 °C in Elliker broth (Biokar) for *L. piscium* and 24 h at 20 °C in Brain Heart Infusion (Biokar, Diagnostic Beauvais, France) for *B. thermosphacta*.

2.2. Sterile shrimp preparation

31 kg of frozen tropical peeled and beheaded shrimp (*Penaeus vannamei*) farmed in Colombia (51/60 size i.e. 51 to 60 shrimps per pound) was obtained from a local production site, Miti industry (Nantes, France). Frozen shrimp were cooked at ONIRIS with industrial equipment by immersion in boiling salted water (3% NaCl w/v) for 2.5 min after re-ebullition and cooled in melting ice with 1.5% salt. The shrimp were vacuum packed in plastic bags (1 kg/bag) and stored at –80 °C for 9 days. The frozen cooked peeled shrimp were then sterilised by ionisation at 3.76 ± 0.16 kGy (IONISOS, Pouzauges, France).

2.3. Challenge tests

The cells were not washed before inoculation, but serial dilutions in salted peptone water (0.85% NaCl, 0.1% peptone) were performed to obtain the appropriate inoculum size. Shrimp were inoculated by spraying 10% v/w (5% of pure culture + 5% of water or 5% of protective culture + 5% of target strain for co-inoculation batch) onto the surface of the shrimp to reach a final level of approximately 7 log CFU/g and 3 log CFU/g for *L. piscium* and *B. thermosphacta* respectively. After inoculation, the samples were tumbled manually to ensure good microbial distribution.

Four batches of shrimp were used with different treatments: 1—sterility control, 2—inoculated with *L. piscium*, 3—inoculated with *B. thermosphacta*, 4—co-inoculated with *B. thermosphacta* and *L. piscium*. After inoculation, the shrimp were packed in 125 g portions under MA (50% N₂–50% CO₂) (Multivac T252, Wolfertschwenden, Germany) with a shrimp/gas ratio of approximately 2/1. Samples were stored at 8 °C for up to 31 days and removed after 1, 3, 7, 10, 14, 17, 24 and 31 days storage for microbial, physico-chemical (pH, acetic and lactic acids, total volatile basic nitrogen (TVBN), trimethylamine oxide (TMA-O), trimethylamine (TMA), sugar, volatile compounds, biogenic amines, free amino-acids) and sensory analysis. All the analyses were performed in triplicate, in three separate punnets.

To investigate whether the antimicrobial activity of *L. piscium* was caused by its acid production, a new batch of shrimp was inoculated (5% v/w) by *B. thermosphacta* as described previously, portioned in 125 g packets and stored under the same conditions. After 7 days, all the packets were opened and half of them were sprayed with 5% (v/w) water and half with 5% (v/w) sodium lactate solution (44.7 g/l), in order to reach the maximum concentration of lactic acid naturally produced by *L. piscium* measured in this study. The shrimp were packed again under MA and *B. thermosphacta* was enumerated on days 0, 7, 14 and 24.

2.4. Microbial analysis

At each sampling time, the shrimp (20 g) were taken aseptically and transferred in stomacher bags containing 80 ml of saline peptone water and then blended with a Stomacher 400 (Seward Medical, London, UK) at normal speed for 2 min at room temperature. *L. piscium*, either alone or in co-inoculation, was selectively enumerated on spread plates of Elliker agar incubated at 8 °C for 96 h under anaerobiosis (Fall et al., 2010b). *B. thermosphacta* was enumerated (20 °C, 48 h) on Streptomycin Sulphate Thallous Acetate Agar with selective supplement (Oxoid, Hampshire, UK). TVC was estimated in the control once a week, by pour plating in Plate Count Agar (Biokar) before incubation at 26 °C for 48 h.

2.5. PCR-TTGE analysis

The temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) technique, a culture-independent method, was used to track the evolution of bacteria on days 1, 7, 14 and 17. For each batch, 10 ml of each triplicate of the mother solutions from microbial analysis was pooled. Bacterial DNA extraction, PCR amplification of the variable V3 region of 16S rRNA gene with v3P2 and v3P3-GC-clamp primers and TTGE analysis were performed as described by Jaffrès et al. (2009) in duplicate. 16S rRNA V3 amplicons from a mix of 10 species currently found in shrimp and including *B. thermosphacta* CD340 was used as a marker for bacterial presumptive identification and *L. piscium* CNCM I-4031 was run alone for control.

2.6. Sensory evaluation

Twelve panellists belonging to an internal Ifremer panel with long-term training and experience in seafood evaluation were asked to characterise the influence of each strain on cooked peeled shrimp

odours. They had to identify the level of spoilage of the sample by using a four-class scheme (class I: non spoiled, class II: lightly spoiled, class III: moderately spoiled, class IV: strongly spoiled) and then carry out conventional profiling (ISO, 2003) as described by Matamoros et al. (2009a). Odour descriptors were rice/crustacean, butter/caramel, pyrrolidin/sperm, floorcloth, sour/fermented, amine, cheese/foot and cabbage/H₂S. The shrimp of each package were distributed in four small plastic drums covered with aluminium foil (3 shrimp per drum) and stored at 4 °C to keep the odour intact. Shrimp were removed from storage at 4 °C 15 min before the test and left at room temperature. The samples were coded and served in random order to the panellists. A quality coefficient (QC) taking into account the level of spoilage with an arbitrary weighting factor attributed to each class was calculated as follows: $QC = [(1 \times \% \text{ of answers in class I}) + (2 \times \% \text{ of answers in class II}) + (3 \times \% \text{ of answers in class III}) + (4 \times \% \text{ of answers in class IV})] / 100$. QC varied from 1 (nonspoiled product, 100% of the panellists having judged the product as nonspoiled) to 4 (strongly spoiled product, 100% of the panellists having scored the product in class IV). The profile data were treated by variance analysis with two factors (product and judge effects). Multivariate data processing in the form of principal component analysis (PCA) was performed on the mean sample sensory scores with Uniwin 6.1 software (Sigma Plus, Paris, France). This PCA was based on the correlation matrix, in order to give the same importance to all the attributes whatever the range of the scale used. On day 31, four panellists, who had been informed of the experiments, ate 3 shrimp inoculated by *L. piscium* and compared them to the control (taste and texture).

2.7. Biochemical analysis

Prior to inoculation, shrimp characteristics (pH, salt content, proteins, lipids and water content) were determined as described by Fall et al. (2010b). TMA-O, TMA and TVBN were measured in duplicate in the replicates, using the method described by Conway and Byrne (1933) on a 100 g portion of shrimp. Lactic and acetic acids were analysed with the enzymatic UV 340 nm test kit 021 (Biosentec, Toulouse, France), by using an extraction method proposed by Fall et al. (2010b). Sugar content was measured by a modified (water extraction instead of TCA extraction) colorimetric method of Dubois et al. (1956). Biogenic amine and volatile compounds were analysed in triplicate on days 1 and 14. A fraction of 1.5 ml of the five-fold dilution used for microbial analyses was kept at -80 °C and used for biogenic amine quantification. Putrecine, cadaverine, histamine, tyramine, spermine and spermidine were analysed by high pressure liquid chromatography (HPLC) using a Kromasil reversed phase column C18 (5 µm, 25 cm × 4.6 mm) fitted with a Brownlee C18 precolumn (5 µm, 3 cm × 4.6 mm) according to Duflos et al. (1999). Free amino acids content was determined in all batches at day 1 and day 14 by using the amino acid analyser Biochrom 30 (Biochrom, Cambridge, United Kingdom) at LAREAL Food Research Laboratory, Vannes, France.

Analysis of volatile compounds was performed using a solid phase micro extraction coupled with a gas chromatograph interfaced with a mass spectrometer (SPME/GC-MS). For each batch, a 20 g portion of shrimp was individually introduced into a stomacher bag and 50 ml of NaCl saturated water (300 g/l) added. Samples were blended with a stomacher Lab-blender 400 Seward (Norfolk, USA) and 25 ml of the resulting aqueous phase was transferred into tubes and centrifuged at 10000 g, 10 min, 4 °C. Eleven millilitres of the supernatant was transferred to 20 ml vials to which 10 µl of 3-methyl-3-buten-1-ol (internal standard) was added. All the vials were sealed and then placed in the sample tray of the Combi Pal AOC-5000 auto injector system at 4 °C. The samples were heated to 50 °C and mixed at 500 rpm for 10 min to adsorb volatile compounds in the headspace of the vials. SPME fibre, 75 µm Carbonex/Polydimethylsiloxane (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was inserted into the septum of the vials and exposed for 40 min for

volatile sorption. The fibre was then introduced through the injector port of the chromatograph for 10 s at 250 °C to desorb volatile compounds. The GC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SLB-5 ms fused silica capillary column (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness) from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) was coupled to a Shimadzu MS detector QP2010 Plus. The injection port was kept at 250 °C in splitless mode. The flow rate of the carrier gas (helium) was 1.78 ml/min; the temperature of the column was maintained at 35 °C, 5 min and then progressively increased from 35 to 100 °C, first in the flow at 10 °C min⁻¹, and then from 100 °C to 280 °C at 20 °C min⁻¹ and maintained for 5 min. The MS detector was operated in electron ionisation mode (70 eV) and the ion source temperature was maintained at 200 °C. A continuous scan mode was used with a mass range from 33 to 200 m/z. Volatile compounds were identified by matching their mass spectra to those contained in the NIST 2008 mass spectral database (developed for Shimadzu by NIST). Analysis of variance (ANOVA) with the LSD multiple range test, was performed with Statgraphics Plus Centurion XVI.I software (Sigma Plus) on the means of volatile compounds and free amino acids. The significant level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Shrimp characteristics

The shrimp studied contained $73.0 \pm 0.5\%$ of water, $22.1 \pm 0.0\%$ of proteins, $0.52 \pm 0.04\%$ of carbohydrates, $0.5 \pm 0.0\%$ of lipid and $1.24 \pm 0.02\%$ of NaCl.

3.2. Microbial growth in shrimp

In the uninoculated batches, no colony was detected by plate count agar (threshold 5 CFU/g) throughout the experiment, confirming that the ionisation dose is sufficient to ensure the bacterial stability of the product. Fig. 1 shows the growth kinetics of *L. piscium* and *B. thermosphacta* in pure and mixed cultures. The growths of *L. piscium* alone or in presence of *B. thermosphacta* were similar. Within the first 4 days of the challenge test at 8 °C, *L. piscium* numbers increased by 2.0 ± 0.1 log CFU/g cycles to reach a maximum of 9.1 ± 0.1 log CFU/g and remained constant till the end of the experiment. *B. thermosphacta* increased from an initial level of 3.7 ± 0.8 log CFU/g up to 8.7 ± 0.1 log CFU/g in 10 days and over. When inoculated with *L. piscium*, *B. thermosphacta* reached its maximum number of 5.5 ± 0.2 log CFU/g in 7 days. Then the growth was stopped and the count remained constant until 31 days storage, corresponding to a 3.2 ± 0.1 log CFU/g reduction when compared to *B. thermosphacta* alone.

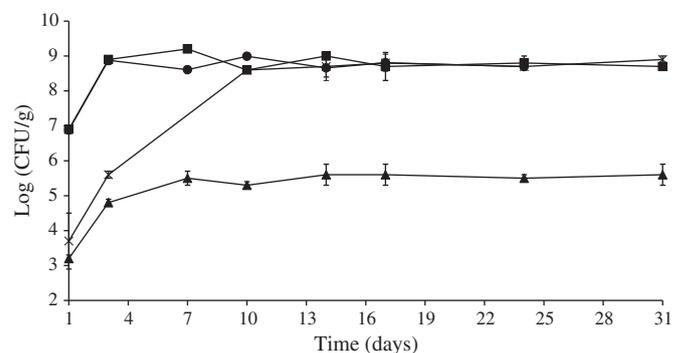


Fig. 1. Growth of *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 and *Brochothrix thermosphacta* CD340 in peeled and cooked shrimp packed under modified atmosphere and stored at 8 °C. (■) *L. piscium* alone; (●) *L. piscium* in co-inoculation; (×) *B. thermosphacta* alone; (▲) *B. thermosphacta* in co-inoculation. Values are averages of three analyses ± standard deviation.

3.3. TTGE analysis

TTGE fingerprints of the V3 region of 16S rRNA gene analysis were assessed in the bacterial ecosystem monitored in order to compare the results from this technique to those from microbial counts. According to unpublished results obtained in our laboratory, the detection limit of the TTGE technique for a pure culture of bacteria is 4 log CFU/ml. The results obtained on days 1, 7 and 14 are presented in Fig. 2 (results at day 17 are similar to day 14). In the control no band was recorded at any analysis point, confirming the sterility of the matrix, whereas a highly intense band fitting to the migration position of *L. piscium* was observed on days 0, 7 and 14 in the batch inoculated with the protective culture alone, corresponding to *L. piscium* counts of approximately 7, 9 and 9 log CFU/g respectively. For *B. thermosphacta* alone on day 1 (3.7 log CFU/g), no band was detected whereas on days 7 and 14, when counts reached approximately 7 and 9 log CFU/g respectively, a migration band assigned to *B. thermosphacta* was detected. In coculture, the band corresponding to *L. piscium* was always present, whereas no band was detected for *B. thermosphacta*, whose number ranged between 3 and 5 log CFU/g throughout storage.

3.4. Sensory evaluation

In plane 1–2 of the PCA performed with the sensory characteristics of the samples (Fig. 3), the first axis (75% inertia) discriminated fresh samples with rice and crustacean odours (left part of PCA) from spoiled samples with amine, cheese/foot, sour/fermented, pyrrolidin and butter/caramel odours (right part). The second axis (11% inertia) opposed samples with milky notes (upper part) with H₂S/cabbage and floorcloth off-odours (lower part). The evolution of QC is shown in Fig. 4. During the first 4 days of the experiment, the QC of all batches was below 2, as with the control, and no off-odour was detected (samples in the left part of the PCA). On day 7 the batch inoculated with *B. thermosphacta* was characterised by a slightly cheese/foot and pyrrolidin/sperm odour with a quality index of 2.6 ± 0.7 . After 10 days, most of the panellists judged the sample as spoiled or strongly spoiled and QC varied from 2.9 ± 0.8 to 3.4 ± 0.4 throughout storage. Sensory rejection (day 10) occurred when the cell number of *B. thermosphacta* reached 8–9 log CFU/g. The samples were clustered in the right part of PCA and mainly characterised by butter/caramel and sour/fermented off-odours. On the contrary, when *B. thermosphacta* was co-inoculated with *L. piscium*, the QC of the product was below 2 for 38 days and the samples were clearly clustered in the left part of the PCA, with rice/crustacean odour typical of fresh shrimp. *L. piscium* alone did not spoil the product, except on day 38 when very slight floorcloth odours were detected. The samples were in the same cluster as *L. piscium* with *B. thermosphacta* (Fig. 3) and the QC was always lower than 2. At the end of the experiments, four judges ate

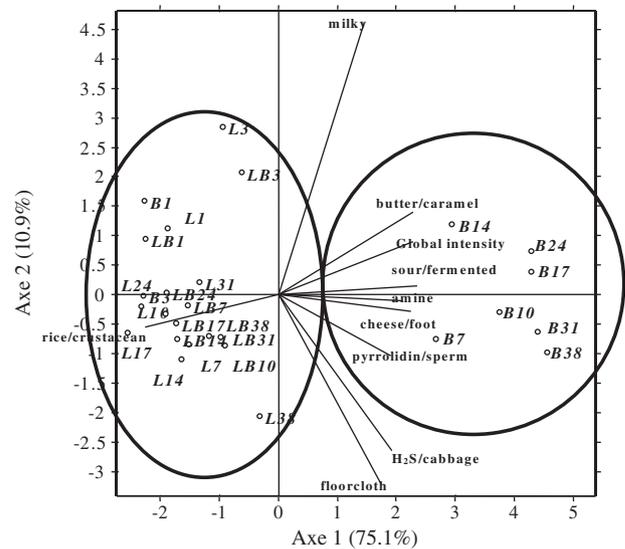


Fig. 3. Representation of the evolution of odours of cooked peeled shrimp samples stored at 8 °C on planes 1–2 of principal component analysis. Lx: *L. piscium* CNCM I-4031 at day x; Bx: *B. thermosphacta* at day x; LBx, co-inoculated with *L. piscium* and *B. thermosphacta* at day x.

the products inoculated by *L. piscium* and did not perceive any off-flavour or acid notes.

3.5. Volatile compounds analysis

The initial TVBN concentration in the control was 10.8 ± 0.2 mg-N/100 g. A slight increase up to 13.7 ± 0.7 mg-N/100 g was observed after 14 days but TVBN concentration decreased on day 24 (1.9 ± 0.1 mg-N/100 g). The same concentration patterns were observed for samples inoculated with *L. piscium* and *B. thermosphacta* alone or in mixed culture. The initial TMAO concentration in shrimp was 2.5 ± 0.1 mg-N/100 g. In the control no TMA was measured throughout the experiment. *B. thermosphacta* produced a slight amount of TMA (4.2 ± 0.1 mg-N/100 g) over 14 days. *L. piscium* alone did not produce TMA alone or in co-culture with *B. thermosphacta* (Table 1).

About 72 volatile compounds were detected by SPME/GC–MS and identified in all batches. The compounds present in the air and saline diluent and those that were not present in triplicate in studied batches were eliminated and finally, 23 molecules of interest including ketones, alcohols, aldehydes and hydrocarbons were taken into consideration to compare the batches (Table 2). In the control, the concentration of certain compounds increased or decreased from day 1 to 14 and new molecules of autolytic origin were also detected. On day 14,

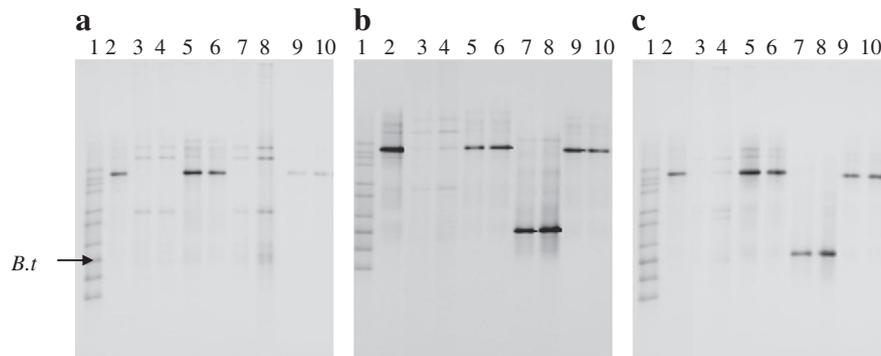


Fig. 2. TTGE fingerprints of the amplified V3 region of 16S rRNA gene of total bacterial DNA extracted from cooked peeled shrimp at different times during storage at 8 °C: (a) day 1, (b) day 7 and (c) day 14. Lane 1: marker profile (the arrow indicates *B. thermosphacta* band); lane 2: *L. piscium* marker; lanes 3–4: sterility control; lanes 5–6: *L. piscium* batch; lanes 7–8: *B. thermosphacta* batch; lanes 9–10: mixed culture.

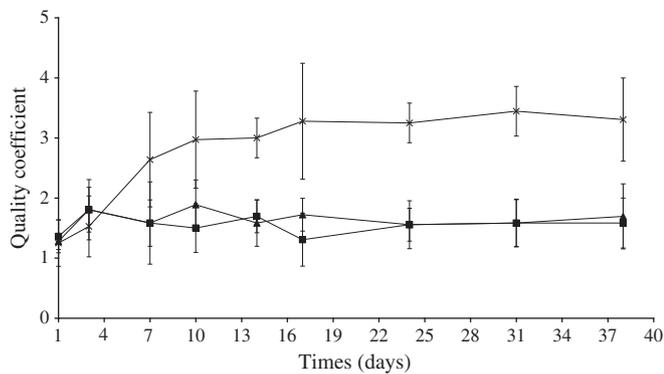


Fig. 4. Quality coefficient of inoculated cooked peeled MAP shrimp stored at 8 °C. (■) scores of batches inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 alone; (x) *B. thermosphacta* CD340 alone; (▲) *L. piscium* and *B. thermosphacta*. Values are averages of 36 analyses \pm standard deviation. Scores higher than 3 are judged as unacceptable.

B. thermosphacta produced 6 new compounds: 2,3 butanedione, 2-pentanone, 3-hydroxy-2-butanone, 2-pentanol, 3-methyl-1-butanol and 4-methyl-3-chloro-2-pentanol. A significant increase of ethanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol and hydrocarbon benzene as well as the total disappearance of 3-methyl-2-pentanone and 1-butanol were also noticed. *L. piscium* produced the same molecule, except 4-methyl-3-chloro-2-pentanol, and did not consume 1-butanol. The batch with mixed culture was mainly characterised by a production of heptanal and the absence of 2-pentanol, cyclopentanol, 3-methyl-1-pentanol and 2-methyl-1-butanol. Statistical tests showed that 2,3 butanedione, 3-methyl-1-butanol, 4-methyl-3-chloro-2-pentanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol and hydrocarbons benzene were significantly ($P \leq 0.05$) more concentrated in the batch with *B. thermosphacta*, characterised by strong off-odours, than in unspoiled batches with *L. piscium* alone or mixed with *B. thermosphacta*.

3.6. Biogenic amines

In the control after 14 days storage, neither histamine nor spermine was detected whilst tyramine, putrescine, cadaverine and spermidine were at very low levels (1.8 ± 0.1 mg/kg, 1.8 ± 0.2 mg/kg, 4.2 ± 0.3 mg/kg and 2.8 ± 0.2 mg/kg respectively). No biogenic amine production was observed in the batches inoculated by *L. piscium* and *B. thermosphacta* alone and in combination (data not shown).

3.7. Glucose, lactic acid and free amino acid determination

The analysis of substrates or metabolites such as free amino acids, glucose and lactic acid was performed in order to determine their possible involvement in the antagonistic mechanism of the protective *L. piscium* strain.

Free amino acids profile of tropical cooked peeled shrimp on day 1 (Table 3) showed a high level content of proline (3178 ± 252 mg/kg), arginine (3149 ± 132 mg/kg) and glycine (2575 ± 64 mg/kg) respectively. On the other hand, aspartic acid, ornithine, threonine, isoleucine

and phenylalanine were found in weak concentration (lower than 90 mg/kg). Cysteine, methionine and tryptophan were not detected. After 14 days of storage, a statistically significant difference in isoleucine concentration, in term of consumption, was established between batch inoculated with *B. thermosphacta* and non-inoculated batch (Table 3).

Mean carbohydrate concentration in *Penaeus vannamei* shrimp, probably corresponding to glucose, as demonstrated by Fall et al. (2010a), was $0.52 \pm 0.04\%$. *L. piscium* consumed sugar very quickly, with concentration dropping to 0.36 ± 0.00 and $0.16 \pm 0.03\%$ in 1 and 3 days respectively and then remaining at this level until 31 days. The same values (no significant difference) were observed in co-culture. *B. thermosphacta* alone also consumed glucose, total consumption being observed on day 7 ($0.13 \pm 0.02\%$). pH and L-lactate production are shown in Fig. 5. No acetic acid was detected in the samples. Shrimp is naturally rich in lactate (1680 ± 60 mg/kg). Both *L. piscium* and *B. thermosphacta* produced L-lactate. The maximum concentration observed was 3530 ± 130 mg/kg, corresponding to an increase of 1850 mg/kg, after 3 and 10 days respectively for *L. piscium* and *B. thermosphacta*, although a fall on day 7 for *B. thermosphacta* was observed. In co-inoculated batches, lactate concentration reached 5510 ± 180 mg/kg on day 7, representing a production of 3830 ± 225 mg/kg, which is far higher than the addition of *L. piscium* and *B. thermosphacta* production. Thereafter the concentration in the co-inoculation batch was the same as with *L. piscium* alone. The mean pH value of the sterile shrimp was constant (6.56 ± 0.02) throughout the experiment. A rapid drop in pH to 6.05 ± 0.11 in 3 days was observed in batches inoculated with *L. piscium* alone or in co-culture. A similar variation was also noticed after day 10 with *B. thermosphacta* (Fig. 5).

In order to assess the effect of lactate produced by *L. piscium* on the inhibition of *B. thermosphacta*, the growth of the latter was monitored in the presence of the maximum lactate concentration produced by the protective strain (1850 mg/kg) and compared to growth without the addition of lactate. No significant difference was observed for the growth of *B. thermosphacta* under these two conditions (data not shown).

4. Discussion

In this study, the growth of *L. piscium* CNCM I-4031 and the spoilage microorganism *B. thermosphacta* in cooked peeled shrimp at 8 °C as well as the effect of their metabolites on sensory quality was evaluated. This temperature was chosen because it feigns the temperature usually observed in consumer's fridge. Moreover, the protocol of shelf-life validation for cooked/peeled shrimp stored under MAP, in the French good manufacturing and hygienic practise guide, always includes a period at 8 °C. The rapid growth of *L. piscium* and *B. thermosphacta* corroborates the fact that these two bacteria are psychrotrophic and can catabolise shrimp meat substrates for their growth.

Adaptation of *B. thermosphacta* in such matrixes has been already demonstrated by Laursen et al. (2006), as an increase from less than 1 log CFU/g to 4.5 log CFU/g after 10 days at 5 °C was observed in Nordic cooked shrimp. Mejhlholm et al. (2005) also proved that *B. thermosphacta*

Table 1

Concentration of total volatile basic nitrogen (TVBN) and trimethylamine (TMA) (mg-N/100 g) in cooked peeled shrimp stored at 8 °C. Values are averages of three analyses \pm standard deviation.

Days	TVBN					TMA				
	1	7	14	24	31	1	7	14	24	31
Control	10.8 ± 0.2	10.5 ± 1.3	13.7 ± 0.7	1.9 ± 0.1	nd	nd	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	nd
<i>L. piscium</i>	9.1 ± 0.7	9.8 ± 1.5	9.5 ± 0.2	3 ± 0.0	1.8 ± 0.1	nd	0.98 ± 0.8	1.8 ± 0.5	0 ± 0.0	0.6 ± 0.0
<i>Bt</i>	6.6 ± 0.5	9.7 ± 0.5	14.1 ± 1.3	2.7 ± 0.4	1.4 ± 0.5	nd	1.7 ± 0.4	4.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	1.2 ± 0.1
<i>L. piscium</i> + <i>Bt</i>	10.5 ± 0.4	8.7 ± 0.1	11.9 ± 2.7	1.6 ± 0.3	3.9 ± 0.3	nd	0 ± 0.0	1.8 ± 0.5	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0

nd not determined.

Table 2
Volatile compounds identified in tropical cooked peeled shrimp inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 and *B. thermosphacta* CD340 in pure and mixed culture and stored under modified atmosphere at 8 °C after 1 day and 14 day.

Volatile compound	Retention time	Day 1		Day 14		
		Control	Control	<i>L. piscium</i>	<i>Bt</i>	<i>L. piscium + Bt</i>
<i>Ketones</i>						
2,3-Butanedione	5.07	nd	nd ^{b,c,d}	6.2 ± 0.0 ^{a,c,d}	6.7 ± 0.0 ^{a,b,d}	6.4 ± 0.0 ^{a,b,c}
2-Pentanone	5.15	nd	nd ^{b,c,d}	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.3	6.1 ± 0.2
3-Hydroxy-2-butanone	7.75	nd	nd ^{b,c,d}	6.6 ± 0.6	6.8 ± 0.7	6.2 ± 0.2
3-Methyl-2-pentanone	5.21	6 ± 0.0	5.7 ± 0.0 ^{b,c,d}	nd ^a	nd ^a	nd ^a
<i>Alcohols</i>						
Ethanol	3.84	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1 ^{c,d}	6.8 ± 0.1	7.2 ± 0.1 ^{a,b}	7.3 ± 0.1 ^{a,b}
2-Pentanol	4.13	5.7 ± 0.0	nd ^{b,c,d}	5.5 ± 0.0 ^{a,d}	5.5 ± 0.00 ^{a,d}	nd ^{b,c}
1-Butanol	6.72	5.6 ± 0.2	5.1 ± 0.9 ^{c,d}	5.4 ± 0.1 ^{c,d}	nd	6.4 ± 0.1 ^{a,b,c}
1-Penten-3-ol	7.16	5.1 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.3 ± 0.2 ^{a,c}	5.8 ± 0.01 ^{b,d}	5.6 ± 0.4 ^{a,c}
Cyclopentanol	7.51	nd	5.8 ± 0.2 ^{b,d}	5.4 ± 0.1 ^{a,c,d}	6 ± 0.2 ^{b,d}	nd ^{b,c}
4-Pentenol	10.3	6.1 ± 0.0	5.8 ± 0.3	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.0	6.1 ± 0.1
3-Methyl-1-butanol	8.53	nd	nd ^{b,c,d}	6.7 ± 0.0 ^{a,c,d}	7.2 ± 0.0 ^{a,b,d}	nd ^{b,c}
4-Methyl-3-cholro 2-pentanol	10.03	nd	nd ^{b,c,d}	nd ^c	5.3 ± 0.3 ^{a,b,d}	nd ^c
<i>Aldehydes</i>						
3-Methyl-1-butanal	6.44	nd	5.8 ± 0.0 ^c	6.5 ± 0.7 ^c	7 ± 0.0 ^{a,b,d}	6 ± 0.2 ^c
2-Methyl-1-butanal	6.66	nd	5.6 ± 0.0 ^{b,c,d}	6.3 ± 0.0 ^{a,c,d}	6.7 ± 0.0 ^{a,b,d}	nd ^{a,b,c}
Heptanal	7.52	nd	nd ^{b,c,d}	nd ^d	nd ^d	5.9 ± 0.3 ^{a,b,c}
Pentanal	7.59	5 ± 0.0	5.1 ± 0.0	5.3 ± 0.2	5.1 ± 0.0	4.9 ± 0.0
<i>Hydrocarbons</i>						
Benzene	6.54	6.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2 ^{b,c,d}	6.1 ± 0.8 ^{a,c}	6.5 ± 0.8 ^{a,b,d}	6.2 ± 1.2 ^{a,c}
3,3-Dimethyl-hexane	9.04	6.1 ± 0.1	6.7 ± 0.1	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.2
4-Methyl-heptane	9.13	nd	5.8 ± 0.2	5.7 ± 0.1	6 ± 0.1	5.9 ± 0.1
2,3,4-Trimethyl-pentane	8.86	5.8 ± 0.1	6.3 ± 0.1	6.5 ± 0.7	6.5 ± 0.1	6.5 ± 0.0
3,3-Dimethyl-octane	12.55	nd	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5 ± 0.0	4.9 ± 0.2
2,2,5-Trimethyl-hexane	9.71	nd	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.0	4.9 ± 0.1
2,2,4 Trimethyl heptane	12.14	nd	5 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.0	5.5 ± 0.1

Values are averages ± standard deviation of log (peak area/g). n = 3.

nd: not detected.

^aIndicates statistically significant difference of mean compared to control at day 14.

^bIndicates statistically significant difference of mean compared to *L. piscium* at day 14.

^cIndicates statistically significant difference of mean compared to *B. thermosphacta* at day 14.

^dIndicates statistically significant difference of mean compared to mixed culture at day 14.

can reach 8 log CFU/g in cooked peeled Nordic shrimp stored at 2, 5 and 8 °C. As shown previously by Fall et al. (2010b), *L. piscium* confirmed its adaptation on shrimp and its colonisation during the storage was also

demonstrated using the TTGE technique. TTGE or DDGE was useful for monitoring protective flora, as shown by Vasilopoulos et al. (2010) in cooked ham stored under MAP. TTGE also permitted the detection of

Table 3
Free amino acids content (mg/kg) in all batches of tropical cooked peeled shrimp stored at 8 °C after 1 day and 14 days. Values are averages of three analysis ± standard deviation.

Amino acid	Day 1		Day 14		
	Control	Control	<i>L. piscium</i>	<i>Bt</i>	<i>L. piscium + Bt</i>
Taurine	189.7 ± 0.6	186.7 ± 1.5 ^c	189.3 ± 2.1 ^c	194.7 ± 5.7 ^{a,b,d}	187 ± 4.3 ^c
Aspartic acid	19.3 ± 1.1	19.3 ± 0.6 ^c	20.3 ± 1.5 ^c	25.3 ± 1.5 ^{a,b,d}	19.7 ± 1.5 ^c
Threonine	83.7 ± 7.2	70.7 ± 23 ^d	82.3 ± 5 ^d	89 ± 9.2 ^d	94.7 ± 1.5 ^{a,b,c}
Serine	101.7 ± 5.7	98.7 ± 7.6 ^d	101.7 ± 3.1 ^d	93 ± 5.3 ^d	104.7 ± 0.6 ^{a,b,c}
Asparagine	175.7 ± 6.6	170 ± 13.1	168 ± 9	158 ± 7	173.3 ± 6.4
Glutamic acid	290.7 ± 16.6	288.7 ± 7.1 ^{b,c,d}	314 ± 14.1 ^{a,c,d}	341.7 ± 13.6 ^{a,b,d}	335.7 ± 9.1 ^{a,b,c}
Glutamine	627.3 ± 15.5	581.7 ± 57	527 ± 43.7	566.4 ± 30.6	541.3 ± 23.8
Proline	3178 ± 252.7	3147.3 ± 88.5 ^c	3294 ± 144 ^c	3431 ± 129.5 ^{a,b,d}	3351.7 ± 53.1 ^c
Glycine	2575 ± 64.5	2461.3 ± 56.3 ^{c,d}	2501 ± 17.1 ^{c,d}	2583 ± 21.3 ^{a,b,d}	2552.3 ± 47.7 ^{a,b,c}
Alanine	860 ± 39	843.7 ± 22.3 ^c	814 ± 26.2 ^c	888.3 ± 61.5 ^{a,b,d}	844.33 ± 24.5 ^c
Valine	148.3 ± 8.5	144 ± 11.1	141 ± 8.5	147 ± 6.2	143.7 ± 2.5
Isoleucine	81.7 ± 5.1	80.3 ± 4.9 ^c	74.3 ± 6 ^c	69 ± 4.3 ^{a,b,d}	73.7 ± 0.6 ^c
Leucine	158 ± 7.9	150.3 ± 5.7	148 ± 8.5	144.3 ± 7.6	150.7 ± 1.1
Tyrosine	134.3 ± 9.4	130.6 ± 11.6	125.7 ± 9.7	136 ± 9.2	131.3 ± 6.5
Phenylalanine	87.3 ± 5.5	87 ± 6	83.3 ± 3.8	86 ± 3.6	83.7 ± 2.1
Histidine	132.7 ± 10.5	130 ± 12.1 ^c	129.7 ± 5.1 ^c	149.3 ± 1.1 ^{a,b,d}	168 ± 6 ^c
Ornithine	29.7 ± 2.1	30.7 ± 2.1	29.7 ± 3.8	32.3 ± 3.2	33 ± 1
Lysine	290.7 ± 16.8	272.7 ± 33.1	253 ± 14.8	279.7 ± 21	271.7 ± 23
Arginine	3149.3 ± 132.5	3042 ± 65.5 ^{b,c,d}	3240.3 ± 82 ^a	3259.4 ± 139.6 ^a	3283.3 ± 98 ^a

^aIndicates statistically significant difference of mean compared to control at day 14.

^bIndicates statistically significant difference of mean compared to *L. piscium* at day 14.

^cIndicates statistically significant difference of mean compared to *B. thermosphacta* at day 14.

^dIndicates statistically significant difference of mean compared to mixed culture at day 14.

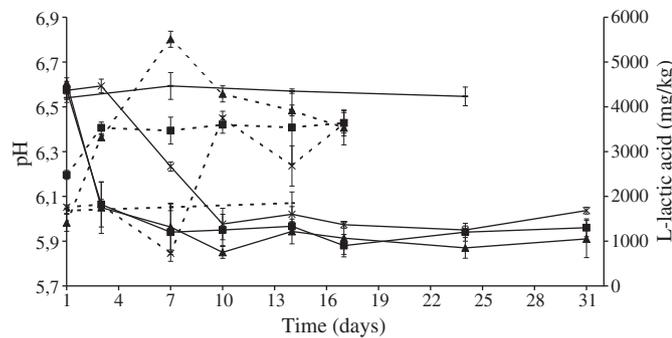


Fig. 5. L-lactic acid (dotted line) and pH (solid line) evolution in peeled and cooked shrimp packed under modified atmosphere and stored at 8 °C. (—) Non inoculated; (■) inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 alone; (x) *B. thermosphacta* CD340 alone; (▲) co-inoculated with *L. piscium* and *B. thermosphacta*. Values are averages of three analyses \pm standard deviation.

B. thermosphacta on day 7 before rejection of the samples by the sensory panel, and thus could be used as an alternative detection method for spoiling microbial indicators. In co-culture, species representing less than 1% of the total community are not visible in TTGE profiles (Muyzer et al., 1993; Ogier et al., 2002). Although not quantitative, the results obtained in co-culture (absence of *B. thermosphacta* and presence of *L. piscium* fingerprints) demonstrated the efficiency of this technique by revealing the inhibition of one bacterial population by another.

When growing, the metabolic activity of *B. thermosphacta* spoiled the product with the emission of off-odours. TMA resulting from the bacterial reduction of TMAO under anaerobic condition and TVBN are often used as spoilage indicators for fish and seafood products. The production of these compounds by *B. thermosphacta* was not significant in shrimp, as it has already been shown in cold-smoked salmon by Stohr et al. (2001). These compounds were found to be poor quality indices for naturally contaminated cooked shrimp (Dalgaard and Jorgensen, 2000; Mejlholm et al., 2005) and for raw peeled royal shrimp *Penaeus kerathurus* (Sadok et al., 2004). The low initial level of TMAO in topical shrimp may explain the weak production of TMA observed in this study, both by the Conway and SPME-GC-MS. Contrary to what has been determined for other seafood products (Jorgensen et al., 2000; Veciana-Nogues et al., 1997), biogenic amines could not be retained as spoilage indicators since they were not produced by *B. thermosphacta* at the time of rejection. The same observations were made by Mejlholm et al. (2005).

The strong butter/caramel off-odour detected in our study has also been attributed to *B. thermosphacta* by Laursen et al. (2006) and Mejlholm et al. (2005) after ten days storage at 5 °C in cooked, peeled Nordic shrimp. This off-odour is usually correlated to diacetyl production (2,3-butanedione) whose production was significantly higher in the batch inoculated with *B. thermosphacta* than in the batches in which *L. piscium* was present and which were not rejected by the panel. For Laursen et al. (2006), in addition to diacetyl, other volatile compounds like 3-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol may explain the formation of off-odours by *B. thermosphacta*. In our study, these two compounds were also over-produced in batches inoculated by *B. thermosphacta*. 2,3-butanedione and 3-methyl-1-butanol stem from the pyruvate metabolism, whereas for *Carnobacterium* spp. and *E. coli* (Connor et al., 2010; Larroure-Thiveyrat and Montel, 2003) 3-methyl-1 butanol is known to stem from leucine metabolism, one of the main amino acids measured in shrimp (Fall et al., 2010a). It is however notable to observe that these 3 volatile compounds, although in lesser quantity, were also produced in the batches inoculated by *L. piscium* without the detection of any off-odours. Concentration of these molecules was not measured and the relation with the sensory perception remains unknown. These metabolites were probably under the olfactory threshold in the case of *L. piscium* and thus not detected by the sensory panel. It is likely that

4-methyl-3-chloro-2-pentanol, which is only produced by *B. thermosphacta*, and the production of ethanol, 1-penten-3-ol, cyclopentanol, 2-methyl-1-butanol and hydrocarbons benzene that are significantly greater in *B. thermosphacta* compared to other batches on day 14, could participate in the off-odours of the products. All these compounds, except for cyclopentanol and 4-methyl-3-chloro-2-pentanol, were identified previously by Laursen et al. (2006) and Vasilopoulos et al. (2010) in cooked peeled MAP shrimp and cooked ham inoculated with *B. thermosphacta*. The production of 2-heptanone and 2-hexanone by *B. thermosphacta* in cold-smoked salmon, leading to blue cheese off-odour (Joffraud et al., 2001) has not been shown in shrimp.

The production of diacetyl has been associated with the aerobic metabolism of *B. thermosphacta* (Dainty et al., 1979; Laursen et al., 2006; Leroy et al., 2009; Pin et al., 2002). In our study after the first day of incubation at 8 °C, the concentration of CO₂ decreased to 25% due to absorption in the shrimp flesh (the relation between CO₂ in the packaging gas and in the headspace at equilibrium at 8 °C predicts 35% with a 2/1 gas/fish ratio and 25% with 1/1). This phenomenon was followed by an alternate increase and decrease that has already been observed by Mejlholm et al. (2005) and could be linked to the fermentative metabolism of the strains and permeability of the packaging film. Some authors suggested that higher CO₂ concentration in MAP could reduce the spoilage potential of *B. thermosphacta* in cooked peeled shrimp (Laursen et al., 2006), however, higher concentrations lead to acidic taste. Our study showed that at 8 °C an atmosphere of 50% CO₂-50% N₂ without O₂ was not efficient enough to limit the production of butter-like off-odours. However it has been shown for other bacteria such as *Listeria monocytogenes* that at lower temperature (2 °C), the solubility of CO₂ combined to the effect of the temperature was more efficient to reduce its growth in cooked MAP shrimp (Mejlholm et al., 2005). Additional hurdles such as the protective bacteria *L. piscium* CNCM I-4031 delayed the undesirable sensory changes caused by *B. thermosphacta* and led to extending the shelf-life of cooked peeled shrimp. The effectiveness of *L. piscium* as a protective culture was demonstrated in a previous study for 21 days storage (Fall et al., 2010a) and is confirmed here for 31 days storage with no adverse effects on sensory quality of the biopreserved product. In the samples inoculated with *L. piscium*, the volatile compounds detected were similar to those inoculated with *B. thermosphacta*, but with a significantly lower amount for most of them. Diacetyl is an end product of the citric acid metabolism of LAB, including species belonging to the genus *Lactococcus* (Bartowsky, 2009; Jay, 1982) and this property is often used in the food industry for generating buttermilk flavour. In shrimp however, the production of diacetyl by *L. piscium* was not detected by smell or taste. The drop in pH and in lactic acid production by the lactic protective strain was not considered negative by the panel and the absence of TVBN, TMA and biogenic amine production confirmed the neutrality of the protective strain on this product. The absence of histamine and tyramine is also an important positive point for food applications.

B. thermosphacta was inhibited by *L. piscium* by more than 3 log CFU/g. Laursen et al. (2006) failed to demonstrate the efficacy of *Carnobacterium maltaromaticum* cluster L as a protective culture on the sensory quality of cooked peeled MAP shrimp inoculated with *B. thermosphacta*, although positive results had been obtained in a Petri dish. To our knowledge, no extension of shelf-life has been obtained in shrimp by using biopreservation technology. Al Dagal and Bazarra (1999) had little success with *Bifidobacterium breve* on either whole or peeled *Penaeus* sp. at 0 °C. Einarsson and Lauzon (1995) extended the shelf-life of brine *P. borealis* with crude extract of bacteriocins (bavaricin A and nisin Z), but did not test for live bacteria. Most of the promising studies concerning the specific inhibition of *B. thermosphacta* by LAB have been performed on meat products. Castellano et al. (2010), Vasilopoulos et al. (2010) and Vermeiren et al. (2006a,b) have successfully improved the shelf-life of different meat

products with selected *Leuconostoc carnosum* and *Lactobacillus sakei* strains that inhibited *B. thermosphacta* but the application was limited due to acidic flavours in the inoculated products. Despite a glucose concentration close to those of certain cooked meat products, the final pH in shrimp inoculated by the protective *L. piscium* strain remains higher than in meat (5.9 versus 5.2 to 5.8), probably due to the higher initial pH and higher buffering capacity of shrimp meat. The antimicrobial activity mechanism of *L. piscium* against *B. thermosphacta* has not yet been elucidated. Previous works rejected the hypothesis of bacteriocin production (Matamoros et al., 2009a) and pH diminution (Fall et al., 2010a). The current study shows that each strain produces equivalent amounts of lactic acid when their bacterial population is maximal. The same results were observed by Vermeiren et al. (2006a) and Vasilopoulos et al. (2010) when comparing the lactic acid production of protective LAB and *B. thermosphacta* in cooked ham and meat model media. The results of *B. thermosphacta* growth in the presence of lactic acid confirmed that the antagonism of *L. piscium* is not only due to lactic acid production and that nutrient competition may be involved. Indeed, the rapid use of glucose by the *L. piscium* strain in shrimp coincided with the termination of *B. thermosphacta* development. Glucose competition has already been demonstrated in the inhibition of *L. monocytogenes* by a strain of *C. maltaromaticum* (Nilsson et al., 2005). On the other hand, Vermeiren et al. (2006a) claimed that the inhibition between *B. thermosphacta* and *L. sakei* could not be due to glucose consumption since the antagonistic effect was equivalent in model media with both high and low glucose content. Concerning amino acid consumption that was assessed at day 14 when the population level of the two bacteria was stable and the maximal inhibition obtained, the current study shows that, except for isoleucine that is consumed by *B. thermosphacta*, none of the 19 compounds analysed was used by any of the two strains. For *B. thermosphacta* these results are in agreement with those of Laursen et al. (2006) for arginine, ornithine and tyrosine but the consumption of leucine observed in Nordic shrimp stored at 5 °C was not recorded here. However, it is clear that the antagonistic mechanism of *L. piscium* is not linked to a competition for free amino acids. Further studies on nutrient competition for other nutrients such as nucleotides or vitamins are currently in progress in our laboratory, using chemically defined model media. It is not excluded that the quorum sensing phenomenon may also be involved. The inhibition of *B. thermosphacta* may explain the extension of sensory shelf-life of naturally contaminated shrimp observed by Matamoros et al. (2009a). The study of the effect of environmental parameters (MAP, temperature, etc.) influencing the protective effect of *L. piscium* will be also required in order to improve the use of protective cultures in shrimp and other seafood products, in combination with product formulations and processes.

Acknowledgements

The authors are grateful to Frédérique Chevalier for her assistance in experiment preparation.

References

- Al Dagal, M.M., Bazaraa, 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.
- Bartowsky, E.J., 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology* 48, 149–156.
- Castellano, P., González, C., Carduza, F., Vignolo, G., 2010. Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Science* 85, 394–401.
- Connor, M.R., Cann, A.F., Liao, J.C., 2010. 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1155–1164.
- Conway, E.J., Byrne, A., 1933. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. I. The micro-determination of ammonia. *Biochemical Journal* 27, 419–429.
- Dainty, R.H., Shaw, B.G., Charmagne, D., Harding, C., Michanie, S., 1979. The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. In: Russell, A.D., Fuller, R. (Eds.), *Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment*. Academic Press, London, pp. 83–100.
- Dalgaard, P., Jørgensen, 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., Vancanney, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P., Leisner, J.J., 2003. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 °C and 25 °C. *Journal of Applied Microbiology* 94, 80–89.
- Diop, M.B., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Tine, E., Thonart, P., 2009. Use of a nisin-producing starter culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* to improve traditional fish fermentation in Senegal. *Journal of Food Protection* 72, 1930–1934.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Method for determination of sugars and related substances. *Analyse Chemistry* 28, 350–356.
- Duflos, G., Dervin, C., Malle, P., Bouquet, S., 1999. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangius merlangus*). *Journal of AOAC International* 82, 1097–1101.
- Einarsson, H., Lauzon, L., 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 669–676.
- Fall, P.A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F., Pilet, M.F., 2010a. Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Letters in Applied Microbiology* 50, 357–361.
- Fall, P.A., Leroi, F., Chevalier, F., Guérin, C., Pilet, M.F., 2010b. Protective effect of a non-bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 strain against *Listeria monocytogenes* in sterilized tropical cooked peeled shrimp. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 19, 84–92.
- Greer, G.G., Dilts, B.D., 2006. Control of meatborne *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta* by a bacteriocinogenic *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Food Microbiology* 23, 785–790.
- Huis in't Veld, J.H.J., 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33, 1–18.
- ISO, International Organization for Standardization, 2003. *Sensory Analysis-Methodology – General Guidance for Establishing a Sensory Profile*, ISO 13299, Geneva, Switzerland.
- Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prévost, H., Joffraud, J.J., Doussset, X., 2009. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 131, 20–29.
- Jay, J.M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 525–532.
- Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C., Berdagué, 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.
- Jørgensen, L.V., Dalgaard, P., 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.
- Larrouture-Thiveyrat, C., Montel, M.C., 2003. Effects of environmental factors on leucine catabolism by *Carnobacterium piscicola*. *International Journal of Food Microbiology* 81, 177–184.
- Laursen, B.G., Leisner, J.J., Dalgaard, P., 2006. *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3604–3611.
- Leroy, F., Vasilopoulos, C., Van Hemelryck, S., Falony, G., De Vuyst, L., 2009. Volatile analysis of spoiled, artisan-type, modified-atmosphere-packaged cooked ham stored under different temperatures. *Food Microbiology* 26, 94–102.
- Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Chadli, F.K., Cornet, J., Prevost, H., Pilet, M.F., 2009a. Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* 72, 365–374.
- Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prevost, H., Leroi, F., 2009b. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* 26, 638–644.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Metaxopoulos, J., 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4 ± 2 °C. *Food Microbiology* 20, 259–265.
- Mejlholm, O., Boknaes, N., 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.
- Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M.B., Bøknæs, N., Koort, J., Björkroth, J., Dalgaard, P., 2008. Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* 124, 250–259.
- Muyzer, G., Dwea, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.
- Nilsson, L., Hansen, T.B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knochel, S., Gram, L., Gravesen, A., 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* 98, 172–183.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3691–3701.

- Pin, C., Garcia de Fernando, G.D., Ordonez, J.A., 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4441–4447.
- Pridmore, R.D., Pittet, A.C., Praplan, F., Cavadini, C., 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-salmonella activity. *FEMS Microbiology Letters* 283, 210–215.
- Sadok, S., Abdelmoula, A., El Abed, A., 2004. Combined effect of sepia soaking and temperature on the shelf life of peeled shrimp *Penaeus kerathurus*. *Food Chemistry* 88, 115–122.
- Smith, L., Mann, J.E., Harris, K., Miller, M.F., Brashears, M.M., 2005. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and salmonella in ground beef using lactic acid bacteria and the impact on sensory properties. *Journal of Food Protection* 68, 1587–1592.
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., Leroi, F., 2001. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* 34, 797–806.
- Vasilopoulos, C., De Mey, E., Dewulf, L., Paelinck, H., De Smedt, A., Vandendriessche, F., De Vuyst, L., Leroy, F., 2010. Interactions between bacterial isolates from modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham in view of the development of a bioprotective culture. *Food Microbiology* 27, 1086–1094.
- Veciana-Nogues, M.T., Marine Font, A., Vidal-Carou, M.C., 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2036–2041.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2006a. Co-culture experiments demonstrate the usefulness of *Lactobacillus sakei* 10A to prolong the shelf-life of a model cooked ham. *International Journal of Food Microbiology* 108, 68–77.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., Rajtak, U., Debevere, J., 2006b. The sensory acceptability of cooked meat products treated with a protective culture depends on glucose content and buffering capacity: a case study with *Lactobacillus sakei* 10A. *Meat Science* 74, 532–545.

Chapitre II

Impacts des paramètres physico-chimiques sur la croissance des souches de *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 et *Brochothrix thermosphacta* CD340 et modélisation des interactions entre ces souches

2-1 Influence of temperature, pH and NaCl concentration on maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031.

Publication : Leroi, F., Fall, P.A., Pilet, M.F., Chevalier, F., Baron, R., 2011. Food Control soumise.

2-2 Effet de la variation des paramètres physico-chimiques et du taux d'inoculum initial de *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 sur la croissance de *Brochothrix thermosphacta* et sur la qualité organoleptique des crevettes cuits décortiquées.

2-1 Influence of temperature, pH and NaCl concentration on maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031

Publication : Leroi, F., Fall, P. A., Pilet, M.F., Chevalier, F., Baron, R., 2011.
Food Control, soumise.

Introduction

La microbiologie prévisionnelle vise à prévoir le comportement bactérien dans des environnements changeants par le biais d'outils mathématiques. Pour certains produits comme les produits de la mer, propices au développement de bactéries pathogènes et altérantes, posséder un outil qui permet de prédire le comportement de ces dernières est essentiel pour en assurer la sécurité et la qualité. Dans la littérature, beaucoup de modèles prédictifs existent, pour la plupart destinés à l'étude de bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes* (Augustin et Carlier, 2000; Delignette-Muller *et al.*, 2006; Mejlholm *et al.*, 2010) ou *V. parahaemolyticus* (Yang *et al.*, 2009). En revanche, peu de données sont disponibles sur le comportement des bactéries d'altération. Néanmoins pour *B. thermosphacta*, certains auteurs (Baranyi *et al.*(1996); Mc Clure *et al.* (1993); Zhou *et al.* (2009) ont développé des modèles permettant de prédire son comportement en fonction de quelques paramètres environnementaux. *B. thermosphacta*, agent altérant majeur de la viande, a été récemment identifié comme altérant de la crevette cuite décortiquée (Jaffrès *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2006). Dans le chapitre précédent, l'activité antimicrobienne de *L. piscium* sur *B. thermosphacta* a été démontrée sur la crevette décortiquée cuite. Dans le but d'optimiser cet effet, cette présente étude est menée afin de déterminer le comportement de ces deux bactéries en fonction des paramètres physico-chimiques (T°, pH, NaCl). L'approche modulaire du gamma concept (Zwietering *et al.*, 1996-) a été utilisée pour la prédiction de leur comportement. L'effet de chaque facteur a été modélisé en milieu liquide puis le modèle final a été adapté et validé pour la matrice crevette cuite décortiquée. In fine, les résultats obtenus permettront de déterminer si *L. piscium* est mieux adapté à la matrice crevette que *B. thermosphacta*, ce qui lui confèrerait un avantage écologique permettant d'expliquer partiellement les interactions observées. Par ailleurs, la connaissance des combinaisons de paramètres physico-chimiques favorables au développement de *L. piscium* et/ou limitantes pour *B. thermosphacta* pourront servir pour optimiser le procédé de biopréservation.

Les deux souches ont été ensemencées sur milieu Elliker modifié à différentes températures (0 à 35°C), pH (4.6 à 7.4) et taux de NaCl (0 à 80 g/l) avec des incréments de 5°C pour la température, 0,2 pour le pH et 2 g/l pour le sel. Chaque facteur a été étudié séparément en fixant les valeurs des autres paramètres à leur optimum. Les croissances ont été réalisées en microplaques avec un lecteur automatisé de densité optique (BIOSCREEN). Le taux de croissance maximum des bactéries (μ_{\max}) a été déterminé par la technique des dilutions successives et la corrélation du temps de détection avec le logarithme népérien du nombre

initial de cellules inoculées. Pour compléter le modèle et l'adapter à la matrice crevette, des expérimentations ont ensuite été réalisées sur crevettes inoculées avec *L. piscium* ou *B. thermosphacta* en faisant varier le taux de sel, le pH et la température afin de valider ce modèle.

Principaux résultats

Les tests de croissance en milieu Elliker modifié montrent que *B. thermosphacta* est capable de pousser en absence de NaCl et supporte une quantité maximale de NaCl de 62 g/l. Son optimum est estimé à 7 g/l mais cette quantité n'augmente pas de façon très importante le μ_{\max} (0,95 et 0,98 h⁻¹ respectivement pour 0 et 7 g/l de sel). *B. thermosphacta* est psychrotolérant car capable de croître à des températures très basses pouvant atteindre des valeurs négatives (-3,4°C), avec un optimum à 27°C. Au delà de cette limite, le taux de croissance décroît de manière drastique et aucune croissance n'est observée au-delà de 31°C. Son pH optimum est de 7,1 et aucune croissance n'est observée à des pH inférieurs à 4,8. S'agissant de *L. piscium*, la même aptitude à pousser en absence de NaCl est notée avec cependant un optimum à 5 g/l mais qui, comme pour *B. thermosphacta*, n'a que peu d'incidence sur la valeur de μ_{\max} . Le taux de NaCl maximal est évalué à 23 g/l ce qui est trois fois plus faible que celui observée pour *B. thermosphacta*. *L. piscium* présente un caractère psychrotolérant plus marqué que *B. thermosphacta*, avec une température minimale de croissance de -4,8°C, un optimum à 23°C et une température maximale croissance de 27°C. Son pH optimum est proche de la neutralité (7,1) et le pH minimum est à une valeur de 4,8. Malgré des valeurs cardinales assez similaires, *L. piscium* pousse beaucoup moins vite que *B. thermosphacta* sur milieu Elliker (μ_{\max} respectivement 0,62 et 1,08 h⁻¹). Deux expériences en crevettes ont permis de déterminer le taux optimum de croissance (μ_{opt}) dans cette matrice. Il s'avère que pour ce produit, μ_{opt} , qui est donc le taux de croissance sur crevettes obtenu pour les valeurs optimales de température, sel et pH déterminées précédemment, est plus fort pour *B. thermosphacta* que pour *L. piscium* (respectivement 0,64 h⁻¹ et 0,46 h⁻¹). Ces résultats montrent une adaptation un peu meilleure, aux conditions optimales, de *B. thermosphacta* à la crevette cuite par rapport à *L. piscium*. La qualité de prédiction du modèle est estimée par la valeur du facteur biais, qui est de 0,98 et 0,67 pour *B. thermosphacta* et *L. piscium* respectivement. Ces valeurs montrent que le modèle utilisé a tendance à sous-estimer les taux de croissance prédits pour *L. piscium* alors qu'il reste très satisfaisant dans la prédiction de *B. thermosphacta*. La qualité de prédiction observée avec *L. piscium* reste néanmoins acceptable.

Ce travail fait l'objet d'une publication soumise à Food Control.

Influence of temperature, pH and NaCl concentration on maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031

Author: Françoise Leroi^{1*}, Papa Abdoulaye Fall¹, Marie France Pilet^{1,2,3}, Frédérique Chevalier¹, Régis Baron¹

¹ Ifremer, Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, F-44311 Nantes, France

² LUNAM Université, Oniris, UMR 1014 Secalim, Nantes, F-44307, France

³ INRA, Nantes, F-44307, France

Corresponding author: Françoise Leroi, Ifremer, Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, Rue de l'île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France. E-mail: Francoise.leroi@ifremer.fr ; phone: +33240374172 ; fax: +33240374071

ABSTRACT

The maximum specific growth rate (μ_{\max}) of *Brochothrix thermosphacta*, a spoiling bacterium of cooked peeled shrimp, and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, a bioprotective strain, was investigated in different conditions of temperature, NaCl concentrations and pH. The basic modelling approach used was the Gamma concept (γ -concept). Each γ function has been modelled in liquid medium by a function with the three cardinal values X_{\min} , X_{opt} and X_{\max} . Experiments in shrimp were performed for determination of μ_{opt} in this matrix and validation of the model. Cardinal growth parameters were quite similar for the two strains, excepted for NaCl. No salt was required for growth and the minimum NaCl_{\max} was three times higher for *B. thermosphacta* than for *L. piscium* (62 and 23 g l⁻¹ respectively). However, the tolerance to salt is higher in seafood than in liquid broth, possibly due to presence of osmotically active molecules. *L. piscium* and *B. thermosphacta* were psychrotolerant, with $T_{\min} = -4.8$ and -3.4°C , $T_{\text{opt}} = 23.4$ and 27.0°C and $T_{\max} = 27.2$ and 30.8°C respectively. The optimal pH was neutral and growth possible till pH = 4.8 for the two strains. The μ_{\max} of *B. thermosphacta* in shrimp was a little higher than *L. piscium* whatever the environmental conditions and the bioprotective effect of the latter cannot be explained by a better adaptation to the shrimp matrix. Validation of the model showed that γ -concept was suitable for predicting μ_{\max} of *B. thermosphacta* in shrimp. Data generated in this study can be used to adapt the model to other foods with few additional experiments and the effect of different parameters may be added in the future. The bioprotective strain grew well at chilled temperatures in a wide range of pH, assuming possible applications in lightly marinated seafood. Salt effect has to be studied into more details directly in the matrix.

Keywords : interaction, modelling, biopreservation, *Lactococcus piscium*, *Brochothrix thermosphacta*

1. Introduction

Predictive microbiology aims at the quantitative estimation of microbial kinetics in food or liquid medium by using suitable mathematical modelling (Mc Clure et al., 1993). The use of predictive microbiology allows anticipating the behaviour of bacteria in any environmental conditions. Pathogenic and spoiling microorganisms may contaminate food but often at low levels that generally do not impact quality and safety. However, in some storage conditions, those microorganisms may reach critical levels and knowledge of bacterial behaviour with respect to environmental parameters is necessary to optimise the process and estimate the shelf-life. Biopreservation is a preservation principle that consists in fighting against the undesirable organisms by application of bioprotective bacteria. It is an additional hurdle that cannot replace good manufacturing and hygienic practises but helps reducing the level of technological treatments (salt, pH, preservatives etc.) and/or preventing development of undesirable microorganisms at abuse temperatures. Recently, a strain of lactic acid bacteria, *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 isolated from fresh steak salmon, showed a bioprotective effect in tropical cooked peeled shrimp packed under modified atmosphere. The inoculation of *L. piscium* at a level of 10^5 Colony Forming Unit (CFU) g^{-1} significantly increased the shelf-life of this product (Matamoros et al., 2009a) and this was attributed to the inhibition of *Brochothrix thermosphacta* (Fall et al., 2010) recently identified as a major spoiling organisms in cooked peeled shrimp (Laursen et al., 2006; Jaffrès et al., 2011). The mechanism of action is still unknown but is not due to bacteriocin and hydrogen peroxide production nor acidification (Fall et al., in press). The hypothesis that environmental conditions may favour the growth of the bioprotective strain has been pointed out.

B. thermosphacta has been identified as a specific spoilage organism of meat products for years (Gardner, 1981; Dainty et al., 1992) and occurs in air or vacuum packed pork, beef, lamb and cured meat (Kakouri et al., 1994; Sheridan et al., 1997; Nychas et al., 2008; Vasilopoulos et al., 2008; Vasilopoulos et al., 2010; Nieminen et al., 2011; Pennacchia et al., 2011). Some authors have studied the effect of temperature and in a lesser extend pH, salt and modified atmosphere composition on the growth or metabolism of *B. thermosphacta* (Blickstad et al., 1984; Baranyi et al., 1996; Pin et al., 2002; Braun et al., 2004; Cayré et al., 2005; Koutsoumanis et al., 2006). However, the combination of factors and their range of study vary, as well as the methodology and the modelling approach, making difficult the transposition to seafood matrix. *L. piscium* is a recently described species (Williams et al., 1990) for which few data are available on growth parameters.

The present study aimed at estimating the effect of different environmental conditions of temperatures, pH and NaCl concentrations on μ_{\max} of *L. piscium* and *B. thermosphacta* in cooked peeled shrimp. Results will provide information on the adaptation of *L. piscium* and *B. thermosphacta* to this matrix. They will also allow determining the range of environmental conditions for which a bioprotective effect may be expected. The basic modelling approach used was a multiplicative expression of independent functions of each environmental variable, the so-called γ -concept by Zwietering et al. (1996) (equation 1). The γ -concept assumes supposed functions γ , with values generally restricted between 0 and 1, identified in a specific medium (generally liquid medium) and connected by multiplication (non-synergistically). Another parameter, μ_{opt} , takes into account the specificity of the food matrix. In some cases, an extension of the model can be added called interaction module when at least two conditions become more stressing than the product of γ functions. This concept was successfully validated in some foods (Pinon et al., 2004; Leporq et al., 2005; Membré et al., 2005) and used for the development of a software (www.symprevius.net) focused on predicting the response of a range of pathogens to key factors technology. Some spoilage microorganisms are included but not *B. thermosphacta* or bioprotective strains such as *L. piscium*. In this study each γ function has been modelled with a maximum of three parameters that are the cardinal values X_{\min} , X_{opt} and X_{\max} of the Rosso cardinal model (Rosso et al., 1993). Challenge tests in cooked peeled shrimp stored under modified atmosphere were performed to calculate μ_{opt} and estimate the quality of the model.

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot \gamma(T) \cdot \gamma(\text{pH}) \cdot \gamma(\text{NaCl}) \quad (1)$$

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and subcultures conditions

L. piscium CNCM I-4031 (formerly EU2241) and *L. piscium* EU2229 were isolated from salmon steak by (Matamoros et al., 2009b). The strains of *L. piscium* CIP 104371^T, *L. lactis* subsp. *lactis* CIP 102975, *L. raffinolactis* CIP 102300^T, *L. plantarum* CIP 102506^T, *L. garviae* CIP 102507^T and *B. thermosphacta* CIP 103251^T were obtained from the Pasteur collection (Paris, France). *B. thermosphacta* CD340 was isolated from cooked, peeled, brined and drained tropical shrimp stored under modified atmosphere by Jaffrès et al. (2009). Eight *B. thermosphacta* strains were isolated from cold-smoked salmon and various tropical and arctic shrimp products (Table 1) and belong to the Ifremer collection (Nantes, France). Strains were

stored at -80°C in their growth medium with 10% (v/v) of sterile glycerol. *L. piscium* and *B. thermosphacta* were subcultured twice successively (24 h at 26°C) in Elliker broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and Brain Heart Infusion (BHI, Biokar) respectively before inoculation in growth medium for μ_{max} determination in liquid medium and for challenge tests in cooked peeled shrimp.

2.2. Growth medium

A modified Elliker broth (MEB) containing: tryptone 20 g l^{-1} , yeast extract 5 g l^{-1} , gelatin 2.5 g l^{-1} , glucose 7 g l^{-1} , sodium acetate 1.5 g l^{-1} , sodium chloride 4 g l^{-1} and ascorbic acid 0.5 g l^{-1} was used to monitor the growth of *L. piscium* and *B. thermosphacta*. After sterilisation, pH was adjusted to the desired values with NaOH (1N) or HCl (1N) and the media were filtered sterilised. For NaCl concentration, high salt concentrated MEB was prepared (100 g l^{-1}) and the target values were obtained by appropriate dilution with the same non salted medium. The pH was then adjusted to 7.0 before filter sterilisation.

2.3. Experimental conditions

The parameters were studied in the following order: pH, NaCl and temperature. The effect of pH was studied in a range of 4.6 to 7.4 with a 0.2 step in MEB at 26°C . This temperature had previously been estimated to be closed to the optimum for *L. piscium* (Matamoros et al., 2009b) and *B. thermosphacta* (Baranyi, et al., 1996). The effect of NaCl concentrations, from 0 to 80 g l^{-1} with a 2 - 5 g l^{-1} step was studied in MEB whose pH =7.0 was closed to the optimum observed in the first set of experiments. The effect of temperature was studied from 0°C to 35°C with a 2 - 5°C step in MEB (pH and salt close to the optimum). For each value of the parameters studied, 200 μl of the non-inoculated medium were placed in ten wells of honeycomb sterile microplates (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland). The second sub-subculture of each strain was hundred-fold diluted to reach approximately 10^6 CFU ml^{-1} . The dilution medium was MEB with the same pH and salt concentration than those of the studied conditions. 200 μl of the diluted culture were inoculated in the first well, and then eight successive half-dilutions were performed from the first to the ninth well. The tenth well was used as sterility control. At 0°C and 5°C , growths were performed in flasks by inoculating 1% (v/v) of a diluted subculture to obtain an initial concentration of 10^3 CFU ml^{-1} .

2.4. Growth monitoring

Microplates were placed in a Bioscreen C (Labsystem, Helsinki, Finland) and incubated at 26°C for pH and NaCl studies and at target value for temperature study. Growth was monitored by measuring the optical density (OD) at 600 nm every 20 min. Before each measurement, microplates were shaken 15 s for homogenisation. For each parameter value studied, 9 optical density curves were generated. The detection time (DT) was determined as the time to reach an OD fixed at the middle of the exponential growth phase. DT were plotted versus the neperian logarithm of the initial inoculation level and the μ_{\max} was estimated as the opposite of the slope of the linear regression (Augustin et al., 1999; Baranyi et al., 1999). This calculation was performed by an automated program developed on Matlab version 6.5.0 by authors. Bacteria cultivated in flasks were enumerated on Elliker and BHI plate count agar at 26°C and μ_{\max} estimated with the modified Gompertz model (Zwietering et al., 1990).

2.5. Determination of μ_{opt} in cooked peeled shrimp

Frozen tropical peeled and beheaded shrimp (*Penaeus vannamei*) farmed in Colombia (51/60 size i.e. 51 to 60 shrimps per pound) were obtained from a local production site, Miti industry (Nantes, France). Frozen shrimp were cooked at ONIRIS (Nantes, France) with industrial equipment by immersion in boiling salted water (15 g l⁻¹ NaCl) for 2.5 min after re-ebullition and cooled in melting ice with 15 g l⁻¹ NaCl. The shrimp were vacuum packed in plastic bags (1 kg/ bag) and stored at -80°C for 9 days. The frozen cooked peeled shrimp were then sterilized by ionization at 5.12 ± 0.29 kGy (IONISOS, Pouzauges, France). After processing, the concentration of salt in shrimp was 0.96 % (WP) and pH = 6.82. Shrimp were inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 and *B. thermosphacta* CD340 by spraying 10% v/w onto the surface of the shrimp to reach a final level of approximately 3.5 log CFU g⁻¹ and 2 log CFU g⁻¹ respectively. After inoculation, the samples were mingled to ensure good microbial distribution. The shrimp were then packed in 125 g portions under modified atmosphere (50% N₂ - 50% CO₂) (Multivac T252, Wolfertschwenden, Germany) with a shrimp/gas ratio of approximately 2/1. Shrimp were stored at 12°C for 28 days and removed at regular interval time for microbial analysis as described by Fall et al. (2010).

2.6. Curve fitting and statistical analysis

The experimental data obtained in liquid medium were fitted with the cardinal models proposed by Rosso et al. (1993) (Equation 2) to determine γ (X) for each factor.

$$\gamma(X) = \frac{\mu_{opt}^n (X - X_{max})(X - X_{min})^n}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} [(X_{opt} - X_{min})(X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max})((n-1)X_{opt} + X_{min} - nX)]} \quad (1)$$

With X_{min} and X_{max} the minimum and maximum value of X where the bacteria cannot longer grow and X_{opt} the value of X where the highest μ_{max} is observed and n a curvature parameter. In food products, some of the influencing factors are not taken into consideration (composition, nutrient availability, packaging condition such as modified atmosphere etc.) and the growth rate is (purposely) lowered. One experiment in shrimp with fixed temperature, pH and salt (in water phase) allowed estimating the last parameter of the model, μ_{opt} specific of shrimp (equation 1).

The software Matlab was used for curve fitting (regression by non linear least squares method and Trust-region algorithm) and the quality of the model was estimated with statistical indices such as R-squared (R^2) and Root Mean Square Error (RMSE).

2.7. Validation of the model

To validate the model, other experiments were performed in cooked peeled shrimp as described above with various final salt concentrations, pH and incubation temperatures (Table 2). These data include those of *B. thermosphacta* CD340 growth in cooked peeled shrimp in pure culture obtained by Fall et al., (2010; in press).

Accuracy factor ($10^{\frac{\sum_1^m \log_{10}(\frac{\mu_{predicted}}{\mu_{observed}})}{m}}$) and bias factor ($10^{\frac{\sum_1^m \log_{10}(\frac{\mu_{predicted}}{\mu_{observed}})}{m}}$) were determined providing an objective indication of model performance ($m =$ samples number). The bias factor indicates an under or over estimation of the growth rate by the model and accuracy factor give the average difference between observed and predicted growth rate (Ross, 1996).

3. Results

For *B. thermosphacta* and *L. piscium*, the best fit for equation 1 was always obtained with the acurvature parameter $n = 2$. For NaCl and pH factors, best RMSE values were obtained with only two cardinal parameters and the assumption of symmetric curve around the X_{opt} parameter. So Equation 3, 4 and 5 where used for temperature, NaCl and pH functions respectively.

$$\gamma(T) = \frac{(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min}) [(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]} \quad (3)$$

$$\chi(\text{NaCl}) = \frac{1}{(\text{NaCl}_{\text{max}} - \text{NaCl}_{\text{opt}})^2} (\text{NaCl} - 2\text{NaCl}_{\text{opt}} + \text{NaCl}_{\text{max}})(\text{NaCl}_{\text{max}} - \text{NaCl}) \quad (4)$$

$$\chi(\text{pH}) = \frac{1}{(\text{pH}_{\text{opt}} - \text{pH}_{\text{min}})^2} (\text{pH} - \text{pH}_{\text{min}})(2\text{pH}_{\text{opt}} - \text{pH}_{\text{min}} - \text{pH}) \quad (5)$$

3.1. Growth of *B. thermosphacta*

Figures 1, 2 and 3 show the evolution of μ_{max} as a function of salt, temperature and pH respectively. Table 1 summarised the cardinal values estimated by the model (equations 1, 2 and 3) in MEB. The high R^2 and low RMSE values confirmed the quality of the model (Table 3). *B. thermosphacta* CD340 grew very well without NaCl. The minimum NaCl concentration that stopped *B. thermosphacta* growth was around 60 - 65 g.l⁻¹ (Fig. 1). The optimum temperature was around 25-27°C and then μ_{max} decreased quickly with the increase of temperature. No growth was observed at temperature higher than 31°C. *B. thermosphacta* was psychrotolerant and grew at refrigerated temperature. The growth is very weak but still exists at 0°C (Fig. 2). A neutral pH was optimal for *B. thermosphacta* but development was still possible at pH 4.8 (Fig. 3). The μ_{opt} in Elliker medium was estimated at 1.08 h⁻¹ (generation time = 38 min).

The μ_{opt} in shrimp was determined with one experiment performed in cooked peeled shrimp with 0.96% of salt (WP), pH = 6.82 and stored at 12°C under modified atmosphere packaging. μ_{max} observed was 0.196 h⁻¹ so, according to equation (1), μ_{opt} in shrimp was 0.64 h⁻¹ (generation time = 65 min). Table 2 shows μ_{max} observed and μ_{max} predicted by the model for four experiments performed in shrimp. The bias factor and accuracy factor were 0.98 and 1.19 respectively.

The variability of μ_{max} versus temperature between nine strains of *B. thermosphacta* isolated from various seafood products (shrimp and smoked salmon) and the type strain isolated from pork sausage has been studied in our laboratory in a range of 10 to 35°C with the absorbance detection time technique previously described. The μ_{opt} varied from 0.76 to 1.16 h⁻¹ (Table 3) but the overall behaviour was similar for all the strains. T_{opt} was near 25°C and very low or no growth was recorded at 30°C and growth was never observed at 35°C.

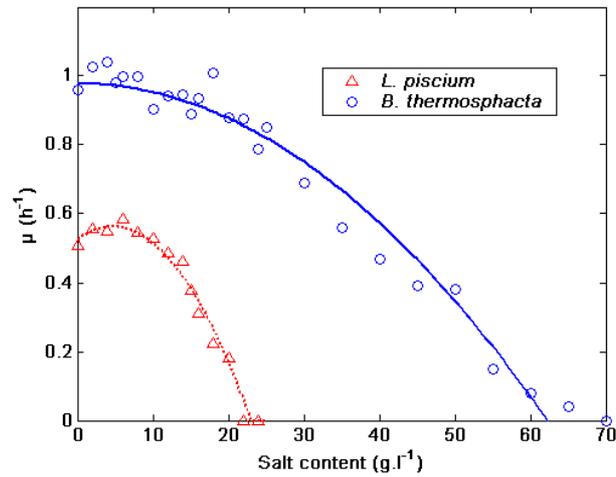


Figure 1: Growth rate of *B. thermosphacta* CD340 (full line) and *L. piscium* CNCM I-4031 (dotted line) in modified Elliker broth versus NaCl: experimental data (symbol) and model (line)

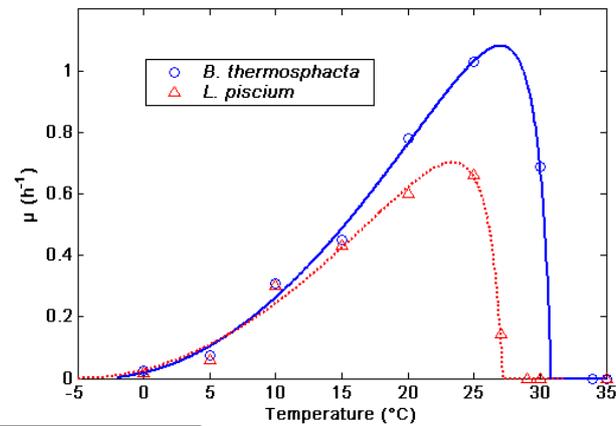


Figure 2: Growth rate of *B. thermosphacta* CD340 (full line) and *L. piscium* CNCM I-4031 (dotted line) in modified Elliker broth versus temperature: experimental data (symbol) and model (line)

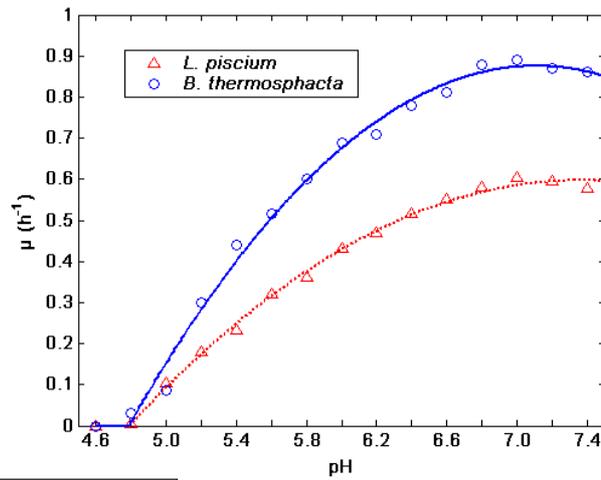


Figure 3: Growth rate of *B. thermosphacta* CD340 (full line) and *L. piscium* CNCM I-4031 (dotted line) in modified Elliker broth versus pH: experimental data (symbol) and model (line)

Table 1: Growth cardinal values of *B. thermosphacta* CD340 in laboratory medium

Cardinal value	<i>B. thermosphacta</i>	Statistics
T_{\min}	-3.36°C	$R^2=0.9914$
T_{opt}	27.01°C	RMSE= 0.02945°C
T_{\max}	30.85°C	
pH_{opt}	7.11	$R^2=0.9882$
pH_{\min}	4.79	RMSE= 0.0226 pH unit
NaCl_{opt}	0 g l ⁻¹	$R^2=0.9941$
NaCl_{\max}	62.24 g l ⁻¹	RMSE= 0.06177 g l ⁻¹

Table 2: Maximum growth rate of *B. thermosphacta* CD340 and *L. piscium* CNCM I-4031 observed in cooked peeled shrimp and predicted by the model (equation 1)

Strains	T (°C), NaCl (% WP), pH	μ_{\max} observed (h ⁻¹)	μ_{\max} predicted (h ⁻¹)
<i>B. thermosphacta</i>	12 - 1.92 - 6.82	0.184	0.182
	4 - 0.96 - 6.82	0.052	0.047
	4 - 1.92 - 6.75	0.057	0.042
	8 - 1.69 - 6.58	0.075	0.101
<i>Bias factor</i> = 0.99 <i>Accuracy factor</i> = 1.19			
<i>L. piscium</i>	4 - 0.96 - 6.75	0.108	0.07
	4 - 1.92 - 6.74	0.033	0.019
	12 - 0.96 - 6.63	0.172	0.16
	8 - 1.70 - 6.58	0.086	0.056
<i>Bias factor</i> = 0.67 <i>Accuracy factor</i> = 1.50			

Table 3 : Maximum growth rate (μ_{\max} in h⁻¹) of different strains of *B. thermosphacta* as function of temperature

Strain	Origin	Temperature (°C)					
		10	15	20	25	30	35
CD340	CPDB ^a <i>Penaeus vannamei</i>	0.31	0.45	0.78	1.03	0.69	NG
CD290	CPDB <i>Penaeus vannamei</i>	0.28	0.49	0.70	0.96	NG	NG
CD251	CPDB <i>Penaeus vannamei</i>	0.29	0.41	0.68	0.95	NG	NG
CRE2329	WC ^b <i>Penaeus vannamei</i>	0.31	0.48	0.88	1.03	NG	NG
RF199	CP ^c <i>Pandalus borealis</i>	0.31	0.48	0.88	1.03	NG	NG
RF200	CP <i>Pandalus borealis</i>	0.30	0.47	0.94	1.06	NG	NG
RF202	CP <i>Pandalus borealis</i>	0.34	0.51	0.88	1.06	NG	NG
EU2206	cold-smoked salmon	0.29	0.41	0.60	1.16	NG	NG
SF1682	cold-smoked salmon	0.30	0.33	0.69	0.89	1.02	NG
CIP 103251	Pork sausage	0.14	0.33	0.53	0.76	NG	NG

^aCPDB :cooked, peeled, brined, drained ; ^bWC : whole cooked ; ^cCP : cooked peeled ; NG : no growth

3.2. Growth of *L. piscium* CNCM I-4031

Cardinal values are presented in Table 4 and the fitted model of μ_{\max} as a function of NaCl, temperature and pH in Figs. 1, 2 and 3 respectively. The μ_{opt} in Elliker broth was 0.75 h^{-1} (generation time = 55 min). Salt was not required for the growth of *L. piscium* and salt concentration over than 23 g l^{-1} stopped the development. The pH_{opt} was close to that of *B. thermosphacta* (around 7.0 - 7.4) and growth was possible till $\text{pH} = 4.8$. At refrigerated temperature (between 0 to 15°C) *L. piscium* grew approximately at the same rate as *B. thermosphacta* (Fig. 2). The increase from 15 to 25°C had a lower effect on μ_{\max} of *L. piscium*. The optimum growth was observed for a temperature around $23\text{-}25^{\circ}\text{C}$.

Then μ_{\max} decreased drastically with the increase of temperature since the ratio between the growth rate at optimal temperature (23.4°C) and the growth rate at 27°C was around 5. No growth was observed at 29°C and over. The μ_{\max} of other *Lactococcus* sp. was determined with the absorbance detection time method between 10 and 35°C . The *L. piscium* type strain grew at 30°C ($\mu_{\max} = 0.24 \text{ h}^{-1}$) but not 35°C , whereas another *L. piscium* EU2229 isolated from raw salmon did not at 30°C . The reference strains *L. lactis*, *L. garviae*, *L. plantarum* and *L. raffinolactis* still cultivated at 35°C (μ_{\max} respectively 1.1, 1.79, 0.46 and 0.38 h^{-1}).

As for *B. thermosphacta*, the μ_{opt} of *L. piscium* CNCM I-4031 in shrimp was estimated with one experiment performed in cooked peeled shrimp (NaCl = 0.96% WP, $\text{pH} = 6.82$ and $T = 12^{\circ}\text{C}$). The μ_{\max} observed was 0.180 h^{-1} and the μ_{opt} calculated 0.46 h^{-1} (generation time 90 min). The model predicting growth of *L. piscium* was tested with four environmental conditions presented in Table 2. Bias and accuracy factor were 0.67 and 1.50 respectively.

Table 4: Growth cardinal values of *L. piscium* CNCM I-4031 in laboratory medium

Cardinal value	<i>L. piscium</i>	Statistics
T_{\min}	-4.80°C	$R^2=0.964$ RMSE= 0.0466°C
T_{opt}	23.39°C	
T_{\max}	27.19°C	
pH_{opt}	7.36	$R^2=0.9966$
pH_{\min}	4.79	RMSE= 0.01266 pH unit
NaCl_{opt}	4.69 g l^{-1}	$R^2=0.9738$
NaCl_{\max}	23.00 g l^{-1}	RMSE= 0.0359 g l^{-1}

4. Discussion

B. thermosphacta has been identified as a specific spoilage organism of meat products for years explaining why most of the studies aiming at predicting growth or metabolism as function of environmental parameters have been performed with strains isolated from meat. In the present study strains isolated from various lightly preserved seafood products have been tested. Among them, *B. thermosphacta* CD340 was studied in more details as it was the target strain used to characterise the bioprotective effect of *L. piscium* CNCM I-4031 (Fall et al., 2010; in press). Although isolated from marine salted products, *B. thermosphacta* CD340 can easily grow in absence of NaCl. Till 10 - 15 g l⁻¹, μ_{\max} was not significantly lowered (Fig. 1). Mc Clure et al. (1993) have observed similar value with a strain isolated from fresh bacon cultivated in Tryptone Soya Broth (TSB) ($\text{NaCl}_{\text{opt}} \leq 7 \text{ g l}^{-1}$). *B. thermosphacta* is specie known to cultivate well in basic medium such as BHI or TSB that contains less than 5 g l⁻¹ of NaCl. The maximum salt concentration tolerated by our strain was 62 g l⁻¹. This value was a little lower than this of (Mc Clure, et al., 1993) who observed growth in presence of 60 g l⁻¹ and estimated NaCl_{\max} at around 80 g l⁻¹. Same value were found by Blickstad, (1984) both aerobically and anaerobically. The pH_{opt} and pH_{\min} of *B. thermosphacta* CD340 were 7.1 and 4.8 respectively. In literature, the range of pH tested was often smaller (5.2 - 6.8) associated to temperature far from the optimum, making difficult comparison with our data. Mc Clure, et al. (1993) estimated $6.8 \leq \text{pH}_{\text{opt}} \leq 6.9$ but did not test higher pH nor $\text{pH} < 5.6$. Pin et al. (1998) did not observe large difference of μ_{\max} between $\text{pH} = 5.2$ and 6.4 at 11°C in TSB with a cocktail of three strains from different meat ($\mu_{\max} = 0.26$ and 0.31 h^{-1} respectively). Same observation was obtained in naturally contaminated fresh ground meat at 15°C (Koutsoumanis et al., 2006). Oppositely in our study at optimal NaCl and temperature, the inhibitory effect of pH was much higher (μ_{\max} ratio between $\text{pH} = 6.4$ and 5.2 was 2.8). Although same difficulties are found to compare results on the effect of temperature, most of the study reported growth at 0°C - 2°C (Mc Clure et al., 1993; Baranyi et al., 1995; Pin & Baranyi, 1998; Koutsoumanis et al., 2000; Braun & Sutherland, 2004; Cayré et al., 2005; Koutsoumanis, et al., 2006; Zhou et al., 2009). $T_{\text{opt}} = 27.0^\circ\text{C}$ estimated in this study is in agreement with the results of (Mc Clure et al., 1993) ($23 \leq T_{\text{opt}} \leq 24^\circ\text{C}$) and (Baranyi et al., 1995; Baranyi et al., 1996) ($25 \leq T_{\text{opt}} \leq 30^\circ\text{C}$). T_{\max} (30.8°C) is also closed to values reported by Gardner, (1981) ($T_{\max} > 30^\circ\text{C}$) and Baranyi et al. (1996) (31.2°C for *B. thermosphacta* NCFB 2891). In the present study, the 10 strains tested had the same T_{opt} and T_{\max} . All those data tend to prove that the growth cardinal values of *B. thermosphacta* are similar whatever the origin of the strains. The μ_{opt} from literature are difficult to compare, as the growth media

and strains tested are often different. Data in Table 3 (same culture medium) show no or very weak differences between strains from seafood while the strain isolated from meat had the lowest μ_{opt} . The μ_{opt} in cooked peeled shrimp stored under modified atmosphere was reduced by 40 % compared to liquid medium. However, growth is still possible ($\mu_{max} = 0.044 \text{ h}^{-1}$) in shrimp in the usual marketed conditions (1.5 % WP NaCl, pH = 6.8, 4°C, storage under modified atmosphere) and quite rapid ($\mu_{opt} = 0.115 \text{ h}^{-1}$) at a temperature of 8°C frequently recorded in consumer fridge. The bias and accuracy factor of the model were 0.98 and 1.19 respectively which is good according to the interpretation of the bias factor proposed by Ross, (1996, 1999) for seafood : bias factor ranging 0.95 - 1.1 good ; 1.11 - 1.43 acceptable ; ≤ 0.87 or ≥ 1.43 unacceptable. It is to be noticed that the pH values were quite similar in all the validation experiments. In cold-smoked salmon, a higher level of salt reduced significantly the pH (Leroi et al., 2000) and the same phenomenon was expected in this study. The pH may be an important factor to take into consideration for industry that makes use of organic acids as preservatives. Additionally to the pH, a γ -function for different organic acids could be developed and added into the model in the future.

L. piscium is new specie recently described by Williams et al. (1990). The strain has been first isolated from diseased Rainbow yearling. More recently *L. piscium* has been found as part of the dominating microbiota of vacuum-packed beef or pork at refrigerated temperature (Sakala et al., 2002a; 2002b; Jiang et al., 2010), cheese at the beginning of ripening (Carraro et al., 2011), ayu-narezushi (narezushi made using the sweetfish) (Matsui et al., 2010), cabbage and lettuce residue (Yang et al., 2010) and also in human intestine (Kubota et al., 2010). Despite the importance of this specie in food, very few data are available on its growth characteristics. The cardinal pH values of the bioprotective *L. piscium* CNCM I-4031 are close to those of *B. thermosphacta* (optimum at neutral pH, minimum at pH 4.8). It grew well without NaCl and μ_{max} was quite unchanged till 8 g l⁻¹. However, a strong inhibitory effect was observed and the maximum salt concentration tolerated (23 g l⁻¹) was three-times lower than *B. thermosphacta*. Sakala et al. (2002b) reported absence of growth at 40 g l⁻¹ of salt, but they did not test lower concentrations. This low value could be a serious restriction for use of *L. piscium* CNCM I-4031 as bioprotective culture in lightly preserved seafood whose salt concentration is often more than 2% (WP). However, Matamoros, et al. (2009a) have observed a good implantation of *L. piscium* CNCM I-4031 in cold-smoked salmon which contained approximately 5% of salt (WP). Presence of osmotically active molecules in seafood may be an explanation for such observation. Leblanc et al. (2001) have shown that salmon flesh contains choline which can be imported and oxidized by bacteria (*Shewanella putrefaciens* in their study) leading to

the intracellular accumulation of glycine betaine, a molecule with osmoprotective properties. *L. piscium* CNCM I-4031 grew well at low temperature (0°C) and had a maximum below 25°C which is very uncommon among psychrotrophic lactic acid bacteria. An overexpression of cold-adaptation proteins during growth at low temperature evidenced by Garnier et al. (2010) may explain the psychrotrophic behaviour of *L. piscium* CNCM I-4031. *L. piscium* is the most psychrotolerant specie among *Lactococcus* genus. *L. piscium* type strain grew at 30°C but not 35°C as found by Williams et al. (1990), whereas the bioprotective strain and another *L. piscium* EU2229 isolated from raw salmon did not at 30°C. Sakala et al. (2002b) observed growth at 5°C but weak and variable development at 30°C with 100% of their isolates from fresh vacuum packaged beef. The bias factor showed that the model proposed under-estimated μ_{\max} of *L. piscium* in shrimp. The addition of a classical interaction γ function proposed by Augustin et al. (2005) did not significantly change the prediction but increasing the value of NaCl_{\max} improving the quality of the model. The assumption that the optimum cardinal values of a microorganism are independent of the matrix seems to fail in the case of *L. piscium*, at least for NaCl_{\max} . Osmotically active solutes may be actively imported from the shrimp flesh and intracellular accumulation may trigger growth restoration of cultures under inhibitory osmolarities, explaining the under-estimation of the model. Experiments in shrimp with higher level of salt are necessary to confirm this hypothesis.

In this study, only μ_{\max} was considered for comparison of the two strains because no lag time was observed in shrimp matrix and the maximum cells in pure culture was always around 10^9 CFU g⁻¹. Dainty & Mackey, (1992) raised the question whether the rapid growth of a population might be a sufficient reason for its dominance in some chilled food products. Pin & Baranyi, (1998) concluded that dominance of *Pseudomonas* spp. in meat versus *Brochothrix* and enterobacteriaceae was not due to difference in their growth rate but to interaction between bacteria in mixed culture. In our study, μ_{\max} of *B. thermosphacta* in shrimp was higher than *L. piscium* when grown in isolation whatever the environmental conditions and the reason why *B. thermosphacta* growth is limited in presence of the bioprotective strains is still unclear.

5. Conclusion

Most of the models developed in literature for *B. thermosphacta* cannot be extrapolated to other matrix nor extended outside of the domain tested. The present data based on the γ -concept allow predicting the growth of *B. thermosphacta* in shrimp and can be adapted to other foods with very few fastidious experiments in matrix. Other technological factors such as preservatives or modified atmosphere can also be tested separately in liquid medium and included in the current model. Although the γ -concept seems less accurate for prediction of *L. piscium* growth, data obtained both in liquid medium and shrimp matrix demonstrated the good adaptation of the bioprotective strain at chilled temperatures in a wide range of pH, assuming possible application in new products such as lightly marinated seafood. The tolerance to salt may depend on presence of osmotically active molecules and so has to be studied into more details directly in the matrix.

References

- Augustin, J. C.**, Rosso, L., & 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.
- Baranyi, J.**, & Carmen, P. (1999). Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 732-736.
- Baranyi, J.**, Jones, A., Walker, C., Kaloti, A., Robinson, T., & Mackey, B. (1996). A Combined Model for Growth and Subsequent Thermal Inactivation of *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 1029-1035.
- Baranyi, J.**, Robinson, T. P., Kaloti, A., & Mackey, B. M. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 27(1), 61-75.
- Blickstad, E.** (1984). The effect of water activity on growth and end-product formation of two *Lactobacillus* spp. and *Brochothrix thermosphacta* ATCC^T 11509. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(1), 13-17.
- Blickstad, E.**, & G., M. (1984). Growth and end-product formation in fermenter cultures of *Brochothrix thermosphacta* ATCC^T 11509 and two psychrotrophic *Lactobacillus* spp. in different gaseous atmospheres. *Journal of Applied Bacteriology*, 57, 213-220.
- Braun, P., & Sutherland, J. P. (2004). Predictive modelling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity by a cocktail of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 169-175.
- Carraro, L.**, Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Martino, M. E., Novelli, E., Frigo, F., Marino, M., & Cardazzo, B. (2011). Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. *Research in Microbiology*, 162(3), 231-239.
- Cayré, M. E.**, Garro, O., & Vignolo, G. (2005). Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. *Food Microbiology*, 22(6), 505-512.
- Dainty, R. H.**, & Mackey, B. M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chilled-stored meat and spoilage process. *Journal of Applied Bacteriology (Symposium Supplement)*, 73, 103S-114S.

- Fall, P. A.**, Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F., & Pilet, M. F. (2010). Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 357-361.
- Fall, P. A.**, Pilet, M. F., Leduc, F., Cardinal, M., Duflos, G., Guérin, C., Joffraud, J. J., & Leroi, F. (in press). Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 during storage at 8 °C. *International Journal of Food Microbiology*.
- Gardner, G. A.** (1981). *Brochothrix thermosphacta* (*Microbacterium thermosphactum*) in the spoilage of meats. In T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B. Christian & N. P. Skovgaard (Eds.), *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity* (pp. 139-143). London: Academic Press.
- Garnier, M.**, Matamoros, S., Chevret, D., Pilet, M. F., Leroi, F., & Tresse, O. (2010). Adaptation to cold and proteomic responses of the psychrotrophic biopreservative *Lactococcus piscium* strain CNCM I-4031. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), 8011-8018.
- Jaffrès, E.**, Lalanne, V., Macé, S., Cornet, J., Cardinal, M., Sérot, T., Dousset, X., & Joffraud, J. J. (2011). Sensory characteristics of spoilage and volatile compounds associated with bacteria isolated from cooked and peeled tropical shrimps using SPME-GC-MS analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 195-202.
- Jaffrès, E.**, Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M. F., Prévost, H., Joffraud, J. J., & Dousset, X. (2009). Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 20-29.
- Jiang, Y.**, Gao, F., Xu, X. L., Su, Y., Ye, K. P., & Zhou, G. H. (2010). Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE. *Meat Science*, 86(4), 889-895.
- Kakouri, A.**, & Nychas, G. J. E. (1994). Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs - possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(2), 163-172.
- Koutsoumanis, K.**, Stamatiou, A., Skandamis, P., & Nychas, G. J. E. (2006). Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 124-134.

- Koutsoumanis, K. P.**, Taoukis, P. S., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. E. (2000). Applicability of an Arrhenius model for the combined effect of temperature and CO₂ packaging on the spoilage microflora of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3528-3534.
- Kubota, H.**, Tsuji, H., Matsuda, K., Kurakawa, T., Asahara, T., & Nomoto, K. (2010). Detection of human intestinal catalase-negative, Gram-positive cocci by rRNA-targeted Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5440-5451.
- Laursen, B. G.**, Leisner, J. J., & Dalgaard, P. (2006). *Carnobacterium species*: Effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3604-3611.
- Leblanc, L.**, Gouffi, K., Leroi, F., Harkte, A., Blanco, C., Auffray, Y., & Pichereau, V. (2001). Uptake of choline from salmon flesh and its conversion to glycine betaine in response to salt stress in *Shewanella putrefaciens*. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 93-103.
- Leporq, B.**, Membre, J. M., Dervin, C., Buche, P., & Guyonnet, J. P. (2005). The "Sym'Previus" software, a tool to support decisions to the foodstuff safety. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1-3), 231-237.
- Leroi, F.**, Joffraud, J. J., & Chevalier, F. (2000). Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold smoked salmon during storage at 5°C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection*, 63(4), 502-508.
- Matamoros, S.**, Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Kasbi Chadli, F., Cornet, J., Prevost, F., & Pilet, M. F. (2009a). Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection*, 72(2), 365-374.
- Matamoros, S.**, Pilet, M. F., Gigout, F., Prévost, H., & Leroi, F. (2009b). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 26, 638-644.
- Matsui, H.**, Saka, E., Isobe, Y., & Narita, M. (2010). Comparison of the bacterial community structures of Ayu-narezushi produced by two different manufacturers. *Biocontrol Science*, 15(2), 63-68.
- Mc Clure, P. J.**, Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T. M., & Roberts, T. A. (1993). A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 161-178.

- Membré, J. M.**, Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., & Zwietering, M. (2005). Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *International Journal of Food Microbiology*, *100*(1-3), 179-186.
- Nieminen, T. T.**, Vihavainen, E., Paloranta, A., Lehto, J., Paulin, L., Auvinen, P., Solismaa, M., & Bjorkroth, K. J. (2011). Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(3), 360-366.
- Nychas, G. J. E.**, Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, *78*(1-2), 77-89.
- Pennacchia, C.**, Ercolini, D., & Villani, F. (2011). Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology*, *28*(1), 84-93.
- Pin, C.**, & Baranyi, J. (1998). Predictive models as means to quantify the interaction of spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, *41*, 59-72.
- Pin, C.**, de Fernando, G. D. G., & Ordonez, J. A. (2002). Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(9), 4441-4447.
- Pinon, A.**, Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J. M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., & Vialette, M. (2004). Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(2), 1081-1087.
- Ross, T.** (1996). Indice of performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, *81*, 501-508.
- Ross, T.** (1999). *Predictive food microbiology models in the meat industry*. Sydney: Meat & Livestock Australia.
- Rosso, L.**, Lobry, J. R., & Flandrois, J. P. (1993). An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial-growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology*, *162*(4), 447-463.
- Sakala, R. M.**, Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C., & Ogawa, M. (2002a). Change in the composition of the microflora, on vacuum-packaged beef during chiller storage. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(1-2), 87-99.

- Sakala, R. M.**, Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C., & Ogawa, M. (2002b). Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 173-179.
- Sheridan, J. J.**, Doherty, A. M., Allen, P., McDowell, D. A., Blair, I. S., & Harrington, D. (1997). The effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the shelf-life of lamb primals, stored at different temperatures. *Meat Science*, 45(1), 107-117.
- Vasilopoulos, C.**, De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2010). Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiology*, 27(1), 77-84.
- Vasilopoulos, C.**, Ravyts, F., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2008). Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1341-1353.
- Williams, A. M.**, Fryer, J. L., & Collins, M. D. (1990). *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters*, 68, 109-114.
- Yang, J.**, Cao, Y., Cai, Y., & Terada, F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 3136-3145.
- Zhou, K.**, Fu, P., Li, P., Cheng, W., & Liang, Z. (2009). Predictive modeling and validation of growth at different temperatures of *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Food Safety*, 29(3), 460-473.
- Zwietering, M. H.**, deWit, J. C., & Notermans, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology*, 30(1-2), 55-70.
- Zwietering, M. H.**, Jogenburger, I., Rombouts, F. M., & Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied Microbiology*, 56(6), 1875-1881.

2-2 Effet de la variation des paramètres physico-chimiques et du taux d'inoculum initial de *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 sur la croissance de *Brochothrix thermosphacta* et sur la qualité organoleptique des crevettes cuites décortiquées

1 Introduction

Le but de cette étude est de modéliser l'effet simultané des facteurs sel, température et niveau d'ensemencement de *L. piscium* sur la croissance de *B. thermosphacta* en milieu crevette cuite décortiquée emballée sous atmosphère modifiée et sur la qualité organoleptique du produit. L'interaction entre *L. piscium* et *B. thermosphacta* est un facteur impossible à étudier avec des expériences en BIOSCREEN puisque la mesure de la densité optique ne permet pas de différencier les deux populations. Par ailleurs, elle ne permet pas non plus d'étudier le temps de latence et le nombre maximum de cellules en fin de croissance. Or, l'effet des bactéries lactiques sur une population joue souvent sur cette valeur finale (Jameson, 1962). Nous avons donc décidé d'effectuer des expériences *in situ* dans la matrice crevette, en faisant varier simultanément le niveau d'ensemencement de *L. piscium*, la température et le taux de sel. Le pH n'est pas pris en compte car nous avons constaté qu'il est relativement constant dans la crevette tropicale, quelle que soit son origine. Les données seront traitées par une approche polynomiale classique, présentant l'avantage d'avoir une bonne qualité d'ajustement des paramètres du modèle. Cependant par cette approche, les résultats sont valables uniquement dans les conditions de réalisation des expériences (même domaine d'étude et même matrice). C'est donc une approche intéressante mais difficile à mener puisqu'elle demande de nombreux essais réalisés en matrice alimentaire, dans laquelle il faut en outre pouvoir maîtriser la valeur des facteurs étudiés.

2 Matériels et méthodes

2.1 Souches étudiées

Les deux souches étudiées sont *L. piscium* CNCM I-4031 et *B. thermosphacta* CD340. Elles sont isolées respectivement de pavés de saumon frais et de crevettes tropicales cuites décortiquées. Les deux souches sont conservées à -80°C dans des cryotubes contenant du milieu Elliker (BIOKAR Diagnostic, Beauvais, France) plus 10% de glycérol pour *L. piscium* ou Brain Heart Infusion (BHI) (BIOKAR Diagnostic) pour *B. thermosphacta*.

2.2 Préculture

Deux précultures successives de 24 h à 26°C sont réalisées en milieu Elliker pour *L. piscium* et en BHI pour *B. thermosphacta*. Avant ensemencement sur la matrice crevette, la souche de

B. thermosphacta a subi une série de dilutions dans de l'eau physiologique stérile (0.85 % NaCl + 0.1% peptone) afin d'atteindre le taux d'inoculum final dans la crevette de 2 Log UFC/g. En ce qui concerne *L. piscium*, la deuxième préculture a été réalisée dans deux flacons de 200 ml. Les cellules ont été lavées en centrifugeant les 400 ml de précultures à 8500 g pendant 10 minutes et le culot resuspendu dans le même volume d'eau physiologique. Aucune dilution n'est nécessaire pour l'inoculation au niveau le plus haut (7 Log UFC/g) et une dilution appropriée est réalisée pour atteindre le niveau final de 3.5 Log UFC/g de crevette.

2.3 Facteurs et domaine expérimental

Trois facteurs ont été retenus : la température en degré Celsius (T°), le taux de sel (NaCl en g/100 g de crevette) et le niveau initial d'ensemencement par *L. piscium* exprimé en logarithme en base 10 (Log N_i UFC/g). Deux niveaux de valeur (4°C et 12°C ; 0.8% et 2% de sel en g/100 g de chair) ont été choisis pour les deux premiers facteurs tandis que pour le troisième facteur, trois niveaux ont été arrêtés (0, 3.5 et 7 Log UFC/g). Le niveau 0 correspond à une absence de *L. piscium*. Pour le traitement des données les valeurs ont été normalisées entre -1 et +1 selon l'équation (1).

$$(1) X_n = \frac{X - \left(\frac{X_{\min} + X_{\max}}{2} \right)}{\left(\frac{X_{\max} - X_{\min}}{2} \right)}$$

avec X_n la valeur normalisée de la variable réelle X , X_{\min} la valeur réelle basse de X et X_{\max} la valeur réelle haute de X

2.4 Plan d'expériences

Les expériences ont été réalisées en matrice crevette. Elles ont été organisées selon un plan comprenant 15 essais qui permettront de calculer l'effet linéaire des facteurs sel et température, les effets linéaires et quadratiques du niveau d'inoculum de *L. piscium* ainsi que les interactions d'ordre 1 entre les trois facteurs. Les huit premières expériences correspondent à un plan factoriel complet (2^3) pour les trois facteurs à deux niveaux (dans ce cas, les niveaux bas et haut de l'inoculum de *L. piscium* sont 0 et 7 Log UFC/g). Les expériences 9, 10 et 11 correspondent à trois répétitions du point central, permettant d'estimer la variabilité des réponses et de vérifier (sans pouvoir calculer) un éventuel effet quadratique des facteurs. Les

expériences 12, 13, 14 et 15 complètent le plan afin de calculer l'effet quadratique du niveau d'inoculum. Le tableau 1 résume les 15 essais. Toutes les expériences ont été réalisées en même temps.

Tableau 1 : Expérimentations planifiées

essais	T (°C)	Sel (%)	<i>L. piscium</i> (Log UFC/g)
1	4	0.8	0
2	4	2	0
3	12	0.8	0
4	12	2	0
5	4	0.8	7
6	4	2	7
7	12	0.8	7
8	12	2	7
9	8	1.4	3.5
10	8	1.4	3.5
11	8	1.4	3.5
12	4	0.8	3.5
13	4	2	3.5
14	12	0.8	3.5
15	12	2	3.5

2.5 Réponses mesurées et modèle polynomial

Les courbes de croissance de *B. thermosphacta* et de *L. piscium* obtenues pour les 15 expériences ont été modélisées avec le modèle de Rosso (1995) à trois paramètres λ , μ_{\max} et N_{\max} (Equation 2).

$$(2) \text{ si } t < \lambda, \text{Log}(N(t)) = \text{Log}(N_i)$$

$$\text{si } t \geq \lambda, \text{Log}(N(t)) = \text{Log} \left(\frac{N_{\max}}{1 + \left(\frac{N_{\max} - 1}{N_i} \right) e^{-\mu_{\max}(t-\lambda)}} \right)$$

$N(t)$ étant le nombre de cellules à l'instant t , t le temps, N_i le nombre initial de cellules au moment de l'inoculation (constante mesurée dans chaque expérience), N_{\max} le nombre maximum de cellules, λ le temps de latence, μ_{\max} le taux maximum de croissance.

Pour *B. thermosphacta* comme pour *L. piscium*, les réponses Y estimées à partir du modèle primaire de Rosso sont λ , μ_{\max} et N_{\max} . Un modèle secondaire polynomial (équation 3) a été postulé a priori, exprimant Y en fonction de (T°), (NaCl) et ($\text{Log } N_i$).

$$(3) \quad Y = a_0 + a_1 \times (T^\circ) + a_2 \times (\text{NaCl}) + a_3 \times (\text{Log } N_i) + a_{12} \times (T^\circ) \times (\text{NaCl}) + a_{13} \times (T^\circ) \times (\text{Log } N_i) + a_{23} \times (\text{NaCl}) \times (\text{Log } N_i) + a_{33} \times (\text{Log } N_i)^2$$

Les coefficients du modèle ont été calculés à l'aide des 15 expériences, par régression linéaire avec la méthode des moindres carrés des résidus, à l'aide du logiciel STATGRAPHICS Plus V.5.1. Les données ont été traitées avec les valeurs normalisées des facteurs. Les tests de significativité des paramètres ont été menés avec un intervalle de confiance de 95%. La différence entre la réponse observée et la réponse prédite par le modèle s'explique par l'erreur pure, qui correspond à la variance expérimentale, et par le manque d'ajustement du modèle. Le coefficient de détermination R^2 indique la part de la variation de la réponse prédite par le modèle.

2.6 Préparation des crevettes

La matrice étudiée est de la crevette tropicale (*Penaeus vannamei*) vendue par MITI (Nantes, France). Il s'agit de la crevette d'aquaculture de calibre 51/60 importée de Colombie. Elle est achetée crue congelée, décortiquée et déveinée (sans tête ni queue) et ne contient pas d'ajout de bisulfite. La cuisson s'est déroulée dans la halle technologique d'ONIRIS. Les crevettes ont été séparées en trois lots selon les taux de sel fixés dans le plan expérimental. Des pré-essais ont été réalisés au laboratoire pour déterminer la concentration en sel nécessaire dans les bains de cuisson et de refroidissement pour atteindre les niveaux choisis (1.5%, 4%, 7%, pour

respectivement 0.8, 1.4 et 2%). Les cuissons ont commencé par le taux de sel le plus faible pour finir avec le plus élevé. Entre chaque lot, le bac de cuisson a été rincé et l'eau changée. Les crevettes ont été plongées sans décongélation préalable dans l'eau salée portée à ébullition (1 kg de crevette pour 5.3 litres d'eau). Après la ré-ébullition, atteinte au bout de sept minutes, la cuisson s'est poursuivie pendant 2.5 min puis les crevettes ont été plongées pendant 10 à 15 min dans un bain de refroidissement contenant de la glace, de l'eau et 1.5% du volume total (eau + glace) en sel. Après égouttage, elles sont réparties dans des sachets de 1 kg puis mises sous vide avec une machine Multivac C400 (Wolfertschwenden, Allemagne) avant de subir une surgélation rapide à l'aide d'une cellule de refroidissement. Les crevettes sont ensuite stockées à -80°C pendant quelques jours puis ionisées à l'état congelé à 5.12 kGy par l'entreprise IONISOS (Pouzauges, France) et conservées de nouveau à -80°C en attendant le début des expérimentations.

2.7 Réalisation des challenges tests

Les crevettes ont étéensemencées à 10% volume/poids sous une hotte à flux laminaire après distribution des quantités adéquates dans des bacs en plastiques stérile. La composition de l'inoculum en volume était de 5% de *L. piscium* + 5% de *B. thermosphacta*. Dans les lots qui ne contiennent pas de *L. piscium* (expériences 1 à 4), les 5% ont été remplacés par de l'eau physiologique stérile. L'ensemencement a été effectué à l'aide de pulvérisateurs manuels stériles. Après ensemencement, les crevettes ont été mélangées à l'aide de cuillères stériles pendant cinq minutes afin de permettre une bonne imprégnation de l'inoculum. Elles ont ensuite été distribuées dans des barquettes (125 g par barquette) puis emballées sous atmosphère modifiée (50% CO₂ / 50% N₂) avec une machine Multivac T252, (Wolfertschwenden, Allemagne) avec un ratio crevette/gaz approximatif de 2/1. Les barquettes ont ensuite été stockées suivant les températures fixées (4°C, 8°C, 12°C) pendant 28 jours. Le nombre de points d'analyses a été fixé en fonction de la température d'incubation (7 points à 4°C et 9 points à 8 et 12°C).

2.8 Analyses microbiologiques

Pour chaque analyse, 20 g de crevette ont été prélevés dans chaque barquette et mises dans un sac stomacher contenant 80 ml d'eau physiologique puis broyés pendant 2 min au stomacher 400 (Seward Medical, London, UK). *L. piscium* a été dénombré sur boîtes de Pétri de milieu

Elliker gélosé inoculées en surface et incubées en anaérobiose à 8°C pendant 5 jours. *B. thermosphacta* a été suivi sur milieu sélectif Streptomycin Sulfate Thallous Acetate Agar avec supplément sélectif (Oxoid, Hampshire, Angleterre), inoculation en surface et incubation à 26°C pendant 48 h.

2.9 Analyses biochimiques

La concentration en sel dans les 15 lots a été dosée par un chlorimètre à électrode d'argent (Sherwood MK II analyser 926, Cambridge, Angleterre). Le pH de chaque lot a été mesuré dans la suspension mère.

2.10 Analyse sensorielle

Les tests ont été réalisés par 13 personnes du jury interne d'analyse sensorielle de l'Ifremer de Nantes. Pour chaque expérience, deux points d'analyse sensorielle ont été réalisés au cours du temps, à 7, 14, 21 ou 28 jours selon les lots. Les jours d'analyse, douze crevettes de chaque lot ont été conservées à -80°C. Les échantillons sont restés au maximum 2 semaines au congélateur avant les tests. Les 30 échantillons ont été analysés au cours de 6 séances, espacées d'une semaine, selon un plan de présentation équilibré en fonction des facteurs température, teneur en sel et jour d'analyse. La veille du test, les crevettes ont été mises à décongeler à 2°C (durée 20 h). Le matin, elles ont été réparties dans des pots en polystyrène parfaitement inodores munis d'un couvercle, à raison de 3 crevettes par pot qui ont ensuite été sentis par les 13 juges. Ceux-ci devaient classer les produits en trois classes : 1 : pas d'altération ; 2 : altération moyenne ; 3 : forte altération. Les résultats sont présentés sous forme de fréquences de citation, en %. A partir de ces données, un indice de qualité (IQ) a été calculé selon la méthode proposée par (Leroi *et al.*, 2001) en additionnant les pourcentages de chaque classe, après les avoir pondérés (équation 4)

$$(4) \text{ IQ} = [(1 \times \% \text{ class 1}) + (2 \times \% \text{ class 2}) + (3 \times \% \text{ class 3})] / 100$$

IQ varie de 1 à 3, 1 correspondant à 100% des juges ayant noté le produit en classe 1 et 3 à 100% des juges l'ayant noté en classe 3. Un indice supérieur à 2-2.5 indique que le produit est rejeté par le jury.

3 Résultats et Discussion

Le tableau 2 présente les valeurs mesurées des facteurs sel et nombre de *L. piscium* initial.

Tableau 2 : Niveaux des facteurs en valeurs réelles et normalisées

Sel (%)			Nombre de <i>L. piscium</i> initial (Log UFC/g)		
souhaité	mesuré	normalisé	souhaité	mesuré	normalisé
0.8	0.71 ± 0.01	-1	0	0	-1
1.4	0.85 ± 0.05	-0.61	3.5	4.0	+ 0.21
2.0	1.43 ± 0.03	+1	7.0	6.6	+1

Malgré les pré-essais qui ont été réalisés, toutes les valeurs de sel obtenues sont plus faibles que celles souhaitées, ceci montrant bien la difficulté d'organiser des expériences en matrice alimentaire. Compte tenu de la variabilité inhérente à la méthode de dénombrement sur boîte de Pétri (souvent considérée de 0.5 Log UFC/g) les niveaux d'inoculation initiale en *L. piscium* sont assez proches des valeurs cibles (tableau 2). Les propriétés mathématiques du plan d'expériences sont donc moins bonnes que celles qui auraient été obtenues avec les valeurs cibles souhaitées mais les données sont néanmoins traitables.

Le niveau d'inoculation initial de *B. thermosphacta* est de 1.6 Log UFC/g dans toutes les expériences.

Le tableau 3 présente les valeurs de λ , μ_{\max} et N_{\max} de *B. thermosphacta* et *L. piscium*, estimées par le modèle primaire de Rosso pour les 15 expériences.

Tableau 3 : valeurs de λ , μ_{\max} et N_{\max} de *B. thermosphacta* et *L. piscium*, estimées par le modèle primaire de Rosso (1995) pour les 15 expériences.

Essai	<i>Brochothrix thermosphacta</i>			<i>Lactococcus piscium</i>		
	μ_{\max} (j ⁻¹)	N_{\max} (Log UFC/g)	λ (j)	μ_{\max} (j ⁻¹)	N_{\max} (Log UFC/g)	λ (j)
1	1,24	9,02	0,64	0,00	0,00	0,00
2	1,31	8,72	0,66	0,00	0,00	0,00
3	3,81	8,88	0,38	0,00	0,00	0,00
4	3,88	8,73	0,52	0,00	0,00	0,00
5	0,86	3,34	0,74	5,82	8,92	0,74
6	0,81	4,73	0,15	0,83	8,64	0,56
7	1,15	4,25	0,00	4,69	8,73	0,00
8	2,61	4,98	0,64	3,33	8,70	0,53
9	3,90	6,43	0,86	3,56	8,76	0,54
10	2,97	6,44	0,52	2,87	8,73	0,54
11	3,02	6,48	0,70	3,02	8,92	0,69
12	1,43	6,60	0,29	1,39	9,05	0,27
13	1,31	6,91	0,77	1,03	9,02	0,93
14	4,48	6,38	0,54	4,53	9,01	0,39
15	4,85	6,93	0,71	4,22	8,61	0,92

3.1 Modélisation de l'effet de la température, du sel et du nombre initial de *L. piscium* sur la croissance de *B. thermosphacta*

La figure 1 montre les courbes de croissance de *B. thermosphacta* et *L. piscium* des trois expériences centrales 9, 10 et 11 (8°C, 0.85% sel et 4.0 Log UFC/g). Elle met en évidence la bonne répétabilité des expériences. Cependant, l'écart type du paramètre μ_{\max} estimé par le modèle de Rosso (tableau 3) est assez importante ($\mu_{\max} = 3.30 \pm 0.52$ j⁻¹ pour *B. thermosphacta*). Il faudra donc garder en mémoire qu'une légère fluctuation de μ_{\max} (0.5 j⁻¹) ne se traduit pas forcément par un comportement extrêmement différent. En revanche, l'écart type du temps de latence et du nombre maximum de cellule est très faible.

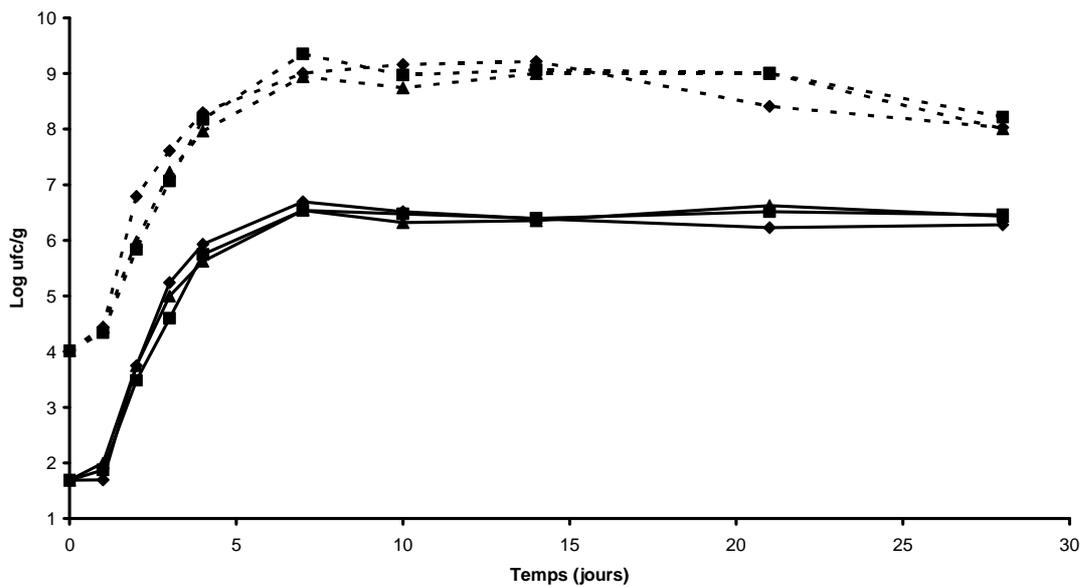


Figure 1 : Croissance de *B. thermosphacta* (traits pleins) et *L. piscium* (traits discontinus) co-inoculées dans des crevettes tropicales cuites décortiquées emballées sous atmosphère modifiée. Expériences 9 (losange), 10 (triangle) et 11(carré) à 8°C, 0,85 % NaCl et 4,0 Log UFC/g de *L. piscium*.

Les croissances des populations bactériennes de *B. thermosphacta* et *L. piscium* dans les différentes conditions du plan expérimental sont représentées dans la figure 2. Une première approche graphique montre que quelle que soit la température, le taux de sel et son niveau d'ensemencement initial, *L. piscium* finit toujours par atteindre un maximum de population d'environ 9 Log UFC/g, que ce soit en culture pure ou en co-inoculation avec *B. thermosphacta*. *B. thermosphacta* en culture pure atteint également toujours un maximum de population d'environ 9 Log UFC/g, mais plus ou moins vite selon la température (respectivement en 7 et 21 jours à 12°C et 4°C) quel que soit le taux de sel. Cependant la figure montre très clairement que la croissance de *B. thermosphacta* (notamment le nombre maximum de cellules), est inhibée par *L. piscium* et que cette inhibition est d'autant plus forte que le niveau d'inoculation de *L. piscium* est élevé. Le traitement statistique des données va nous permettre d'aller plus loin dans l'analyse des effets des facteurs sur la croissance de *B. thermosphacta*.

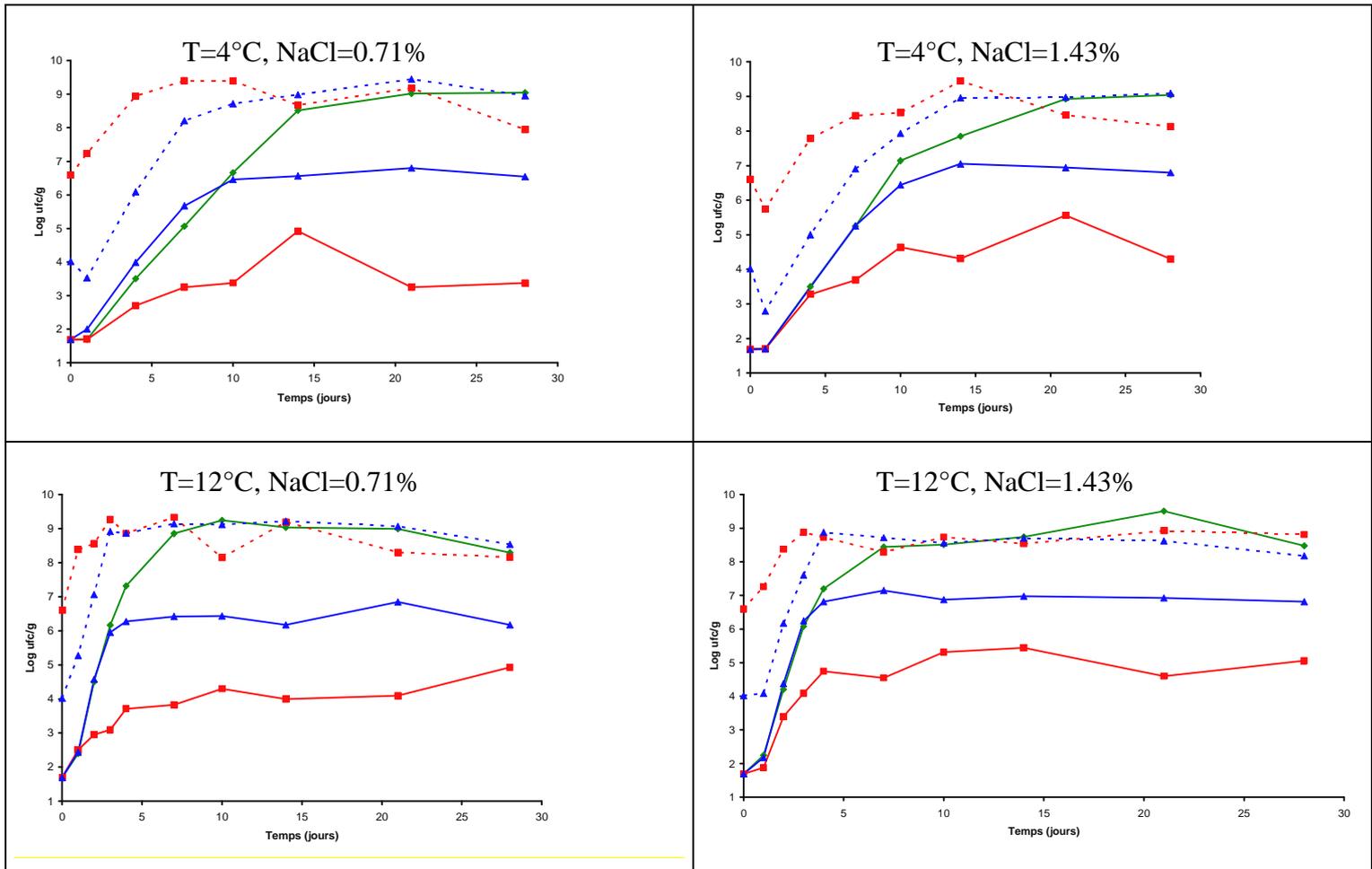


Figure 2 : Croissance de *B. thermosphacta* et *L. piscium* en culture pure ou en co-inoculation dans des crevettes tropicales cuites décortiquées emballées sous atmosphère modifiée. Trait pointillé : *L. piscium* (triangle $N_i=4.0$ UFC/g ; carré: $N_i=6.6$ Log UFC/g) ; trait plein : *B. thermosphacta* (Losange : N_i de *L. piscium* = 0 UFC/g ; triangle $N_i=4.0$ UFC/g ; carré: $N_i=6.6$ Log UFC/g)

3.2 Effet des facteurs sur le nombre maximum de *B. thermosphacta* (N_{max})

Les 8 coefficients du modèle (équation 3) ont été estimés par l'analyse des données des 15 expériences. L'analyse de variance montre que seuls le sel, le nombre initial de *L. piscium* ($\text{Log } N_i$), l'interaction entre le sel et $\text{Log } N_i$ ainsi que $(\text{Log } N_i)^2$ ont un effet significatif sur N_{max} , ($P < 0.05$) alors que la température n'a pas d'effet. Les coefficients du modèle en valeurs normalisées, recalculés avec ces 4 paramètres, sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Coefficients du modèle en valeurs normalisées et intervalle de confiance à 95%

Coefficient	Valeur estimée	Écart type	Valeur basse	Valeur haute
a0 (constante)	7.187	0.093	6.979	7.394
a2 (sel)	0.196	0.063	0.054	0.338
a3 (Log Ni)	-2.257	0.079	-2.434	-2.079
a23 (sel x Log Ni)	0.319	0.079	0.144	0.495
a33 (Log Ni) ²	-0.606	0.124	-0.885	-0.328

En valeurs réelles, le modèle s'écrit :

$$N_{\max} (\text{Log UFC/g}) = 9.20 - 0.34 \times (\text{NaCl}) - 0.60 \times (\text{Log Ni}) + 0.27 \times (\text{NaCl}) \times (\text{Log Ni}) - 0.05 \times (\text{Log Ni})^2$$

Le coefficient de détermination R^2 est de 98.8% et les valeurs prédites en fonctions des valeurs observées présentées dans la figure 3 témoignent de la bonne qualité d'ajustement du modèle.

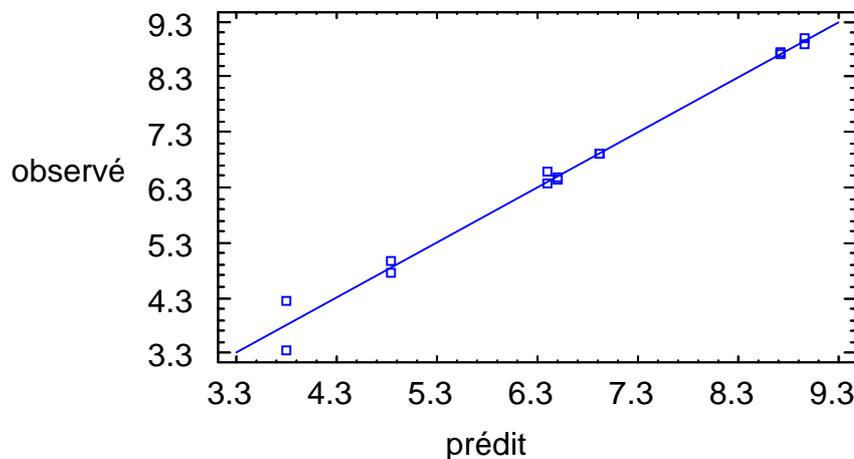


Figure 3 : Nombre maximum de *B. thermosphacta* (N_{\max}) prédit par le modèle en fonction de N_{\max} observé

La valeur moyenne N_{\max} (lorsque le sel et le Log Ni sont à leur valeur moyenne, soit respectivement 1.07 % et 3.3 Log UFC/g) est de 7.2 Log UFC/g, quelque que soit la température (tableau 4). Le niveau initial d'ensemencement en *L. piscium* est le facteur qui a le plus fort effet sur le nombre total de *B. thermosphacta* (tableau 4). Il a un effet linéaire négatif, qui permet d'abaisser N_{\max} de 4.5 Log UFC/g lorsque l'on passe du niveau -1 au

niveau +1 (respectivement 0 et 6.6 Log UFC/g). Cet effet est accentué par un effet quadratique négatif de -1.2. Bien que statistiquement significatif, l'effet du sel est beaucoup plus faible (+0.4), mais on note une légère interaction positive entre les deux facteurs, indiquant que l'effet inhibiteur de Log Ni est légèrement plus fort à faible concentration en sel. La figure 4 permet de bien visualiser l'effet des deux facteurs sur le nombre maximum de *B. thermosphacta*. Pour une valeur moyenne de 1% de sel, assez fréquemment rencontrée dans des crevettes commerciales, quelle que soit la température, le modèle prédit que le nombre final de *B. thermosphacta* atteindra respectivement 8.9, 7.3, 5.8 et 3.8 UFC/g avec un ensemencement initial de 0.0, 3.0, 5.0 et 7.0 Log UFC/g. Si l'on veut maintenir *B. thermosphacta* à un niveau inférieur à 4 Log UFC/g, limite qui semble a priori raisonnable pour garantir la qualité sensorielle du produit, il est donc impératif de travailler avec un inoculum fort en *L. piscium* (10^{6-7} UFC/g), et ce quelle que soit la température et la teneur en sel dans le produit.

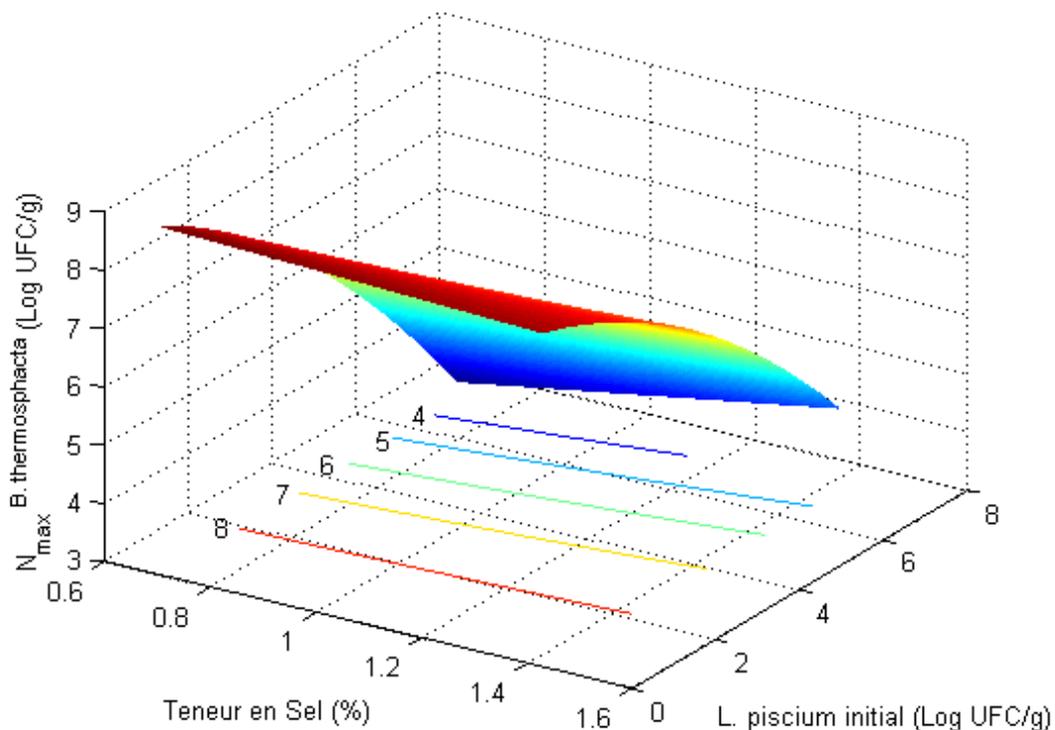


Figure 4 : Surface de réponse et courbe des isoréponses du nombre maximum de *B. thermosphacta* (N_{max}) en fonction de la concentration en sel et du nombre de *L. piscium* initial. La température n'a pas d'influence significative sur N_{max}

3.3 Effet des facteurs sur le taux maximum de croissance de *B. thermosphacta* (μ_{\max})

Concernant μ_{\max} , seuls, la température, le nombre initial de *L. piscium* et le carré de ce nombre ont un effet significatif ($P < 0.05$). Le tableau 5 présente les valeurs des coefficients du modèle estimées en ne gardant que ces trois facteurs ainsi que leur intervalle de confiance.

Tableau 5 : Coefficients du modèle en valeurs normalisées et intervalle de confiance à 95%

Coefficient	Valeur estimée	Écart type	Valeur basse	Valeur haute
a0 (constante)	3.335	0.258	2.766	3.903
a1 (température)	1.152	0.183	0.747	1.556
a3 (Log Ni)	-0.601	0.225	-1.097	-0.106
a33 (Log Ni) ²	-1.378	0.350	-2.147	-0.607

Le modèle prévisionnel de μ_{\max} en fonction des valeurs de la température et du Log (UFC/g) de *L. piscium* en valeurs réelles est :

$$\mu_{\max} (\text{h}^{-1}) = 0.255 + 0.288 \times (T^{\circ}) + 0.653 \times (\text{Log Ni}) - 0.127 \times (\text{Log Ni})^2$$

Le R^2 ajusté du modèle est de 80,1 %. Le graphique montre les valeurs prédites en fonction des valeurs observées (Figure 5), sur lequel on visualise bien l'écart entre les trois répétitions (9, 10, 11) et le fait que le modèle surestime la valeur prédite de μ_{\max} pour l'expérience 7 (12°C, 0.85 % sel, 6.6 Lof UFC/g de *L. piscium*).

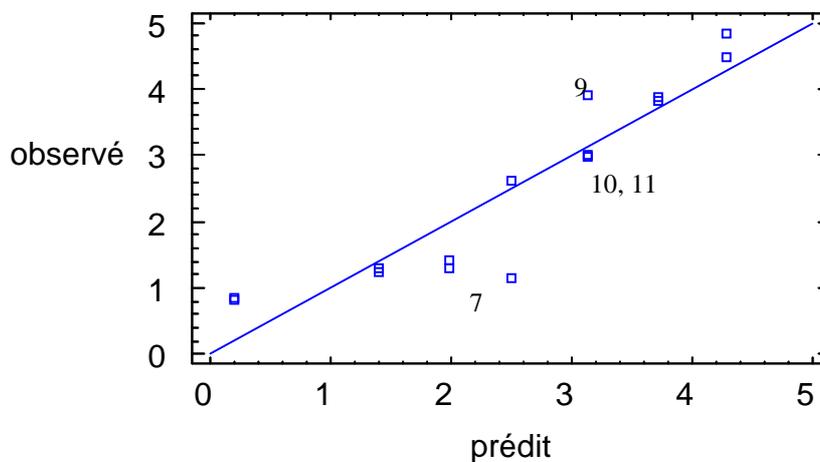


Figure 5 : Taux maximum de croissance (μ_{\max}) de *B. thermosphacta* prédit par le modèle en fonction de μ_{\max} observé.

La valeur moyenne de μ_{\max} (obtenue pour les valeurs centrales des deux facteurs, soit 8°C et 3.3 Log UFC/g de *L. piscium*) est de 3.33 j⁻¹ (tableau 5), ce qui correspond à un temps de génération de 5 h. La température a un fort effet linéaire positif sur μ_{\max} de *B. thermosphacta*. Lorsque l'on passe du niveau -1 au niveau +1, soit de 4 à 12°C, le μ_{\max} est quasiment doublé ; il passe de 2.18 à 4.48 j⁻¹, soit respectivement de 7.6 h à 3.7 h pour le temps de génération. Le nombre initial de *L. piscium* a un effet linéaire et quadratique négatif que l'on peut visualiser sur la figure 6 qui présente l'évolution de μ_{\max} en fonction de la température et du nombre initial de *L. piscium*, quelle que soit la valeur de sel (dans le domaine 0.71 – 1.43 %). Le graphique montre clairement que le taux maximum de croissance de *B. thermosphacta* est ralenti uniquement en présence d'une très forte concentration initiale en *L. piscium* (supérieure à 6.5 Log UFC/g). Par exemple, si les crevettes sont conservées à des températures abusives de 8°C, les valeurs de μ_{\max} prédites sont 2.55, 2.65 et 1.35 j⁻¹ avec respectivement 0.0, 5.0 et 6.6 Log UFC/g de *L. piscium*. Il faut noter que μ_{\max} est légèrement augmenté en présence d'une faible concentration en *L. piscium* par rapport à une croissance sans *L. piscium*, comme s'il y avait un léger effet bénéfique pour *B. thermosphacta* de la présence de *L. piscium* en faible quantité. Cependant cet effet est faible ($\mu_{\max} = 3.3$ j⁻¹ avec Log Ni = 3.0 UFC/g) et à relativiser vue l'ajustement du modèle pour les trois répétitions du point central.

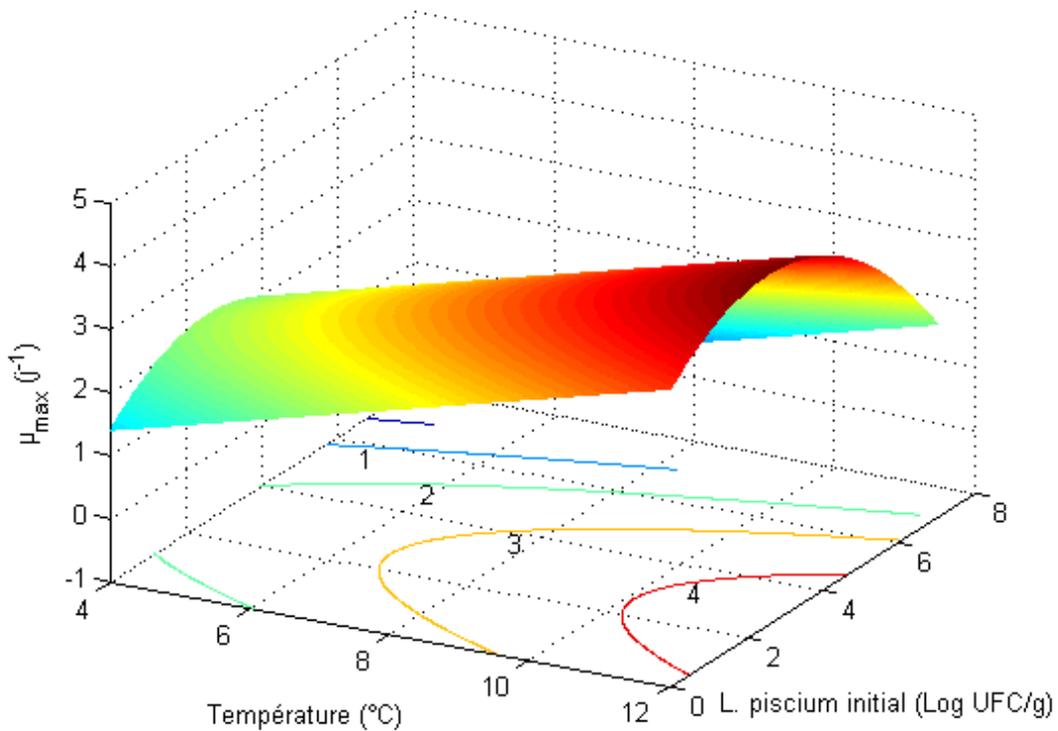


Figure 6 : Surface de réponse et courbe des isoréponses du taux de croissance maximum de *B. thermosphacta* (μ_{\max}) en fonction de la température et du nombre de *L. piscium* initial. Le sel n'a pas d'influence significative sur μ_{\max}

3.4 Effet des facteurs sur le temps de latence de *B. thermosphacta*

L'analyse des données montre qu'aucun des facteurs n'a d'influence sur le temps de latence, dont la moyenne est de 0.55 jours.

3.5 Effet des facteurs sur la croissance de *B. thermosphacta* en fonction du temps

Chaque module prévisionnel précédemment déterminé est réintégré dans le modèle primaire de Rosso (équation 2) afin de modéliser la croissance de *B. thermosphacta* en fonction du temps. Les valeurs observées et les valeurs prédites pour les 15 expériences sont présentées en figure 7. Le R^2 est de 93.8 % et l'erreur type (RMSE) est de 0.55 Log UFC/g. L'erreur type traduit la différence moyenne entre le nombre de *B. thermosphacta* prédit par le modèle et le nombre observé. Le RMSE témoigne d'une bonne qualité globale d'ajustement puisque l'erreur communément admise en microbiologie est de 0.5 Log UFC/g. Cependant, on voit

nettement que pour des températures de 4°C et un nombre initial de *L. piscium* fort, la qualité du modèle prédictif est médiocre (figure 7). Si la valeur finale est correcte, en revanche le modèle sous estime le μ_{\max} de *B. thermosphacta* : il prédit que le N_{\max} sera atteint au bout de 30 jours alors qu'il l'est dès 10 jours.

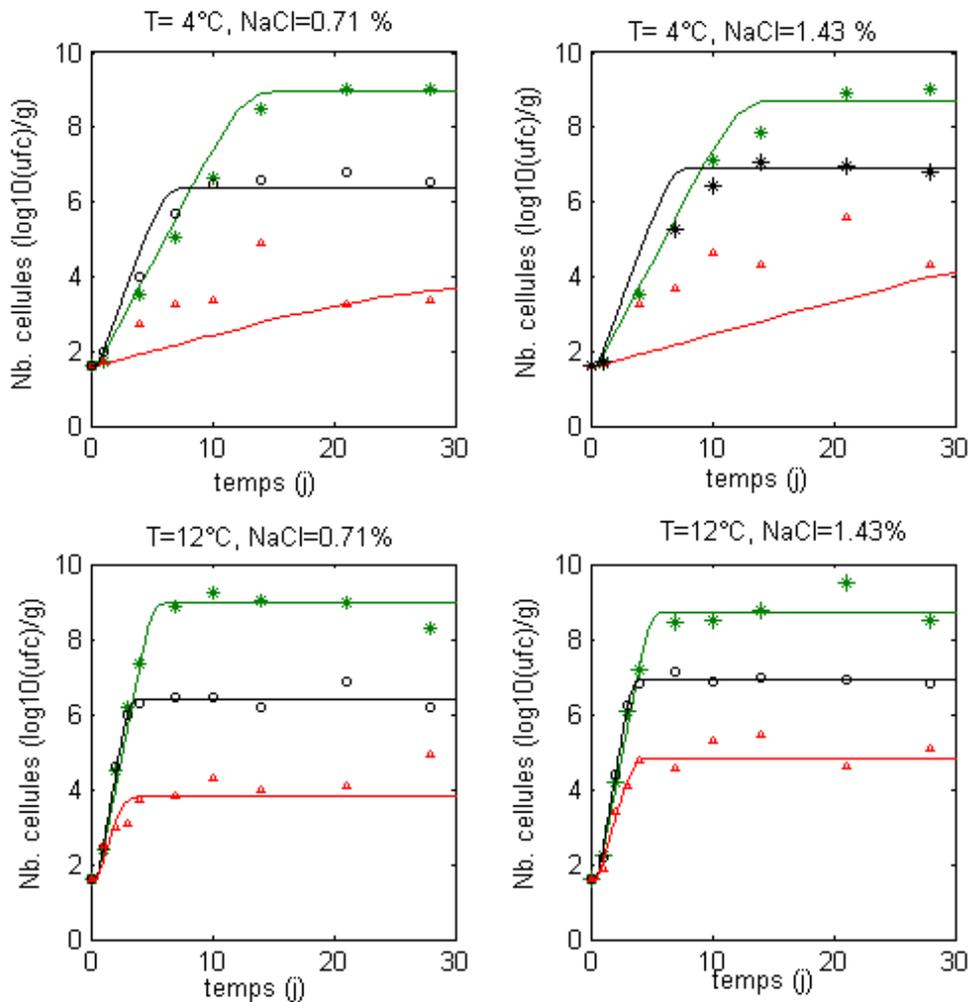


Figure 7 : Courbes de croissance de *B. thermosphacta* en crevettes tropicales cuites décortiquées et emballées sous atmosphère modifiée dans les différentes conditions de sel, température et nombre de *L. piscium* initial. Vert : pas de *L. piscium* ; noir : *L. piscium* initial = 4.0 Log UFC/g ; rouge : *L. piscium* initial = 6.6 Log UFC/g. Traits pleins : valeurs prédites par le modèle. Signes : valeurs observées

Si l'on regarde les courbes de croissance de *B. thermosphacta* et celles de *L. piscium* (figure 2), on se rend compte que dans la plupart des cas, la croissance de *B. thermosphacta* s'arrête lorsque la bactérie lactique a atteint son maximum et que l'effet sur le μ_{\max} est assez faible.

Ceci confirme les travaux de Jameson (1962) qui a montré que la croissance de Salmonelles en matrice alimentaire s'arrêtait lorsque la population microbienne totale avait atteint son maximum. Cet effet, appelé couramment "effet Jameson" a été rapporté depuis pour *Staphylococcus aureus* dans les produits de la mer (Ross et McMeekin, 1991) et pour *L. monocytogenes* dans le saumon fumé (Gimenez et Dalgaard, 2004). La formulation de cet effet est maintenant utilisée dans les modèles prévisionnels de croissance de certaines bactéries, notamment *L. monocytogenes* en présence de bactéries lactiques (Mejlholm et Dalgaard, 2007) et intégrée dans des modèles gratuits sur Internet (Seafood Spoilage and Safety Predictor V. 3.1, <http://sssp.dtuqua.dk>). Cependant, nous avons montré qu'à forte concentration initiale en bactéries lactiques, ce qui est le cas lorsque l'on utilise des bactéries dans un but de bioprotection, *L. piscium* ralentit également μ_{\max} , ce qui n'est pas pris en compte dans les modèles couramment utilisés.

3.6 Effet des facteurs sur l'indice de qualité des échantillons contaminés par *B. thermosphacta*

Pour les poissons frais conservés sous air, on constate souvent une relation linéaire entre le nombre de microorganismes spécifiquement responsables de l'altération et la notation sensorielle. En général, le produit est altéré lorsque ce nombre atteint 10^8 UFC/g (Jorgensen *et al.*, 1988). Pour les produits légèrement préservés dans lesquels plusieurs espèces bactériennes participent souvent à l'altération, il n'y a pas vraiment de limites connues (Leroi *et al.*, 1998; Leroi *et al.*, 2001). La DLC étant beaucoup plus longue que pour un produit frais, on peut raisonnablement penser qu'il y a un effet d'accumulation des molécules chimiques responsables des mauvaises odeurs au cours de la conservation et qu'un nombre inférieur de bactéries d'altération présentes pendant une longue durée (10 à 28 jours) pourrait entraîner l'altération du produit. Pour cette raison, il nous a paru intéressant de modéliser non plus la croissance de *B. thermosphacta* mais directement la note d'altération sensorielle du produit. Le facteur temps a donc été ajouté comme variable, son domaine d'étude étant entre 7 et 28 jours.

Le traitement statistique des données effectué sur les 30 points d'analyses montre que seuls le temps, le nombre initial de *L. piscium* et le carré de ce nombre ont un effet significatif sur l'indice de qualité. En valeurs réelles, le modèle est le suivant :

$$IQ = 2.122 + 0.014 \times (\text{temps en jour}) - 0.244 \times (\text{Log Ni}) + 0.018 \times (\text{Log Ni})^2$$

La figure 8 représente l'évolution de l'indice de qualité en fonction de ces deux paramètres.

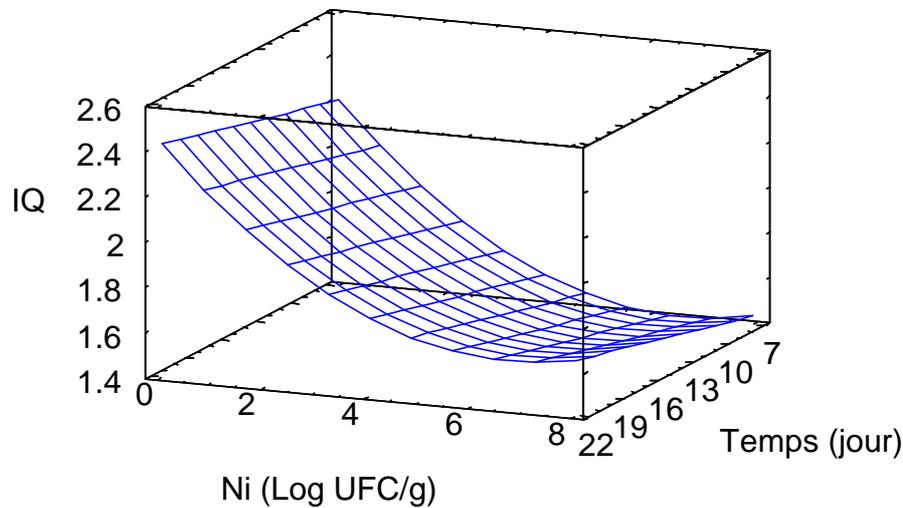


Figure 8 : Surface de réponse de l'indice de qualité estimé par le jury d'analyse sensorielle en fonction du nombre initial de *L. piscium* et du temps

On visualise très clairement que c'est principalement l'effet du nombre de *L. piscium* initial qui joue sur la qualité du produit. En l'absence de *L. piscium*, IQ prédit par le modèle est de 2.2 et 2.4 à respectivement 7 et 21 jours, c'est à dire que l'échantillon est considéré comme altéré dès 7 jours puis n'évolue plus beaucoup. Si le nombre de *L. piscium* initial est de 3 Log UFC/g, IQ vaut 1.5 et 1.7 à 7 et 21 jours respectivement, et 1.4 et 1.6 pour un niveau d'ensemencement de 6 Log UFC/g et les échantillons sont donc jugés comme non ou très faiblement altérés. Ces résultats montrent qu'il n'est pas nécessaire d'inoculer le produit avec une très forte concentration en flore bioprotectrice pour garantir la qualité sensorielle du produit pendant au moins 28 jours. Pourtant le nombre de *B. thermosphacta*, lui, peut atteindre assez rapidement une forte concentration (7.5 Log UFC/g pour un ensemencement initial de 3 Log UFC/g de *L. piscium*).

Ces résultats sont également illustrés par le modèle prédictif d'IQ en fonction du nombre de *B. thermosphacta*. La Figure 9 montre que les échantillons sont altérés ($IQ > 2$) uniquement lorsque *B. thermosphacta* atteint au moins 9 Log UFC/g. On peut constater sur la figure 9 que c'est le cas uniquement pour les échantillons qui n'ont pas été inoculés avec *L. piscium*. Tous ceux qui ont été ensemencés avec la souche bioprotectrice ont été perçus comme non ou

faiblement altérés par le jury. On peut alors émettre deux hypothèses : soit l'altération des crevettes n'est détectée par le jury que lorsque *B. thermosphacta* atteint un nombre très important (9 Log UFC/g), soit c'est la présence elle-même de *L. piscium* qui empêche l'émission de mauvaises odeurs, en modifiant le métabolisme de *B. thermosphacta* ou par des phénomènes de métabiose. Il est en effet assez exceptionnel qu'une bactérie reconnue comme altérante dans un produit n'entraîne pas de dégradation sensorielle pendant 4 semaines de conservation même lorsqu'elle atteint des niveaux de 7 Log UFC/g dès 7 jours (figure 2).

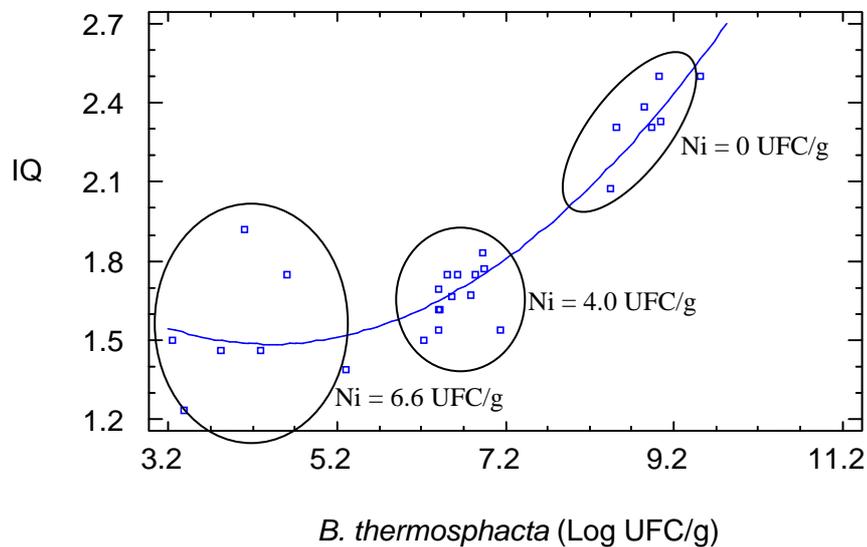


Figure 9 : Indice de qualité estimé par le jury d'analyse sensorielle en fonction du nombre initial de *B. thermosphacta*

En conclusion, l'interaction entre *L. piscium* et *B. thermosphacta* dépend essentiellement du nombre initial de *L. piscium*. Plus celui-ci augmente, plus le taux de croissance et le nombre maximum de *B. thermosphacta* diminuent. La température intervient également mais uniquement sur le taux de croissance, avec un ralentissement du développement de *B. thermosphacta* en présence de *L. piscium* d'autant plus fort qu'on travaille à 4°C. Le sel lui n'a d'incidence que sur le nombre final de *B. thermosphacta* et dans une faible mesure. L'effet inhibiteur de *L. piscium* est plus marqué à faible concentration en sel.

Afin de limiter le nombre final de *B. thermosphacta* à 4 Log UFC/g, l'inoculum de départ doit être au moins de 7 Log UFC/g. En revanche, un inoculum plus faible (3 Log UFC/g) permet de garantir la qualité sensorielle pendant au moins 28 jours. Ceci pose la question du

mécanisme intrinsèque de l'amélioration de la qualité des crevettes par le ferment bioprotecteur. L'inhibition du nombre de bactéries altérantes n'est sans doute pas le seul élément qui permet garantir la qualité. Il est possible que l'association des deux bactéries dégrade ou génère des composés volatils nouveaux modifiant les odeurs du produit. Ce type d'effet a déjà été montré par Joffraud *et al.* (2006). Actuellement, la plupart des méthodes de screening de bactéries bioprotectrices sont basées sur des tests d'inhibitions bactériennes. Nos résultats montrent que ce type de screening est sans doute réducteur et que des tests miniaturisés, basés sur l'amélioration sensorielle des produits, pourraient permettre de trouver de nouvelles souches originales.

Chapitre III

Inhibition de *Listeria monocytogenes* et interactions bactériennes

3-1 Effet protecteur d'une souche non productrice de bactériocine contre *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale cuite décortiquée et stérile.

Publication : Fall, P.A., Leroi, F., Chevalier, F., Guérin, C., Pilet, M.F., 2010. Journal of Aquatic Food Product Technology 19, 84 - 92.

3-2 Nature et élucidation des interactions entre *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 et *Listeria monocytogenes*

3-1 Effet protecteur d'une souche non productrice de bactériocine contre *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale cuite décortiquée et stérile.

Publication : Fall, P.A., Leroi, F., Chevalier, F., Guérin, C., Pilet, M.F., 2010. Journal of Aquatic Food Product Technology 19, 84 - 92.

Introduction

Les produits de la mer prêts à consommer, et particulièrement la crevette cuite décortiquée sont très prisés par les consommateurs européens. Cependant, comme toutes les denrées prêtes à consommer ce produit reste très exposé à la présence et au développement de *L. monocytogenes* comme cela a été montré dans les études de Gudmundsdóttir *et al.* (2006) et Valdimarsson *et al.* (1998), alertant ainsi sur les risques sanitaires liés à la consommation de tels produits par les populations à risque. La présence de cette bactérie dans les crevettes cuites est souvent le fait d'une recontamination lors du procédé de fabrication liée au non respect des conditions d'hygiène dans la chaîne de transformation. Pour lutter contre le développement de cette flore pathogène dans la crevette décortiquée pendant sa durée de vie (10 à 12 jours en conditions réfrigérées), le stockage à basse température, le conditionnement sous atmosphère modifiée riche en CO₂, le salage (moins de 1%), et dans certains cas l'utilisation d'additifs conservateurs (sorbate) sont les principales barrières utilisées. Néanmoins, ces techniques restent peu efficaces sur *L. monocytogenes*, qui montre des capacités d'adaptation surprenante dans ces conditions. Ainsi la recherche d'une technologie de barrière additionnelle contre les flores pathogènes en général a conduit à l'utilisation de la biopréservation pour ces produits. Plusieurs études ont montré l'efficacité de bactéries lactiques productrices de bactériocine pour lutter contre *L. monocytogenes* (Brillet *et al.*, 2005; Duffes *et al.*, 1999). La plupart de ces bactéries lactiques agissent par production d'une ou plusieurs bactériocines qui est nécessaire à l'activité inhibitrice des souches (Richard *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2003). Des bactéries lactiques non productrices de bactériocines ont également montré des capacités d'inhibition. Ainsi, Nilsson *et al.* (1999) ont démontré l'efficacité de *C. maltaromaticum* (ex *piscicola*), souche non productrice de bactériocine contre *L. monocytogenes* dans du saumon fumé. Matamoros *et al.* (2009a) ont également mis en évidence la capacité de la souche de *L. piscium* CNCM I-4031 à limiter la croissance de *L. monocytogenes* sur des crevettes cuites décortiquées naturellement contaminées, sans produire de bactériocine. Contrairement aux souches de *Carnobacterium* précédemment étudiées dont l'activité inhibitrice était ciblée sur *L. monocytogenes*, l'intérêt de cette souche de *Lactococcus* est sa capacité à inhiber à la fois des flores d'altération, comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, et cette bactérie pathogène.

Dans cette première partie la souche de *L. piscium* CNCM I-4031 étudiée précédemment pour son activité antimicrobienne contre *B. thermosphacta* sans production de bactériocine a été testée contre *L. monocytogenes* sur crevette décortiquée cuite, stérile. L'objectif était de

confirmer l'activité spécifique de *L. piscium* contre *L. monocytogenes*, sur matrice dépourvue de flores annexes en vue de son application comme agent bioprotecteur dans cette matrice. Pour ce faire, les crevettes ont été stérilisées par ionisation puis les deux souchesensemencées à 10^7 UFC/g (*L. piscium*) et 10^4 UFC/g (*L. monocytogenes*) en cultures pures et en culture mixte. Le produit a été conditionné sous atmosphère protectrice (50% N₂ – 50% CO₂) et stocké à 8°C pendant 31 jours. Parallèlement au suivi de croissance de ces deux micro-organismes, les paramètres physico-chimiques (pH, production acide, consommation de glucose) pouvant être liés à l'inhibition de la souche cible par la souche protectrice ont été déterminés.

Principaux résultats

L. piscium a montré une croissance similaire à celle observée dans le chapitre 1 sur matrice crevette cuite. *L. monocytogenes* s'est révélée être une bactérie très adaptée à la matrice crevette avec une population maximale de 9 log UFC/g après 14 jours d'incubation. Cette bonne implantation de *L. monocytogenes*, montre qu'il existe un risque potentiel si des produits présentant une contamination initiale sont consommés après une mauvaise maîtrise des températures de stockage. Cependant, en co-culture, la souche de *L. piscium* a confirmé son potentiel bioprotecteur en inhibant la croissance de *L. monocytogenes* de 3,4 log UFC/g à partir de 10 jours d'incubation et jusqu'à la fin de l'entreposage à 8°C. Une baisse du pH de 6,6 à 5,9 ainsi qu'une production d'acide lactique ont été observées dans tous les lots. Cette baisse s'est produite au cours des trois premiers jours de stockage dans le lot inoculé avec *L. piscium*, alors qu'elle arrive plus tard dans les autres lots. La production d'acide lactique maximale est proche de 50 mM (4,5 g/l) dans les échantillons inoculés avec *L. monocytogenes* ou *L. piscium* seuls. Dans les échantillons où les deux bactéries sont ajoutées, cette production maximale atteint environ 90 mM (8,1 g/l). Dans le but de déterminer si le pH et l'acide lactique produit suffisent à expliquer l'inhibition, le logiciel Seafood Spoilage Safety Program Predictor (Dalgaard *et al.*, 2002), a été utilisé pour simuler la croissance de *L. monocytogenes* en matrice crevette avec les paramètres suivant : température de 8°C, 45% de CO₂, pH 5,9 et 89,9 mM d'acide lactique. Aucune inhibition de *L. monocytogenes* n'est prédite dans ces conditions ce qui suggère que la production d'acide lactique combinée à la baisse de pH n'expliquent pas à eux seuls l'inhibition de *L. monocytogenes* dans cette étude. En revanche la rapide consommation du glucose observée dans le lot inoculé par *L. piscium* pourrait expliquer en partie cette inhibition.

Afin d'élucider les mécanismes d'action de cette inhibition, un milieu chimiquement défini a été mis au point pour reproduire l'inhibition observée entre ces deux bactéries sur matrice crevette et tester l'hypothèse d'une compétition nutritionnelle. Ce travail est présenté dans la partie 3-2.

This article was downloaded by: [PILET, Marie-France]

On: 17 June 2010

Access details: Access Details: [subscription number 923126730]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Aquatic Food Product Technology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t792303960>

Protective Effect of a Non-Bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 Strain Against *Listeria monocytogenes* in Sterilized Tropical Cooked Peeled Shrimp

Papa Abdoulaye Fall^a; Françoise Leroi^a; Frédérique Chevalier^a; Camille Guérin^a; Marie-France Pilet^{ab}

^a Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, Ifremer, Nantes, France ^b UMR INRA 1014 Secalim ONIRIS, Nantes, France

Online publication date: 16 June 2010

To cite this Article Fall, Papa Abdoulaye , Leroi, Françoise , Chevalier, Frédérique , Guérin, Camille and Pilet, Marie-France(2010) 'Protective Effect of a Non-Bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 Strain Against *Listeria monocytogenes* in Sterilized Tropical Cooked Peeled Shrimp', *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 19: 2, 84 – 92

To link to this Article: DOI: 10.1080/10498850.2010.486910

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10498850.2010.486910>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Protective Effect of a Non-Bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 Strain Against *Listeria monocytogenes* in Sterilized Tropical Cooked Peeled Shrimp

PAPA ABDOULAYE FALL,¹ FRANÇOISE LEROI,¹
FRÉDÉRIQUE CHEVALIER,¹ CAMILLE GUÉRIN,¹
AND MARIE-FRANCE PILET^{1,2}

¹Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, Ifremer, Nantes, France

²UMR INRA 1014 Secalim ONIRIS, Nantes, France

The protective activity of a non-bacteriocinogenic Lactococcus piscium CNCM I-4031 strain against Listeria monocytogenes was investigated in tropical cooked peeled shrimp stored at 8°C in modified atmosphere packaging (50% N₂-50% CO₂). When inoculated alone (L. piscium 10⁷ CFU g⁻¹ and L. monocytogenes 10⁸ CFU g⁻¹), protective culture and target strain grew very well on shrimp reaching a maximum cell number of 10⁹ CFU g⁻¹ after 7 and 14 days, respectively. In the presence of L. piscium, growth of L. monocytogenes was totally prevented after 3 days of storage. The count was 3.4 log CFU g⁻¹ lower than in the control after 10 days and until the end of storage (31 days). Using the Seafood Spoilage and Safety Predictor Software (<http://sssp.dtuqua.dk>), it was shown that pH decrease from 6.58 to 5.94 and lactic acid concentration of 89.65 mM measured in the co-inoculated batch did not fully explain the inhibition observed.

Keywords inhibition, biopreservation, challenge-test, lactic acid, nutritional competition

Introduction

Shrimp is one of the most marketed seafood products in the world. In France, shrimp is the second most imported seafood (after salmon) with 105,300 tons and 536 million euros in value during 2008 (http://www.ofimer.fr/Pages/filiere/bilans_annuels_ofimer). Convenience preparation such as cooked and peeled shrimp packed under modified atmosphere is gaining more and more importance in Europe. These products are very sensitive to microbial growth due to their neutral pH, weak salinity, and presence of nitrogenous compounds with weak molecular weight. Growth of pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes* constitutes a major problem in such refrigerated ready-to-eat (RTE) food products. *L. monocytogenes* is a human pathogenic bacteria that is responsible for foodborne listeriosis generally associated with a high mortality rate: 20–40% among the high risk group of people (pregnant women, immuno-compromised patients, etc.). The presence of *L. monocytogenes* was detected in 26.5% of cooked peeled shrimp analyzed by Valdimarsson et al. (1998) and in 11.2% of semi-final products according to the survey

Address correspondence to Marie-France Pilet, ONIRIS, UMR INRA 1014 Secalim, Rue de la Géraudière, BP 82225, F-44322 Nantes, France. E-mail: marie-france.pilet@oniris-nantes.fr

of Gudmundsdottir et al. (2006), confirming the safety risk when good hygienic practices are not respected. Growth of this undesirable bacteria is usually delayed, but not totally stopped, by the use of classical techniques such as salting, low storage temperature, or modification of the atmosphere packaging (Rutherford et al., 2007; Tsigarida et al., 2000). Preservatives—mainly organic acids that are not always well-accepted by the consumer—are often added with more or less success (Heavin et al., 2009; Mejlholm and Dalgaard, 2002; Tokarskyy and Marshall, 2008; Mejlholm et al., 2008). All of these results pointed out that *L. monocytogenes* can constitute a major safety risk for consumers in such products.

Therefore, the research of new natural hurdles which limit the growth of pathogenic bacteria in shrimp is important. Biopreservation—a technology consisting of using protective living microorganisms to inhibit the growth of pathogenic and spoiling bacteria—has gained increasing attention to ensure the safety of RTE food. Many studies reported the usefulness of some bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) to limit the growth of *L. monocytogenes* in seafood, especially in cold-smoked salmon (Brillet et al., 2004; Tomé et al., 2008; Vescovo et al., 2006; Weiss and Hammes, 2006). However, the Quality Presumption of Safety status that is a required measure for a food application in Europe may be more difficult to obtain for bacteriocinogenic bacteria, enhancing the interest for protective cultures that do not produce bacteriocin-like compounds. Selection of such bacteria that inhibit *L. monocytogenes* without changing the delicate flavor of shrimp is still a challenge and has so far been explored only in a few studies (Nilsson et al., 1999, 2005; Yamazaki et al., 2003).

In a recent study, a strain of *Lactococcus piscium* has been isolated from raw salmon and has shown capacities to enhance the sensory shelf-life of naturally contaminated cooked/peeled shrimps and cold-smoked salmon (Matamoros et al., 2009a). This strain also showed inhibition of *L. monocytogenes* without bacteriocin production. The aim of this study was to confirm the specific antimicrobial activity of this strain against *L. monocytogenes* in tropical shrimp packed under modified atmosphere and to investigate the inhibitory mechanisms that could be involved in this inhibition. For that purpose, a sterilized shrimp model was used to avoid the background flora. Physicochemical parameters related to the growth of the protective and the target strains were also determined in order to tentatively explain the inhibition.

Materials and Methods

Strains and Culture Conditions

The strains of *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 (formerly, *Lactococcus piscium* EU2241) and *Listeria monocytogenes* RF191 used in this study were isolated from fresh salmon steak packed under modified atmosphere (Matamoros et al., 2009b) and from tropical cooked peeled shrimp, respectively (CEVPM, Boulogne-sur-mer, France). Bacterial strains were stored at -80°C in their growth medium containing 10% glycerol. For challenge tests, *L. monocytogenes* RF191 and *L. piscium* CNCM I-4031 were subcultured twice successively in Brain Heart Infusion and Elliker broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), respectively, for 24 h at 26°C . Cultures were then diluted in physiological solution (0.85% NaCl, 0.1% peptone) to obtain appropriate cell concentrations.

Shrimp Preparation

Farmed tropical shrimp (*Penaeus vannamei*) from Colombia were supplied by MITI (Nantes, France) in frozen, beheaded, and peeled conditions, without sulphite added. They

were cooked in our laboratory at 100°C for 2.5 min in 3% salted water. After cooking, shrimp were immediately immersed in melting ice and frozen at -80°C. They were transported to IONISOS (Pouzauges, France) for ionization at 3.75 kGy, under frozen conditions (-80°C).

Challenge Tests

Cooked shrimp were inoculated at 10% (v/w) by spraying diluted cultures to obtain an estimated final level of 7 log CFU g⁻¹ and 4 log CFU g⁻¹ for *L. piscium* and *L. monocytogenes*, respectively.

Four batches were prepared: (1) sterility control; (2) inoculation with *L. piscium* CNCM I-4031; (3) inoculation with *L. monocytogenes* RF191; and (4) co-inoculation with *L. piscium* + *L. monocytogenes*. After inoculation, portions of 125 g of shrimp were packed in punnets under modified atmosphere 50% N₂-50% CO₂ (Multivac T250, Wolfertschwenden, Germany) with a ratio shrimp:gas of approximately 2:1. The samples were stored at 8°C for 31 days and regularly sampled for microbiological and physicochemical analyses. All the analyses were done in triplicate.

Microbial Enumeration

Each day of analysis, three punnets per batch were opened, and 20 g of shrimp were mixed with 80 mL of physiological solution in sterile plastic bags and blended with a stomacher 400 (Seward Medical, London, UK) for 2 min. Total microbial flora was determined in uninoculated batch by pour plating (26°C, 48–72 h) on Plate Count Agar (Biokar Diagnostics). *L. piscium* was enumerated by spread plating onto Elliker agar plates incubated at 26°C for 48 h under anaerobiosis for batch 2 and at 8°C for 7 days for batch 4. *L. monocytogenes* was enumerated on spread plate of Palcam with selective supplement (Biokar Diagnostics) after 24 h at 37°C.

Physicochemical Parameters

The pH was measured immediately after microbiological analyses into the stomacher bag by immersing the electrode of the pH-meter (Mettler Delta 320, Halstead, UK). L-lactic and acetic acid determination was performed using enzymatic kits with NADH₂ detection at 340 nm (acetic acid 021 and L-lactic acid kit 022, Biosentec, Toulouse, France). D-lactic acid was not monitored as we had previously confirmed that *L. piscium* and *L. monocytogenes* did not produce this isoform. Fifty grams of flesh per punnet were homogenized in a Waring Blender (Waring, New Hartford, CT, USA), and 3 g of homogenate were mixed with 20 mL of water. The mixture was centrifuged at 10000 g for 10 min. The supernatant was transferred into a new tube and used as sample solution in the assays by following the instruction of the enzymatic test kit supplier. Sugar content was measured by a modified colorimetric method of Dubois et al. (1956). The nature of the sugar was identified by gas chromatography using the method of Kamerling et al. (1975), modified by Montreuil et al. (1986). The injection of compounds derived from glycoside residues was performed on an AT 6890N chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an automatic sample loader, a Factorfour capillary column VF-1MS (Varian Inc., Lake Forest, CA, USA) with helium as carrier gas and a flame ionization detector. The temperature profile was programmed as follows: 50°C for 1 min, from 50°C to 120°C at 20°C min⁻¹, from 120°C to 240°C at 2°C min⁻¹, from 240°C to 280°C at 10°C min⁻¹, and 280°C for

10 min. Prior to inoculation, shrimp characteristics (pH, water phase salt content, proteins, lipids, and dry matter) were analyzed in triplicate from 125 g of crushed flesh. For water content, 8 g of sample were dried at 105°C overnight. The Kjeldahl method (Crooke and Simpson, 1971) was used to determine total proteins. Salt content in shrimp meat was determined using a chlorine analyser (Sherwood MK II analyser 926, Grosseron, Nantes, France). Total fat content was extracted by using the Folch method (Folch et al., 1957).

Listeria monocytogenes Growth Prediction

The Seafood Spoilage and Safety Predictor software V3.1 (SSSP V. 3.1) proposed by Mejlholm and Dalgaard (2007b) and developed to predict the growth of *L. monocytogenes* in seafood product was used (<http://sssp.dtuqua.dk>, retrieved September 3, 2009). This software takes into account different product characteristics such as pH; water phase NaCl; lactic, acetic/diacetate, benzoic, citric, and sorbic acids; phenolique content; storage temperature; % CO₂ in headspace gas at equilibrium; and naturally occurring lactic acid bacterial count.

Results and Discussion

After cooking, shrimp were composed of $73 \pm 0.5\%$ of water, $22.1 \pm 0.0\%$ of proteins, $0.49 \pm 0.0\%$ of total lipid, $0.47 \pm 0.04\%$ of glucose, and $1.24 \pm 0.02\%$ of NaCl, and had an initial pH of 6.54 ± 0.02 . In uninoculated batches, no colony was detected on the Petri dishes within the 31 days of storage, showing that the ionisation method allowed a good decontamination (detection threshold: 5 CFU g⁻¹). Ionization at low level (2–4 kGy) under frozen conditions to avoid lipid oxidation has already been used to obtain sterile cold-smoked salmon small blocks for bacterial interactions studies (Brillet et al., 2004; Joffraud et al., 2006). Figure 1 shows the growth of *L. piscium* and *L. monocytogenes* in inoculated batches. *L. piscium* increased from 7.0 ± 0.2 log CFU g⁻¹ to 9.1 ± 0.1 log CFU g⁻¹ in 7 days and remained at its maximum level during the entire storage period. *L. monocytogenes* was inoculated at 3.8 ± 0.1 log CFU g⁻¹ and reached 9.2 log CFU g⁻¹ after 14 days. For both bacteria, no lag phase was observed. These results demonstrated the adaptation of *L. piscium* CNCM I-4031 and *L. monocytogenes* RF191 to the shrimp matrix. A rapid growth of *L. monocytogenes* at 8°C has also been observed by Matamoros et al. (2009a) in vacuum-packed cooked shrimp and in the same products stored at 8°C under modified atmosphere containing 50% CO₂, 30% N₂, and 20% O₂ (Mejlholm et al., 2005). In the presence of *L. piscium* CNCM I-4031, *L. monocytogenes* count increased by approximately 1 log during the first 4 days, but then growth was totally stopped. The population was reduced by 3.4 ± 0.2 log CFU g⁻¹ compared to the control after 10 days of storage, and this reduction lasted for 31 days (Figure 1). Considering the fact that the natural initial contamination levels of *L. monocytogenes* in shrimp are generally very low (< 1 CFU g⁻¹; Paranjpye et al., 2008), the protective effect of *L. piscium* CNCM I-4031 demonstrated in this study could be very promising to ensure the safety of RTE shrimp toward *L. monocytogenes* risk. Many studies failed to correctly prevent growth of *L. monocytogenes* in food products by using preservatives or non-bacteriocin producing LAB. Richard et al. (2003) failed to prevent growth of *L. monocytogenes* with a non-bacteriocin mutant of *C. divergens* V41. Yamazaki et al. (2003) also failed to prevent growth of *L. monocytogenes* at 12°C and 20°C in cold-smoked salmon by using a non-bacteriocinogenic *C. piscicola* JCM 5348. Paranjpye et al. (2008) demonstrated that ozone and chlorine dioxide were not efficient to inhibit the growth of *L. monocytogenes* in cooked peeled cold-water shrimp.

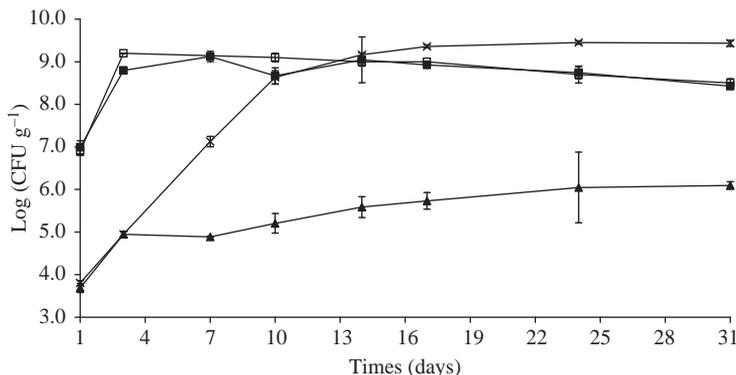


Figure 1. Growth of *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 and *Listeria monocytogenes* RF191 in peeled and cooked shrimp packed under modified atmosphere and stored at 8°C. (■) *L. piscium* CNCM I-4031 alone; (□) *L. piscium* CNCM I-4031 co-inoculated with *L. monocytogenes* RF191; (x) *L. monocytogenes* RF191 alone; and (▲) *L. monocytogenes* co-inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031. Values are averages of three analyses \pm standard deviation.

In the study of Mejlholm et al. (2005), an effect of the natural lactic flora on the growth inhibition of *L. monocytogenes* was observed at 2°C, but it was hugely reduced at 5°C or 8°C. Some combinations of citric, benzoic, and sorbic acids often used in industry were also not totally efficient to prevent growth of *L. monocytogenes* in brined shrimp (Mejlholm et al., 2008). In our experiment, growth of *L. monocytogenes* stopped when *L. piscium* CNCM I-4031 reached its maximum population density. This phenomena is usually described as the Jameson effect (Gimenez and Dalgaard, 2004; Ross et al., 2000). However, the mechanisms involved in this effect are still not elucidated. In order to determine if the growth limitation of *L. monocytogenes* could be due to acidification, pH and organic acids production were monitored during the storage (Figure 2). The pH value remained constant (6.54–6.59) in the uninoculated batch during the whole storage time (data not shown), whereas in all inoculated batches, a pH decrease was observed suggesting that acidification can only be linked to the presence and growth of microorganisms. In samples inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031, the pH value decreased rapidly from 6.58 ± 0.02 to 5.94 ± 0.13 (Figure 2) after 7 days of storage and then remained constant during storage. *L. monocytogenes* also reduced the pH from 6.52 ± 0.03 to 5.90 ± 0.01 but only after 17 days of storage. In the co-inoculated batch, the pH reduction was similar to the one observed in the *L. piscium* batch; i.e., decrease from 6.62 to 5.91 ± 0.06 after 7 days of storage. No acetic acid was produced by *L. piscium* and *L. monocytogenes*. In sterility control, the naturally occurring water phase L-lactate was constant, between 25.57–28.15 mM during the storage time. In all other batches, a L-lactic acid production was recorded. When *L. piscium* CNCM I-4031 was inoculated alone, the maximum concentration (52.81 ± 4.56 mM) was observed at day 7, when the maximum cell count was reached, and coincided with the pH decrease (Figure 2). *L. monocytogenes* is also a L-lactic acid producer, and quite similar concentrations were noticed at the end of the growth phase (47.64 ± 0.91 mM after 17 days). In the co-inoculated batch, L-lactic acid concentration increased to 89.65 ± 1.82 mM in 7-days storage, corresponding to the sum of lactic acid produced by *L. piscium* and *L. monocytogenes* during this period. Then, a decrease to 56.16 ± 1.52 mM was observed. The lactic acid concentration in the batch inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 is similar to those obtained by Papathomopoulou

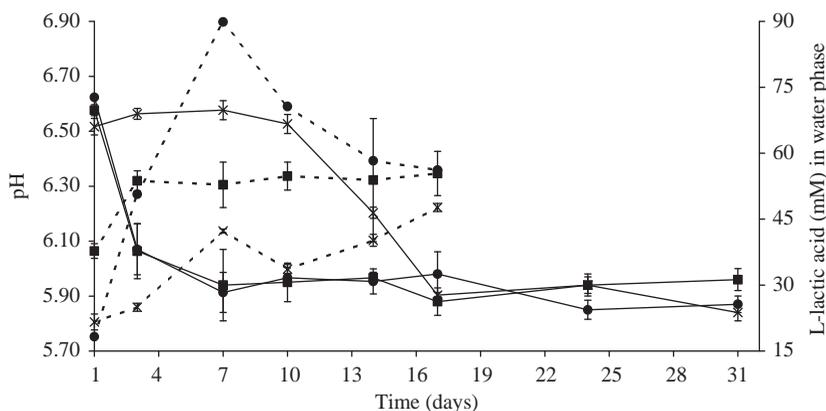


Figure 2. L-lactic acid (dotted line) and pH (solid line) evolution in peeled and cooked shrimp packed under modified atmosphere, stored at 8°C and (■) inoculated with *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 alone; (x) *L. monocytogenes* RF191 alone; and (●) co-inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 and *L. monocytogenes* RF191. Values are averages of three analyses \pm standard deviation.

and Kotzekidou (2009), who demonstrated in their study that 54 mM of lactic acid at pH 4.15 had a great antimicrobial action on *L. monocytogenes* growth in simulated meat medium fermented with *Lactobacillus sakei*. In another study, Juven et al. (1998) showed that 50 mM of lactic acid at pH 5.4 produced by *Lactobacillus alimentarius* was enough to reduce by 2 log the count of *L. monocytogenes* in vacuum-packed ground beef. Weak organic acids such as lactic and acetic acids are known to limit microbial growth because of their strong antimicrobial activity (Choi et al., 2009; Mejlholm and Dalgaard, 2007a). However, this antimicrobial effect is more pronounced when the pH is close to their pKa value (3.86 and 4.76 for lactic acid and diacetate, respectively), as shown in the study of Papathomopoulou and Kotzekidou (2009), due to toxicity of the non-dissociated fraction of weak organic acids. Comparing our results to those above, the lactic acid produced by *L. piscium* CNCM I-4031 at the pH value of 5.9 may have a limited effect on *L. monocytogenes* growth. In order to confirm this hypothesis, the SSSP V. 3.1 was used. When predicting the growth of *L. monocytogenes* alone, the value of the environmental parameters were: temperature (8°C), % CO₂ in headspace gas at equilibrium (45%), water phase salt (1.24), pH value (6.54), and water phase lactate (25.5 mM). When predicting growth of *L. monocytogenes* in the presence of lactic acid in the co-culture with *L. piscium* CNCM I-4031, the pH and water phase lactate used were 5.9 and 89.65 mM, respectively. The predicted and observed growth of *L. monocytogenes* in shrimp are shown in Figure 3. The maximum population density of *L. monocytogenes* RF191 observed in shrimp when inoculated alone was 9.4 log CFU g⁻¹, whereas the predicted density was 8.5 log CFU g⁻¹. The model sensibly underestimated the growth of *L. monocytogenes*. In the presence of 89.65 mM of lactic acid at pH (5.9), the predicted μ_{\max} and N_{31 days} were 0.029 h⁻¹ and 8.5 log CFU g⁻¹; whereas observed μ_{\max} and N_{31 days} were 0.009 h⁻¹ and 6.1 \pm 0.1 log CFU g⁻¹, respectively. These results showed that in shrimp meat the lactic acid produced by *L. piscium* CNCM I-4031 combined with the limited decrease of pH (5.9) cannot fully explain the antilisterial activity. When introducing the lactic acid bacteria count in the model, no growth of *L. monocytogenes* was predicted after 4 days, as observed in our study. However, the reason for the inhibition remained unknown. Matamoros et al. (2009b) have

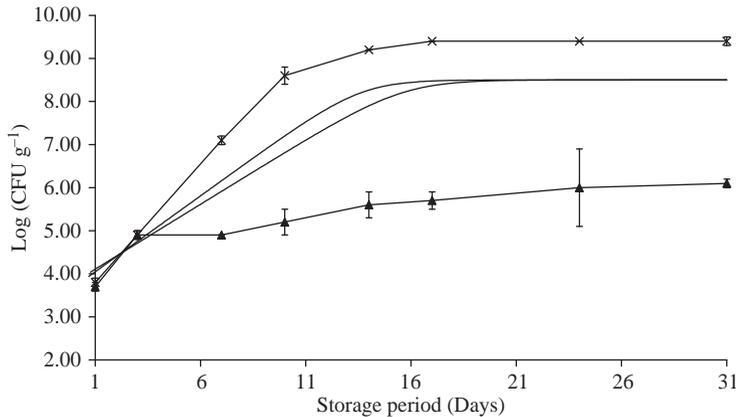


Figure 3. Observed and predicted growth by the Seafod Spoilage and Safety Predictor V.3 software of *Listeria monocytogenes* in peeled and cooked shrimp packed under modified atmosphere and stored at 8°C. (x) observed *L. monocytogenes* RF191 alone; (▲) observed *L. monocytogenes* RF191 co-inoculated with *Lactococcus piscium* CNCM I-4031; (thick line) predicted *L. monocytogenes* alone; (thin line) predicted *L. monocytogenes* at pH 5.9 and with 89.65 mM of lactic acid.

shown that the antimicrobial activity of this strain could not be linked to bacteriocin-like compounds or hydrogen peroxide. Other mechanisms like nutritional competition or synergic effects between lactic acid production and depletion for specific nutrients may be involved in this bacterial interaction. In the batch inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 alone, glucose concentration decreased from $0.36 \pm 0.00\%$ to $0.16 \pm 0.01\%$ during the first 3 days of storage and remained almost constant during the entire storage period. The same evolution was noticed in the co-inoculated batch (data not shown), whereas in the batch inoculated with *L. monocytogenes* alone, the glucose concentration decreased slowly from $0.43 \pm 0.01\%$ to $0.17 \pm 0.01\%$ over 17 days of storage. The rapid consumption of glucose by the *L. piscium* strain could partially explain its inhibitory activity toward *L. monocytogenes* as it has been shown previously with a strain of *Carnobacterium maltaromaticum* (*piscicola*; Nilsson et al., 2005). To elucidate the implication of glucose or other nutrient compounds competition in the inhibition of *L. monocytogenes* by *L. piscium* CNCM I-4031, a liquid medium simulating shrimp composition is under development.

Conclusion

The inhibitory effect of *L. piscium* CNCM I-4031 described in this study suggests that this strain may be efficient to control *L. monocytogenes* growth in cooked and peeled shrimp stored in modified atmosphere at abuse temperature.

References

- 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. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1029–1037.
- Choi, Y. M., Kim, O. Y., Kim, K. H., Kim, B. C., and Rhee, M. S. 2009. Combined effect of organic acids and supercritical carbon dioxide treatments against nonpathogenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *E-coli* O157:H7 in fresh pork. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 510–515.

- Crooke, W. M., and Simpson, W. E. 1971. Determination of ammonium in Kjeldhal digests of crops by an automated procedure. *J. Agric. Food Chem.* 226: 497–509.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350–356.
- Folch, J., Lees, N., and Sloan-Stanley, G. H. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497–509.
- Gimenez, B., and Dalgaard, P. 2004. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 96: 96–109.
- 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. *J. Food Prot.* 69: 1304–1311.
- Heavin, S. B., Brennan, O. M., Morrissey, J. P., and O' Byrne, C. P. 2009. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by acetate, benzoate and sorbate: Weak acid tolerance is not influenced by the glutamate decarboxylase system. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 179–185.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 112: 51–61.
- Juven, B. J., Barefoot, S. F., Pierson, M. D., McCaskill, L. H., and Smith, B. 1998. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* FloraCarn L-2. *J. Food Prot.* 61: 551–556.
- Kamerling, J. P., Gerwig, G. J., Vliegthart, J. F. G., and Clamp, J. R. 1975. Characterization by gas-liquid chromatography mass spectrometry and proton-magnetic resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem. J.* 151: 491–495.
- Matamoras, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Chadli, F. K., Cornet, J., Prevost, H., and Pilet, M. F. 2009a. Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* 72: 365–374.
- Matamoras, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Prevost, H., and Leroi, F. 2009b. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiol.* 26: 638–644.
- 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. *J. Appl. Microbiol.* 99: 66–76.
- Mejlholm, O., and Dalgaard, P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 27–31.
- Mejlholm, O., and Dalgaard, P. 2007a. Modeling and predicting the growth boundary of *Listeria monocytogenes* in lightly preserved seafood. *J. Food Prot.* 70: 70–84.
- Mejlholm, O., and Dalgaard, P. 2007b. Modeling and predicting the growth of lactic acid bacteria in lightly preserved seafood and their inhibiting effect on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 70: 2485–2497.
- Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M. B., Bøknæs, N., Koort, J., Björkroth, J., and Dalgaard, P. 2008. Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *Int. J. Food Microbiol.* 124: 250–259.
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G., and Strecker, G. 1986. Glycoproteins. In: *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. Chaplin, M. F., and Kennedy, J. F (Ed.). Oxford, UK: IRL Press. pp.143–204.
- 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. *J. Food Prot.* 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 non-bacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J. Appl. Microbiol.* 98: 172–183.

- Papathomopoulou, K., and Kotzekidou, P. 2009. Inactivation of verocytotoxigenic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* co-cultured with *Lactobacillus sakei* in a simulated meat fermentation medium. *J. Food Safety* 29: 331–347.
- Paranjpye, R. N., Peterson, M. E., Poysky, F. T., and Eklund, M. W. 2008. Incidence, growth, and inactivation of *Listeria monocytogenes* in cooked and peeled cold-water shrimp. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 17: 266–284.
- Richard, C., Brillet, A., Pilet, M. F., Prévost, H., and Drider, D. 2003. Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 288–292.
- Ross, T., Dalgaard, P., and Tienungoon, S. 2000. Predictive modeling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 231–245.
- Rutherford, T. J., Marshall, D. L., Andrews, L. S., Coggins, P. C., Wes Schilling, M., and Gerard, P. 2007. Combined effect of packaging atmosphere and storage temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat shrimp. *Food Microbiol.* 24: 703–710.
- Tokarsky, O., and Marshall, D. L. 2008. Mechanism of synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by lactic acid, monolaurin, and nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7126–7129.
- Tomé, E., Gibbs, P. A., and Teixeira, P. C. 2008. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 285–294.
- Tsigarida, E., Skandamis, P., and Nychas, G. J. E. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 degrees C. *J. Appl. Microbiol.* 89: 901–909.
- Valdimarsson, G., Einarsson, H., Gudbjornsdottir, B., and Magnusson, H. 1998. Microbiological quality of Icelandic cooked-peeled shrimp (*Pandalus borealis*). *Int. J. Food Microbiol.* 45: 157–161.
- Vescovo, M., Scolari, G., and Zacconi, C. 2006. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* 23: 689–693.
- Weiss, A., and Hammes, W. P. 2006. Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold-smoked salmon. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 343–346.
- 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. *J. Food Prot.* 66: 1420–1425.

**3-2 Nature et élucidation des interactions entre *Lactococcus piscium*
CNCM I-4031 et *Listeria monocytogenes***

1 Introduction

La compréhension des mécanismes d'inhibition des flores protectrices vis-à-vis de flores cibles a fait l'objet de nombreux travaux pour les bactéries lactiques productrices de bactériocines. Dans certains cas, elle est étudiée en utilisant des mutants ou des variants non producteurs de bactériocines qui montrent une activité moindre ou absente (Nilsson *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2003). Dans d'autres études, l'activité est comparée à l'utilisation de souches proches ne montrant pas d'inhibition (Tahiri *et al.*, 2009; Yamazaki *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 2003). Lorsqu'une inhibition est mise en évidence sans que la production d'un composé de type bactériocine ne soit produit, les mécanismes impliqués sont plus rarement expliqués. Plusieurs études qualifient l'arrêt de la croissance de *L. monocytogenes* en présence de certaines bactéries lactiques d'effet Jameson (Gimenez *et al.*, 2004; Jameson, 1962; Ross *et al.*, 2000) sans que des hypothèses ne soient avancées pour expliquer cet effet. En utilisant diverses approches, l'étude de Nilsson *et al.*, (2005), a démontré que l'activité inhibitrice de *C. piscicola* sur *L. monocytogenes* est liée à une compétition pour le glucose. En revanche, l'hypothèse d'une compétition nutritionnelle pour les acides aminés pouvant expliquer l'interaction entre *Lactococcus garviae* et *Staphylococcus aureus* n'a pas pu être démontrée en matrice lait (Alomar *et al.*, 2008). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le mécanisme d'action de *L. piscium* CNCM I-4031 vis-à-vis de *B. thermosphacta* n'a pas été totalement expliqué par les expérimentations réalisées directement sur matrice crevette. Pour tenter d'approfondir les mécanismes impliqués dans cette interaction, la mise au point de milieux chimiquement définis permettant la croissance des deux souches a été entreprise, mais aucun des milieux testés n'a permis d'obtenir une croissance satisfaisante pour *B. thermosphacta*. Pour cette raison, les travaux visant à élucider les mécanismes impliqués dans l'inhibition se sont redirigés sur l'interaction entre *L. piscium* CNCM I-4031 et *L. monocytogenes* RF191 mise en évidence dans la première partie du chapitre 3. Dans cette optique, un milieu chimiquement défini permettant d'une part d'obtenir une bonne croissance de chacune des bactéries en culture pure, d'autre part de reproduire l'inhibition observée sur matrice, a été mis au point. Une approche globale visant à établir le profil métabolomique des deux souches sur ce milieu a été entreprise. Différentes hypothèses de mécanismes de compétition nutritionnelle ont ensuite été testées dans ce milieu en suivant les principaux composés consommés et en testant l'effet de la supplémentation par différents groupes de composés sur la reprise de croissance de *L. monocytogenes*.

2 Matériels et méthodes

2.1 Souches étudiées

La souche protectrice *L. piscium* CNCM I-4031 isolée de pavés de saumon frais conditionnés sous atmosphère protectrice par Matamoros *et al.* (2009b) et la souche cible *L. monocytogenes* RF191 isolée de crevette tropicale cuite décortiquée ont été utilisées dans cette étude. Les souches sont conservées à -80°C en milieu Elliker avec 20% glycérol pour *L. piscium* et BHI avec 20% glycérol pour *L. monocytogenes*. Les précultures sont réalisées dans de l'Elliker pour *L. piscium* et du BHI pour *L. monocytogenes*, pendant 24 h à 26°C.

2.2 Mise au point d'un milieu chimiquement défini

Un premier milieu de culture baptisé Model Shrimp Medium (MSM) tamponné à pH=7, obtenu par croisement des données issues de la caractérisation de la crevette (Fall *et al.*, 2010a) et celles de la littérature a été mis au point puis enrichi avec différents composés (tableau 1). Les 7 milieux ainsi obtenus ont étéensemencés à 1% avec une préculture de chacune des deux souches en microplaques (300 µl par puits). Si nécessaire, une dilution dans les mêmes milieux que celles de la préculture a été réalisée afin d'atteindre un taux d'inoculum commun pour chaque souche de 10⁶ UFC/ml. La DO_{600 nm} a été suivie à l'aide du système Bioscreen pendant environ 200 h à 8°C. A titre de comparaison, les croissances ont également été réalisées sur milieu Elliker et BHI et sur jus de crevette préparé dans les conditions décrites par Fall *et al.* (2010a),ensemencés dans les mêmes conditions.

Le taux de croissance a été calculé en prenant la pente de la représentation graphique Ln (DO) en fonction du temps.

Tableau 1 : Composition des différents milieux « Model shrimp Medium'' (MSM) par litre de milieu.

Composés	Concentration /l	MSM	MSMA	MSMB	MSMC	MSMD	MSME	MSMF
Tampon								
KH ₂ PO ₄	6,56 g	X	X	X	X	X	X	X
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	30,96 g	X	X	X	X	X	X	X
Sucre								
Glucose	7 g	X	X	X	X	X	X	X
Sels								
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g	X	X	X	X	X	X	X
NaCl	8 g	X	X	X	X	X	X	X
Citrate de Fer	0,088 g	X	X	X	X	X	X	X
Acides aminés								
L-alanine	0,05 g	X	X	X	X	X	X	X
L-arginine	0,1 g	X	X	X	X	X	X	X
L-cystéine	0,05 g	X	X	X	X	X	X	X
L-glutamate	0,1 g	X	X	X	X	X	X	X
L-glutamine	0,05 g	X	X	X	X	X	X	X
L-glycine	0,1 g	X	X	X	X	X	X	X
L-histidine	0,05 g	X	X	X	X	X	X	X
L-isoleucine	0,05 g	X	X	X	X	X	X	X
L-leucine	0,05 g	X	X	X	X	X	X	X
L-lysine	0,1 g	X	X	X	X	X	X	X
L-méthionine	0,1 g	X	X	X	X	X	X	X
L-phénylalanine	0,05 g	X	X	X	X	X	X	X
L-proline	0,15 g	X	X	X	X	X	X	X
L-sérine	0,15 g	X	X	X	X	X	X	X
L-thréonine	0,1 g	X	X	X	X	X	X	X
L-valine	0,15 g	X	X	X	X	X	X	X
Tryptophane	0,1 g		X		X			X
Tyrosine	0,05 g		X		X			X
Taurine	0,1 g						X	X
Vitamines								
Riboflavine	0,3 mg	X	X	X	X	X	X	X
Thiamine	0,1 mg	X	X	X	X	X	X	X
Niacine	15 mg	X	X	X	X	X	X	X
Vit B12	0,01 mg	X	X	X	X	X	X	X
Vitamine D	0,005 mg	X	X	X	X	X	X	X
Acide aminobenzoïque	0,4 mg		X					X
Acide folique	0,32 mg		X					X
Piridoxal	0,5 mg		X					X
Solution d'oligo-éléments								X
Solution de Murashigue (10X)	1X					X		X
Bases								
Adénine	0.005g		X					X
Guanine	0.01g		X					X
Uracile	0.01g		X					X

2.3 Test d'inhibition sur milieu MSMA

2.3.1 Cultures séquentielles

Cette technique consiste à faire pousser la souche bioprotectrice dans le milieu MSMA dans un premier temps pendant 24 h avant d'ensemencer la souche cible. A partir de la préculture réalisée dans les conditions habituelles, *L. piscium* CNCM I-4031 a été ensemencé dans le MSMA à 1% afin d'atteindre 10^6 UFC/ml puis incubée à 26°C pendant 24 h. Au terme de cette incubation, la culture a été centrifugée à 8500g pendant 10 min. Le surnageant résultant de cette opération a été prélevé puis stérilisé par filtration avec un filtre de 0.45 µm. Le milieu pré fermenté ainsi obtenu est transféré dans un flacon de 100 ml et inoculé à 1% avec la souche de *L. monocytogenes* préalablement diluée dans du BHI afin d'atteindre un taux d'inoculum de 10^3 UFC/ml. Le flacon de culture est ensuite incubé à 26°C et la croissance de la souche cible est suivie par dénombrement sur milieu BHI agar. Un témoin cultivé dans un milieu MSMA non pré fermenté, ensemencé dans les mêmes conditions est suivi en parallèle.

2.3.2 Co-cultures avec contact cellulaire

L. piscium et *L. monocytogenes* sont ensemencées à 10^6 UFC/ml et 10^3 UFC/ml respectivement dans un flacon de 100 ml contenant le milieu MSMA. La culture est incubée à 26°C et la croissance des deux souches est suivie simultanément par dénombrement sur gélose BHI agar incubé 24 h à 37°C pour *L. monocytogenes* et sur gélose Elliker incubée 5 jours à 8°C en anaérobiose pour *L. piscium*. La croissance de chaque souche est comparée à celle observée en culture pure dans le même milieu de culture.

2.3.3 Co-culture sans contact cellulaire dans un système à double compartiment

Ce système permet de faire croître les deux souches en même temps sans qu'il y ait un contact direct entre les cellules. Les deux compartiments de ce dispositif sont séparés par un filtre stérile de 0.22 µm de diamètre qui permet le passage des nutriments d'un côté à l'autre tout en empêchant le passage des bactéries. Dans ce dispositif, chaque souche est ensemencée à 1% dans un des compartiments contenant le milieu MSMA, aux mêmes niveaux d'inoculum que précédemment. Leurs croissances sont suivies par dénombrement pendant 48 h comme dans l'expérience précédente et sont comparées avec des témoins de cultures pures ensemencés dans des flacons de même volume.

2.4 Analyses physico-chimiques

2.4.1 Profil métabolomique global de chaque souche

La métabolomique permet par l'utilisation de techniques d'analyse spécifique d'avoir une vue intégrée d'un ensemble de métabolites de petites masses moléculaires d'un système biologique. Cette technique est appliquée à nos échantillons afin de comparer les empreintes de composition du milieu MSMA non ensemencé à celles de ce même milieu fermenté par *L. piscium* CNCM I-4031 et *L. monocytogenes* RF191 48 h à 26°C en culture pure. L'objectif est de déterminer si les deux souches utilisent les mêmes composés ce qui pourrait aller dans le sens d'une compétition nutritionnelle. Les profils métabolomiques ont été réalisés par le LABERCA d'Oniris Nantes.

Du milieu MSMA a été préparé comme précédemment et distribué dans des tubes de 15 ml. Pour chaque condition de culture, 6 tubes ont été préparés. Chaque tube de MSMA a été ensemencé à 1% par la préculture de chacune des deux souches étudiées, puis incubé à 26°C pendant 48 h. Les cultures obtenues ainsi que le lot témoin non ensemencé, sont centrifugés 10 min à 8500 g et filtrés avec un filtre de 0,22 µm de diamètre. Sur les surnageants obtenus ont été réalisés des empreintes métabolomiques acquises par couplage LC-HRMS (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution), en utilisant le mode d'acquisition par ionisation électrospray en mode positif (ESI+) (Full Scan de 50 à 800 Da. / Résolution de 30000).

2.4.2 Composition en acides aminés après culture sur milieu MSMA

Afin de comparer la consommation en acides aminés de *L. monocytogenes* et de *L. piscium* CNCM I-4031 sur milieu MSMA, un dosage des acides aminés a été effectué en triplicats sur les surnageants obtenus dans les conditions décrites précédemment. L'analyse a été effectuée par HPLC (pompe HPLC Gradient Former 425, Kontron) avec une colonne C18 AccQ.Tag (Waters). L'analyse est effectuée avec un gradient de 8% à 30% d'acétonitrile en 23 minutes à 44,2°C. Les acides aminés sont détectés par un détecteur spectrofluorimétrique (Shimadzu RF-10_{XL}). Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Drylab (LC Ressources).

2.4.3 Dosage du glucose et de l'acide lactique, mesure du pH

L'acide L-lactique a été dosé sur les surnageants de culture à l'aide du kit enzymatique 021 (Biosentec, Toulouse, France) en utilisant la méthode préconisée par le fournisseur. Le dosage

du glucose est effectué par la méthode colorimétrique de Dubois et al. (1956). Le pH est également mesuré au moment des prélèvements effectués pour les dénombrements.

2.5 Effet de la supplémentation par différents composés sur la reprise de croissance de *L. monocytogenes* en co-culture avec *L. piscium* CNCM I-4031

Ces tests ont été réalisés dans le milieu MSMA en conditions de co-culture avec contact cellulaire.

Après une préculture de 24 h dans leurs milieux conventionnels de culture comme précédemment, les souches ont étéensemencées respectivement à 10^6 UFC/ml et 10^3 UFC/ml pour *L. piscium* et *L. monocytogenes* dans 5 flacons de 100 ml contenant un volume final de 90 ml de milieu MSMA, puis incubées à 26°C. Après 24 h d'incubation, un des quatre groupes de composés suivant : acides aminés, bases azotés, glucose et vitamines (Tableau 2) ont été ajoutés respectivement dans 4 flacons de co-cultures, de façon à obtenir des concentrations équivalentes à celles du milieu initial. Un cinquième flacon est complété avec un mélange acides aminés + bases + vitamines. Le dernier flacon est utilisé comme témoin et complété avec de l'eau stérile. Les cultures sont de nouveau incubées à 26°C et les croissances des 2 souches sont suivies dans les mêmes conditions que précédemment par dénombrement et comparées au témoin de co-culture.

Tableau 2 : Composition finale (g/l de milieu) des 4 groupes de composés ajoutés pour tester la reprise de croissance de *L. monocytogenes* après 24h de co-culture avec *L. piscium* CNCM I-4031 en milieu MSMA à 26°C

Flacon 1 : acides aminés	L-leucine	0,05 g/l	Flacon 2 : bases	Adénine	0,005 g/l
	L-isoleucine	0,05 g/l		Guanine	0,01 g/l
	L-thréonine	0,1 g/l		Uracile	0,01 g/l
	L-valine	0,15 g/l		Riboflavine	0,3 mg/l
	L-méthionine	0,1 g/l		Thiamine	0,1 mg/l
	L-arginine	0,1 g/l	Niacine	15 mg/l	
	L-cystéine	0,05 g/l	Vit B12	0,01 mg/l	
	L-glutamine	0,05 g/l	Vitamine D	0,005 mg/l	
	L-histidine	0,05 g/l	Acide aminobenzoïque	0,4 mg/l	
	L-lysine	0,1 g/l	Acide folique	0,32 mg/l	
	L-phénylalanine	0,05 g/l	Piridoxal	0,5 mg/l	
	L-proline	0,15 g/l	Acide nicotinique	1,70 mg/l	
	L-sérine	0,15 g/l	Glucose	7 g/l	
	L-asparagine	0,05 g/l	Flacon 5 : acides aminés + vitamines + bases		
L-glycine	0,1 g/l				
L-glutamate	0,1 g/l				
Tyrosine	0,05 g/l				

3 Résultats et discussion

3.1 Mise au point d'un milieu chimiquement défini

La mise au point d'un milieu chimiquement défini a été effectuée dans le but de tester différentes hypothèses de compétitions nutritionnelles pouvant expliquer l'inhibition de *L. monocytogenes* par *L. piscium*. Différents milieux ont donc été élaborés en s'inspirant de milieux chimiquement définis précédemment mis au point pour *L. monocytogenes* comme le milieu MWB (Premeratne *et al.*, 1991) et pour des bactéries lactiques comme *Lactococcus lactis* (Jensen et Hammer, 1993), ou *Lactobacillus sakei* (Lauret *et al.*, 1996). Les taux de croissance observés dans les différents milieux chimiquement définis testés sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Taux de croissance maximal à 8°C (μ_{\max}) en h⁻¹ de *L. piscium* CNCM I-4031 et *L. monocytogenes* RF191 dans les différents milieux chimiquement définis, les milieux Elliker et BHI et le jus de crevette.

Milieu	<i>L. piscium</i> CNCM I-4031	<i>L. monocytogenes</i> RF191
	μ_{\max} (h ⁻¹)	μ_{\max} (h ⁻¹)
MSM	0,029	0,018
MSMA	0,058	0,030
MSMB	0,043	0,028
MSMC	0,033	0,020
MSMD	0,018	0,014
MSME	0,043	0,023
MSMF	0,093	0,018
Elliker	0,050	0,037
BHI	0,066	0,035
Jus de crevette	0,044	0,033

Les résultats des tests de croissance bactérienne ont montré une aptitude des souches étudiées à croître dans les différents milieux chimiquement définis avec des taux de croissance proches de ceux obtenus en milieu jus de crevette. Dans le cas de *L. piscium*, la croissance la plus faible à 8°C est obtenue dans les milieux dépourvus de vitamines et de bases, MSMC ($\mu=0.03$ h⁻¹) et MSMD ($\mu=0.02$ h⁻¹), tandis que les meilleures croissances sont observées dans le milieu complet MSMF et dans le milieu MSMA ($\mu=0.09$ h⁻¹ et 0.06 h⁻¹ respectivement). La

meilleure croissance observée dans le milieu complet MSMF par rapport au milieu MSMA pourrait être liée à la présence de taurine. On constate également que la souche CNCM I-4031 a un taux de croissance équivalent en milieu MSMF qui contient de la taurine mais pas de vitamine et dans le milieu MSMB contenant des vitamines mais pas de taurine. Ce composé présent dans la chair des crustacés en grande quantité (Heu *et al.*, 2003) pourrait intervenir dans le mécanisme d'adaptation à la matrice de *L. piscium* CNCM I-4031. La présence de taurine ne semble par contre pas avoir d'effet sur *L. monocytogenes* qui présente globalement des taux de croissance plus faibles que *L. piscium* dans ces différents milieux de culture. Pour cette bactérie, les taux de croissance les plus faibles sont obtenus dans le MSMD ($\mu=0.01 \text{ h}^{-1}$), et le plus élevé dans le MSMA ($\mu=0,03 \text{ h}^{-1}$). Des milieux de culture chimiquement définis comme le milieu MWB ont été précédemment développés pour *L. monocytogenes* (Premeratne *et al.*, 1991). Ce milieu a également été testé dans notre étude mais n'a pas été retenu car il ne permettait pas une bonne croissance de la souche de *Lactococcus*.

Le milieu MSMA permettant d'obtenir les taux de croissance les plus proches entre les deux souches a finalement été choisi comme milieu d'étude des interactions. Les premiers tests d'inhibition se révélant peu concluants à 8°C et fastidieux du fait des temps de culture nécessaires, il a été décidé de poursuivre l'étude des interactions à 26°C, température proche des températures optimales de croissance des deux souches. Les taux de croissance à 26°C obtenus sur milieu MSMA sont de $0,572 \text{ h}^{-1}$ et $0,256 \text{ h}^{-1}$ pour *L. monocytogenes* et *L. piscium* respectivement. Il est important de noter que pour obtenir une culture sur milieu MSMA, *L. piscium* CNCM I-4031 doit être précultivée en milieu Elliker. En effet, les précultures sur milieu MSMA n'ont jamais permis d'obtenir de croissance ultérieure sur milieu MSMA après repiquage.

3.2 Consommation des acides aminés

Le profil de consommation en acides aminés a été effectué après 48h de culture de chaque bactérie sur le milieu MSMA à 26°C (tableau 4). Il montre que *L. piscium* consomme essentiellement de la cystéine, de l'histidine de la glycine et dans une moindre mesure de la leucine, de l'isoleucine et du tryptophane. En revanche *L. monocytogenes* à l'exception de la proline consomme tous les acides aminés, la glycine, la valine et l'histidine étant les plus consommés. Ces profils de consommation semblent indiquer qu'il ne pourrait pas exister une compétition pour les acides aminés entre les deux souches. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus en matrice crevette qui montraient une faible consommation d'acides aminés libres par *L. piscium* CNCM I-4031 (voir chapitre 1, publication N°2).

Tableau 4 : Composition en acide aminé (g/l) du milieu MSMA stérile et après 48h de culture de *L. piscium* CNCM I-4031 et *L. monocytogenes* RF191 à 26°C (\pm intervalle de confiance ; le glutamate, la thréonine, l'arginine et la glutamine n'ont pas pu être dosés par la méthode utilisée). ^a : différence significative entre la moyenne du dosage sur le milieu après culture de *L. piscium* et le milieu stérile. ^b : différence significative entre la moyenne du dosage sur le milieu après culture par *L. monocytogenes* et le milieu stérile.

Acide aminé	Composition initiale (g/l)	Dosage effectué dans le milieu stérile (g/l)	Après 48h de culture avec <i>L. piscium</i> CNCM I-4031 (g/l)	Après 48h de culture avec <i>L. monocytogenes</i> RF191 (g/l)
Cystéine	0,05	0,052 \pm 0,006	0,003 \pm 0,005 ^a	0,012 \pm 0,002 ^b
Glycine	0,1	0,101 \pm 0,005	0,069 \pm 0,006 ^a	0,013 \pm 0,001 ^b
Histidine	0,05	0,079 \pm 0,004	0,037 \pm 0,002 ^a	0,032 \pm 0,001 ^b
Isoleucine	0,05	0,053 \pm 0,002	0,041 \pm 0,003 ^a	0,016 \pm 0,001 ^b
Leucine	0,05	0,053 \pm 0,002	0,048 \pm 0,003	0,021 \pm 0,001 ^b
Lysine	0,1	0,072 \pm 0,001	0,061 \pm 0,004 ^a	0,053 \pm 0,002 ^b
Méthionine	0,1	0,091 \pm 0,007	0,087 \pm 0,006	0,076 \pm 0,003 ^b
Phénylalanine	0,05	0,052 \pm 0,003	0,054 \pm 0,004	0,036 \pm 0,001 ^b
Proline	0,15	0,112 \pm 0,010	0,108 \pm 0,014	0,116 \pm 0,008
Sérine	0,15	0,141 \pm 0,005	0,139 \pm 0,006	0,131 \pm 0,005 ^b
Tryptophane	0,05	0,026 \pm 0,002	0,022 \pm 0,002 ^a	0,019 \pm 0,000 ^b
Tyrosine	0,05	0,055 \pm 0,003	0,056 \pm 0,003	0,045 \pm 0,002 ^b
Valine	0,15	0,148 \pm 0,009	0,137 \pm 0,010	0,085 \pm 0,003 ^b

3.3 Profil métabolomique des deux souches sur milieu MSMA

Les empreintes métabolomiques ont été enregistrées pour le milieu MSMA seul (A), le milieu MSMA après 48 h de culture de *L. piscium* (B) et le milieu MSMA après 48 h de culture de *L. monocytogenes* (C). Pour chaque lot, une analyse sur 6 échantillons a été effectuée. Les empreintes enregistrées montrent une bonne répétabilité inter-groupe et sont parfaitement discriminés comme le montre l'ACP correspondant à l'analyse statistique des empreintes (figure 1). Il en ressort une nette distinction entre les profils obtenus après croissance de *L. piscium* et de *L. monocytogenes* suggérant que ces deux bactéries ont des métabolismes très différents sur ce milieu.

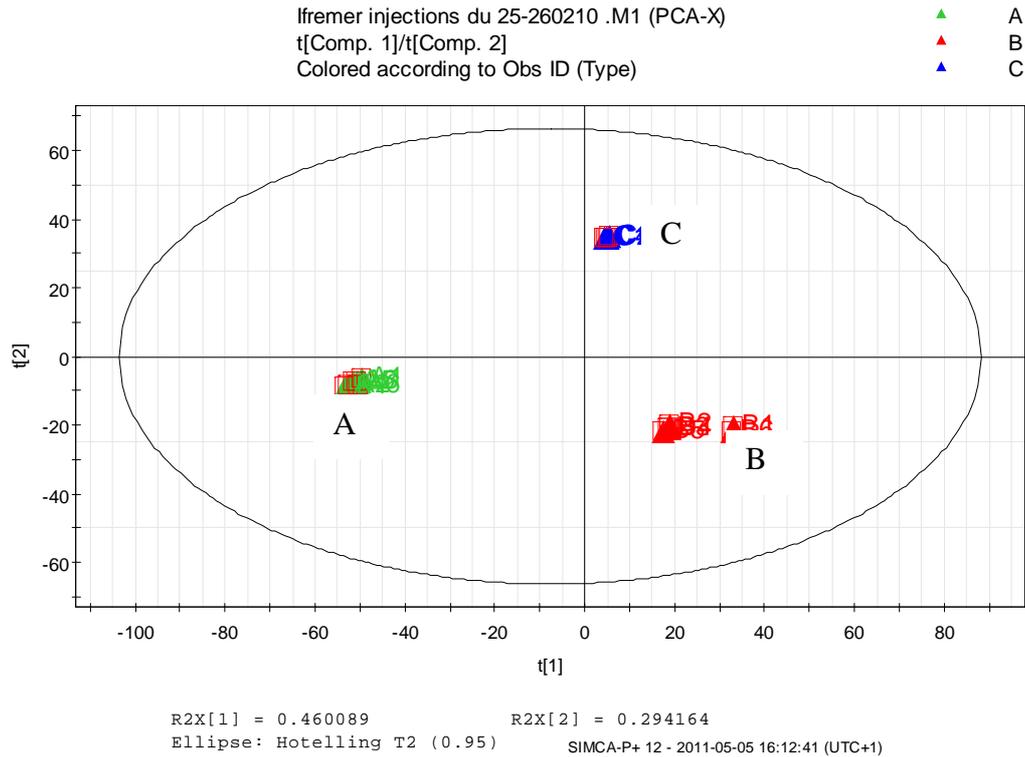


Figure 1 : Réprésentation par analyse en composante principale des empreintes métabolomiques obtenues dans le milieu MSMA (A) non fermenté, (B) après 48h de culture de *L. piscium*, (C) après 48h de culture de *L. monocytogenes*.

L'analyse statistique de comparaison des différents profils permet en se focalisant sur les molécules initialement présentes dans le milieu de culture de repérer celles qui sont différemment consommées (ou excrétées) par chacune des deux bactéries. Dans le cadre de notre étude, l'analyse s'est centrée sur les molécules qui n'ont pas pu être dosées par les méthodes classiques : bases et vitamines. Les chromatogrammes des pics correspondant à l'adénine, la guanine et l'uracile sont présentés Figure 2. On remarque que les trois bases nucléiques sont consommées totalement par la souche de *Lactococcus piscium* alors que la *Listeria* en consomme peu. En ce qui concerne les vitamines, seule la riboflavine est consommée quasiment totalement par les deux souches, les autres vitamines ne sont pas détectées ou ne présentent pas de différences significative entre les différents milieux.

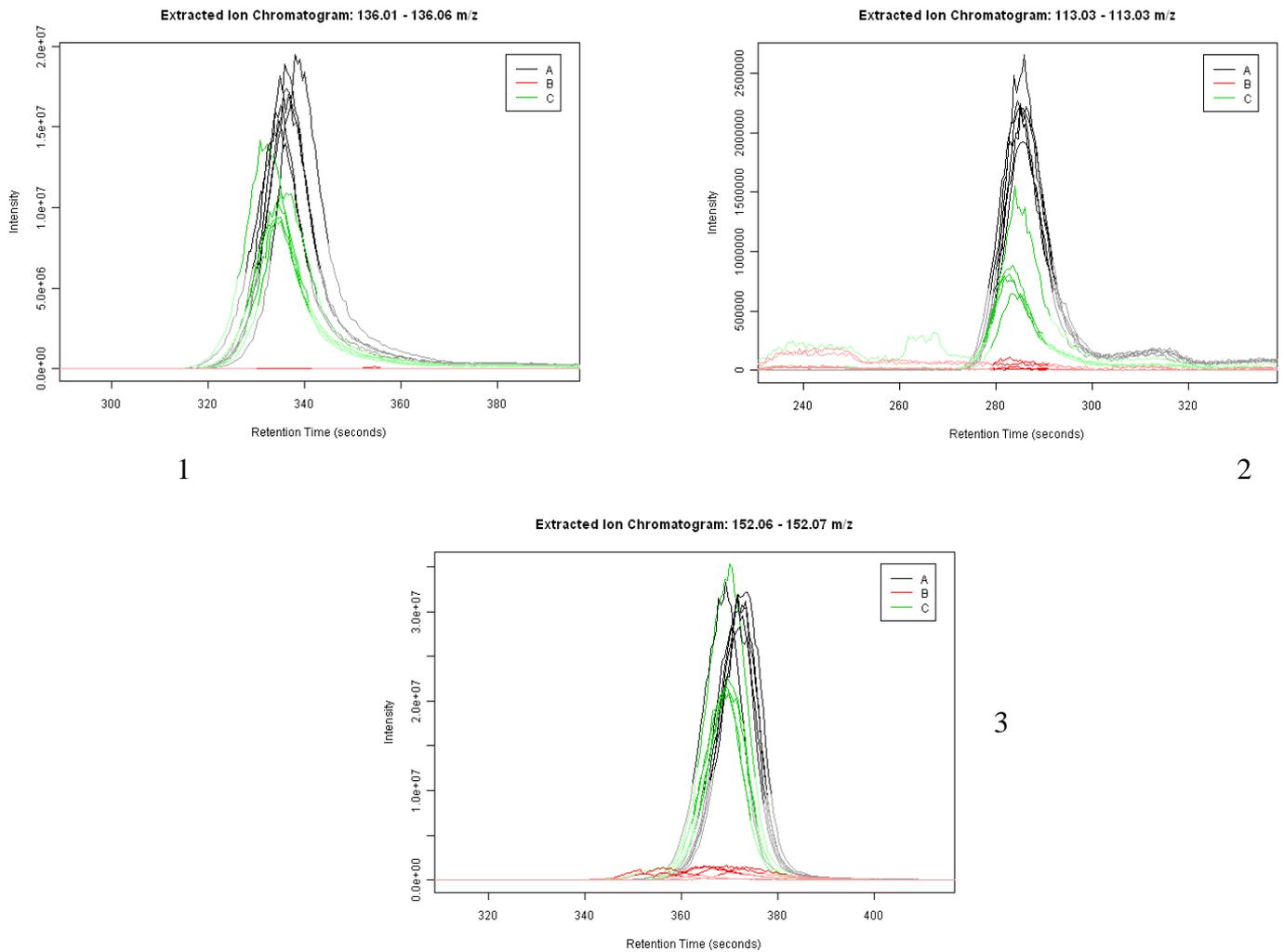


Figure 2 : Chromatogrammes des pics correspondant aux formes ionisées de l'adénine (1), l'uracile (2) et la guanine (3) dans le milieu MSMA non fermenté (noir), après 48h de culture de *L. piscium* (rouge), après 48h de culture de *L. monocytogenes* (vert).

La technique des empreintes métabolomiques est une approche nouvelle qui a été utilisée de façon préliminaire dans ce travail pour avoir une image globale du comportement métabolique de chaque souche sur le milieu chimiquement défini. Elle n'a pas pu être poursuivie dans le cadre de notre étude mais demanderait à être approfondie pour analyser notamment les groupes de composés produits par chacune des souches dans le milieu chimiquement défini.

3.4 Interactions entre *L. monocytogenes* et *L. piscium* sur milieu MSMA

3.4.1 Cultures séquentielles

La figure 3 montre la croissance de *L. monocytogenes* dans le milieu MSMA en culture pure et en culture séquentielle dans l'étude des interactions. En culture pure, *L. monocytogenes*

montre une bonne adaptation de la souche dans ce milieu à 26°C. En effet sa croissance démarre rapidement et finit par atteindre son maximum, à savoir 9 log UFC/ml en 30h d'incubation avec un taux de croissance $\mu = 0.572 \text{ h}^{-1}$. Lorsque *L. monocytogenes* est inoculé dans le MSMA préfermenté 24 h par *L. piscium*, sa croissance est similaire à celle observée en culture pure avec le même taux de croissance. Ces résultats montrent que la consommation préalable des nutriments par *L. piscium* ainsi que la production de métabolites par cette bactérie ne gênent pas la croissance ultérieure de *L. monocytogenes* contrairement à ce qui était observé par Nilsson *et al.* (2005) pour l'interaction entre *L. monocytogenes* et *Carnobacterium maltaromaticum* où la croissance de *L. monocytogenes* était d'autant plus inhibée que le milieu contenait des concentrations croissantes de milieu préfermenté par la bactérie lactique.

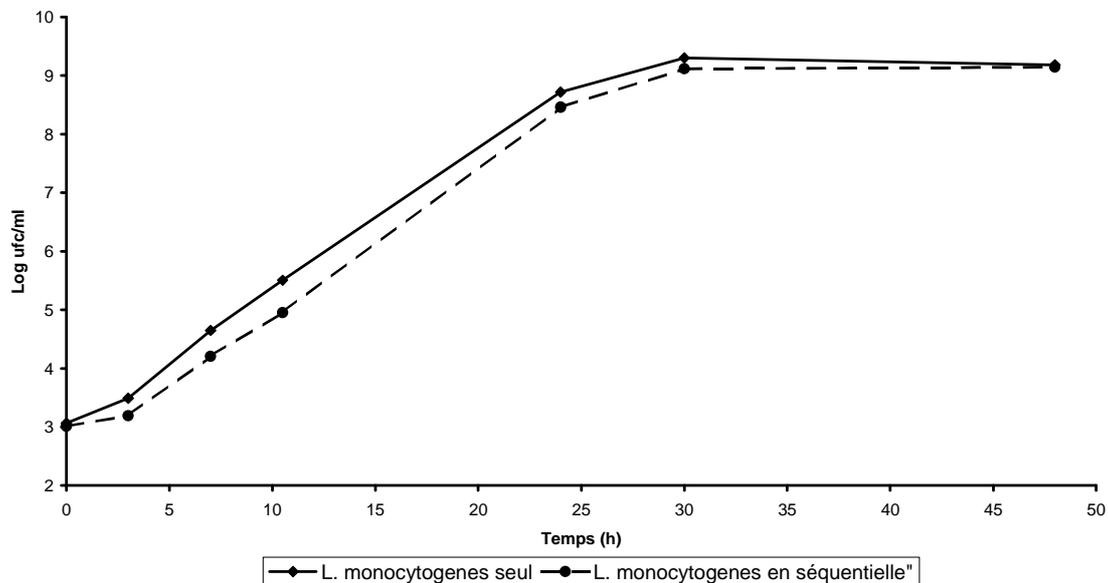


Figure 3 : Croissance de *L. monocytogenes* RF191 en milieu MSMA à 26°C, et en milieu MSMA préfermenté à 26°C par *L. piscium* CNCM I-4031.

3.4.2 Co-cultures avec contact cellulaire

Lorsque *L. monocytogenes* est co-inoculée avec *L. piscium*, sa croissance est comparable à celle de la culture pure pendant les dix premières heures d'incubation (Figure 4). Cependant, on observe après cette phase, un ralentissement de la croissance de *L. monocytogenes* qui se poursuit pendant toute la durée d'incubation.

Cette inhibition atteint son maximum de 3 log UFC/ml après 30h d'incubation à 26°C ce qui est comparable à l'inhibition observée sur matrice crevette (Fall *et al.*, 2010b).

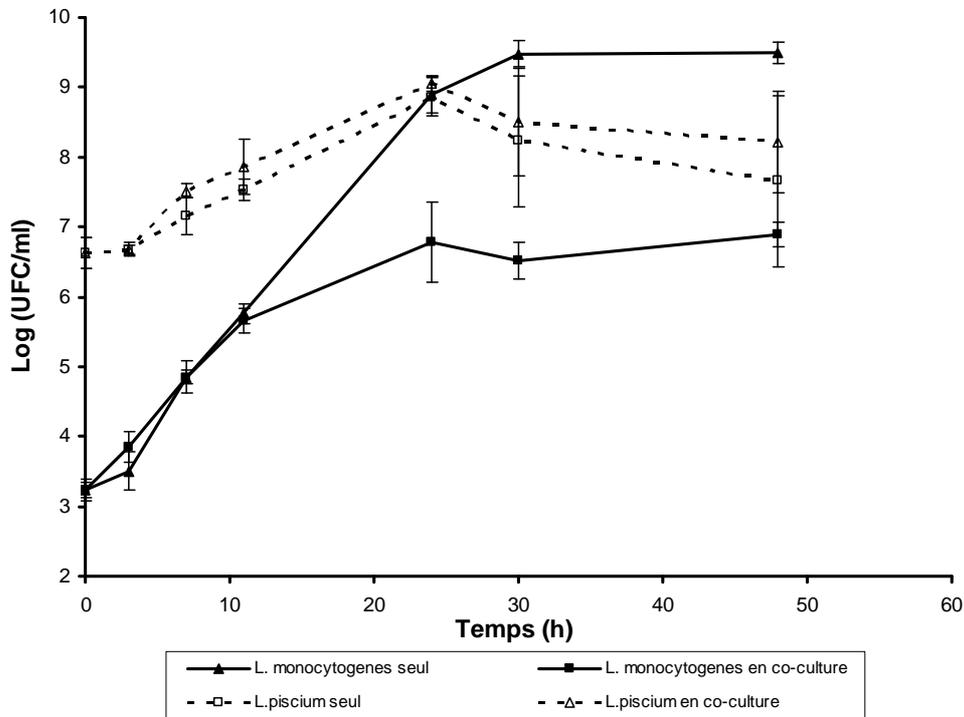


Figure 4 : Croissance de *L.monocytogenes* RF191 et de *L. piscium* CNCM I-4031 en co-culture à 26°C sur milieu MSMA (chaque point est issu de la moyenne de 3 expérimentations réalisées à des moments différents, les barres d'erreur indiquent les écarts-type).

Le suivi de croissance de *L. piscium* montre que cette souche est adaptée au milieu MSMA puisqu'elle atteint 8.7 log UFC/ml en 24 h d'incubation en culture pure (Figure 4). Cependant on constate qu'au delà de 24 h d'incubation, sa croissance chute progressivement en fonction du temps pour atteindre la valeur de 6.8 log UFC/ml en 48 h d'incubation (Figure 4). En co-culture, la croissance de *L. piscium* est similaire mais décroît de façon moins importante pendant la phase stationnaire. Le pH obtenu après 48h de culture est de 6,2 dans la co-culture et dans les deux cultures pures. Le glucose est consommé quasiment intégralement puisque sa concentration n'est plus que de $0,256 \pm 0,021$ g/l et $0,255 \pm 0,002$ g/l dans la culture pure de *L. monocytogenes* et dans la co-culture respectivement, et de $0,541 \pm 0,004$ g/l dans la culture pure de *L. piscium* après 48 h de culture. La quantité d'acide lactique produite après 48h d'incubation est équivalente pour *L. piscium* ($3,71 \pm 0,01$ g/l) et *L.monocytogenes* ($3,73 \pm 0,09$ g/l) et légèrement supérieure dans la co-culture ($4,28 \pm 0,06$ g/l).

3.4.3 Co-culture sans contact cellulaire : système à double compartiment

Les résultats de l'expérience réalisée dans le système à double compartiment afin de vérifier si l'inhibition observée précédemment nécessite le contact des deux souches, sont représentés sur la figure 5. On constate dans ce cas que la croissance de *L. monocytogenes* dans le système à double compartiment est pratiquement identique à celle observée en culture pure avec une population maximale de 9 log UFC/ml atteinte aux alentours de 30 h de culture, et un taux de croissance de 0.567 h^{-1} . Aucune inhibition n'est observée dans ce cas pendant les 48h d'incubation à 26°C bien que les nutriments consommés ou les composés produits par les deux souches puissent être échangés à travers la membrane. Ces résultats montrent la nécessité du contact cellulaire entre les deux bactéries pour que l'inhibition se produise. La croissance de *L. piscium* est similaire à celle observée en culture pure avec une phase de déclin après 24 h de culture. Ces résultats obtenus pour les cultures séquentielles et les co-cultures sont originaux puisqu'ils démontrent clairement que le contact cellulaire est nécessaire pour obtenir l'inhibition alors que dans les travaux de Nilsson *et al.* (2005), il a été montré au contraire que l'inhibition de *L. monocytogenes* par une souche de *C. maltaromaticum* non productrice de bactériocine était maintenue dans un système à double compartiment où les deux bactéries sont séparées par une membrane de $0,22 \mu\text{m}$ permettant la diffusion des nutriments.

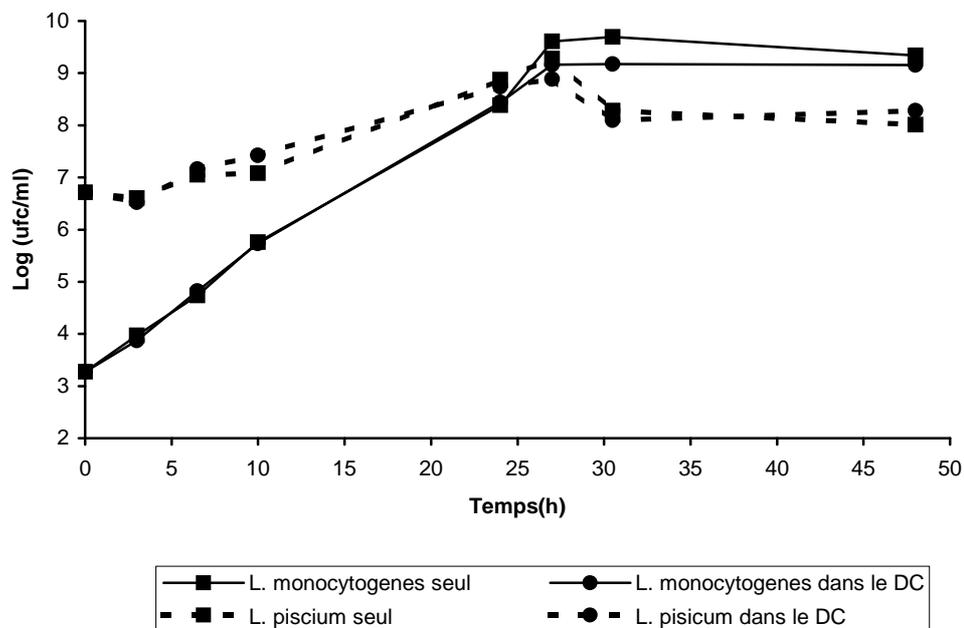


Figure 5 : Croissance de *L.monocytogenes* RF191 et *L. piscium* CNCM I-4031 sur milieu MSMA à 26°C en culture pure et en co-culture dans le système à double compartiment (DC)

3.5 Effet de la supplémentation par différents composés sur la reprise de croissance de *L. monocytogenes* en co-culture avec *L. piscium* CNCM I-4031

Les résultats des expérimentations précédentes nous ont montré que :

- *L. monocytogenes* n'est pas inhibée par la production d'acide lactique ou d'autres métabolites produits dans le surnageant de culture par *L. piscium* (pas d'inhibition en culture séquentielle).
- *L. monocytogenes* n'est pas inhibée par la production ou la consommation de composés lorsqu'elle est en co-culture avec *L. piscium* dans un système où les deux bactéries ne sont pas en contact mais peuvent échanger leurs substrats et leurs produits (pas d'inhibition dans le système à double compartiment).
- *L. monocytogenes* est inhibée lorsqu'elle est cultivée en présence de *L. piscium* dans le milieu MSMA, de la même façon que ce qui est observé sur matrice crevette.

Afin d'essayer de préciser la nature des interactions entre *L. piscium* et *L. monocytogenes* en co-culture, l'hypothèse d'une compétition nutritionnelle pour les principaux groupes de composés présents dans le milieu MSMA a été émise. Pour tester cette hypothèse, les différents groupes de composés pouvant être limitant pour la croissance de *L. monocytogenes*, acides aminés, bases, vitamines, glucose, ont été ajoutés après 24 h de co-culture entre les deux bactéries. Chaque groupe de composé a été ajouté de façon à obtenir la même concentration que celle présente initialement dans le milieu de culture. Les suivis de croissance de *L. monocytogenes* par dénombrement ont été repris pendant 24 h supplémentaires et comparés à celle des cultures témoin, ou d'une co-culture non supplémentée. Les résultats présentés figure 6, permettent de voir que dans les flacons supplémentés en acides aminés, vitamines, bases et avec l'ensemble de ces trois groupes de composés, aucune reprise de croissance de *L. monocytogenes* n'est observée, la population restant au même niveau que dans la co-culture non supplémentée tout au long de l'expérimentation. Les mesures de pH réalisées dans les différents flacons à la fin de l'expérimentation, montrent une baisse de pH de 7 au début de l'expérience à 6.2 après 48 h de culture. Ces résultats viennent infirmer l'hypothèse d'une compétition nutritionnelle pour les acides aminés, les vitamines ou les bases dans les mécanismes d'action impliqués dans l'inhibition de *L. monocytogenes* par *L. piscium*.

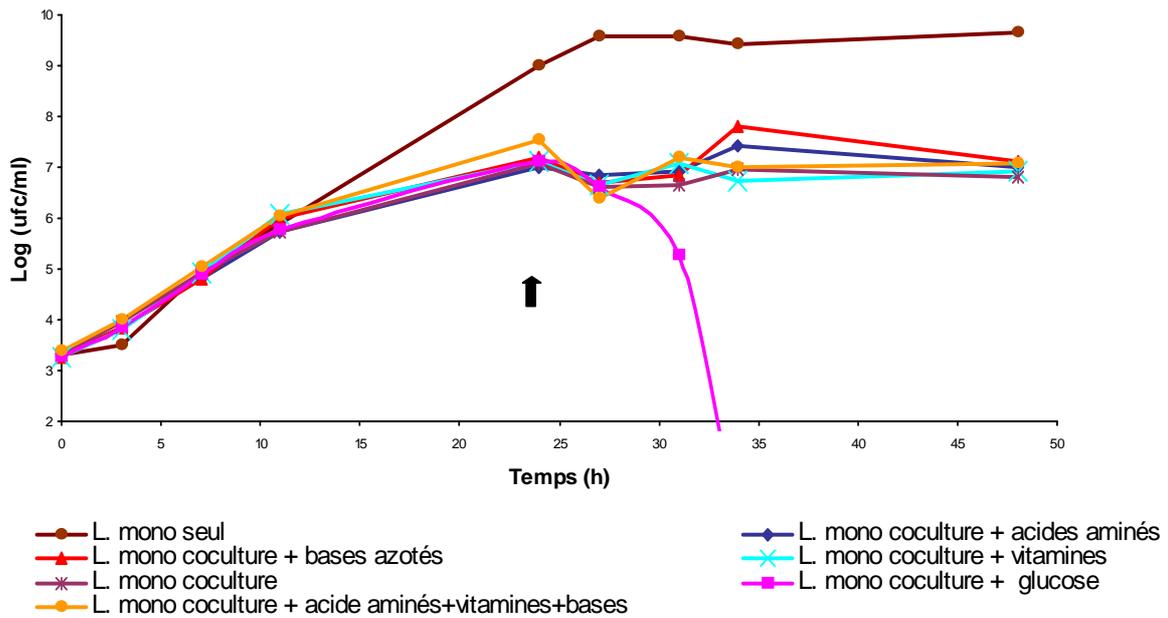


Figure 6 : Croissance de *L. monocytogenes* RF191 en co-culture avec *L. piscium* CNCM I-4031 sur milieu MSMA à 26°C après ajout des différents groupes de composés (la flèche indique le moment où ont été effectués les ajouts).

L'absence d'implication de la consommation des acides aminés dans l'interaction bactérienne entre ces deux souches est en cohérence avec les profils de consommation d'acides aminés sur MSMA observés pour les deux souches. Le même type de résultat a été obtenu dans l'étude de Alomar *et al.* (2008) qui n'ont pas réussi à élucider les mécanismes d'action entre *L. garvieae* et *S. aureus* dans le lait microfiltré en supplémentant le milieu avec un excès d'acides aminés. De la même façon, les travaux de Nilsson *et al.* (2005) ont montré que l'inhibition observée entre une souche de *L. monocytogenes* et une souche de *C. maltaromaticum* non productrice de bactériocine n'a pas pu être levée en supplémentant le milieu avec des acides aminés ou des vitamines. Dans cette même étude, la compétition pour le glucose dans l'inhibition de *L. monocytogenes* avait pu être clairement levée en supplémentant le milieu de croissance de *L. monocytogenes* par du glucose lors des co-cultures en système à double compartiment, ou en rajoutant du glucose dans le fermentat de *C. maltaromaticum* qui montrait une inhibition de la bactérie cible. Dans notre cas, la supplémentation en glucose n'a pu se tester que dans la co-culture où est observée l'inhibition. On observe que 6h après l'ajout de glucose, la population de *L. monocytogenes* décroît rapidement de 7.1 log UFC/ml à 5.3 log UFC/ml (figure 6). Au delà de ce point aucun dénombrement de cellules viable de *L. monocytogenes* n'est possible. Le pH final dans ce cas est de 4.23 ce qui explique probablement l'arrêt total de croissance de *L. monocytogenes*.

Quel que soit le groupe de composés ajouté, la population de *L. piscium* évolue de la même façon (figure 7). Des essais visant à tamponner davantage le milieu de culture n'ont pas été concluants (absence de croissance de la souche de *L. piscium*). Cette supplémentation ne nous a pas permis de tester réellement l'hypothèse d'une compétition pour le glucose qui devrait être testée à nouveau en conditions de pH régulé pour éviter de reproduire le phénomène observé. Bien que cette hypothèse ne puisse totalement être écartée en l'absence de résultats clairs sur ce sujet, les résultats obtenus dans le système à double compartiment et en cultures séquentielles suggèrent que la consommation du glucose par *L. piscium* n'est pas le facteur limitant la croissance de *L. monocytogenes*.

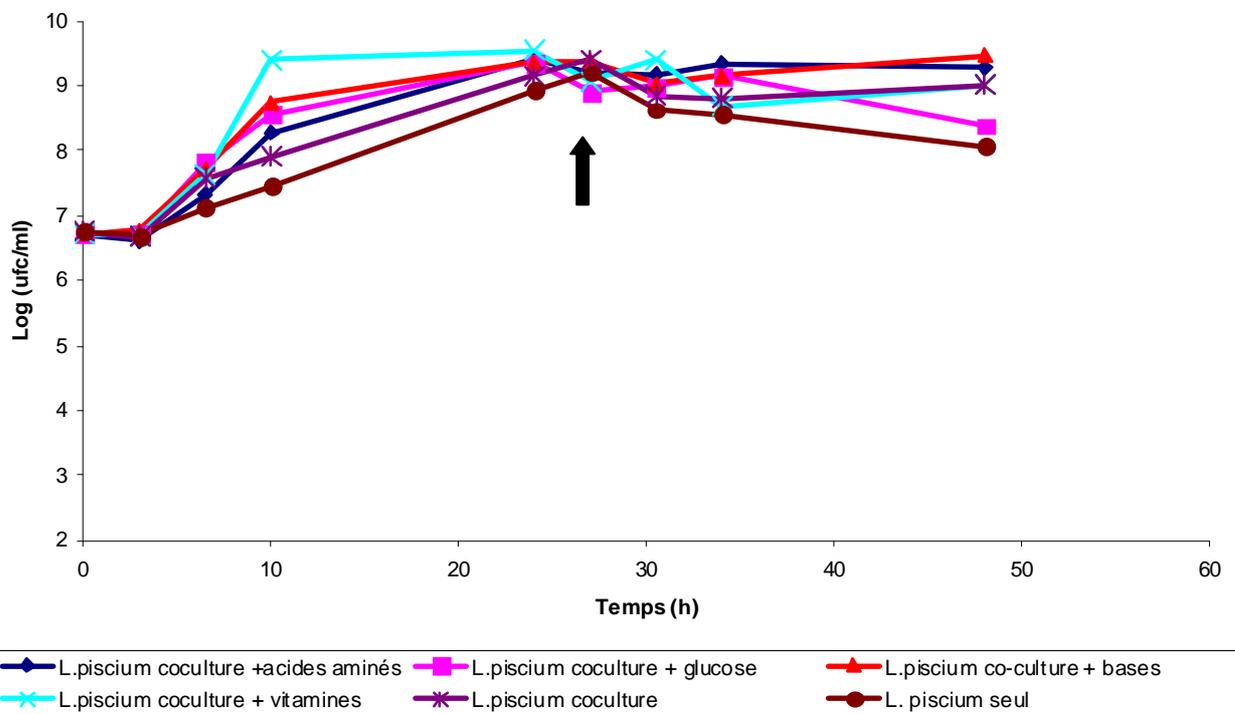


Figure 7 : Croissance de *L. piscium* CNCM-I4031 en co-culture avec *L. monocytogenes* RF191 sur milieu MSMA à 26°C, après ajout des différents groupes de composés (la flèche indique le moment où ont été effectués les ajouts).

L'ensemble de ces résultats nous amènent à formuler de nouvelles hypothèses comme l'intervention de mécanismes de communication cellulaire qui pourraient être à l'origine d'une modification du comportement de *L. piscium* lorsqu'elle est en contact avec la bactérie cible et contribuer ainsi à l'adaptation de son métabolisme ou à la production de composés inhibiteurs non détectés pour l'instant.

Conclusion & Perspectives

***L. piscium* CNCM I-4031 : une bactérie pour améliorer la qualité de la crevette tropicale?**

L'utilisation de bactéries pour améliorer la qualité des produits est un concept ancien qui se pratiquait de manière empirique, avec pour première fonction la conservation des aliments (lait, végétaux, viande) par fermentation acidifiante. Pour les produits de la mer, les techniques classiques de préservation utilisées traditionnellement étaient surtout le séchage, salage, fumage et marinage, ayant donné lieu à une gamme de produits dits légèrement transformés. La stabilisation de ces produits est maintenant améliorée par la réfrigération et la conservation sous atmosphère modifiée. Néanmoins, la plupart du temps, le maintien des qualités organoleptiques et de la sécurité microbiologique ne peut être assuré qu'en combinant ces procédés à l'utilisation d'additifs conservateurs. La réticence accrue des consommateurs pour ces composés, nécessite de développer des techniques alternatives plus compatibles avec l'image de produits « naturels » souvent associée aux produits de la mer. La biopréservation pourrait répondre à cette demande à condition de montrer une efficacité au moins équivalente voire supérieure aux techniques de préservation déjà mises en oeuvre. La maîtrise des flores d'altération et des bactéries pathogènes psychrotrophes est notamment un enjeu important pour le développement de ces procédés car ces micro-organismes sont très adaptés aux matrices alimentaires et aux procédés classiques de conservation. Cette étude s'est focalisée sur la maîtrise par le procédé de biopréservation de deux bactéries appartenant à ces deux catégories. *B. thermosphacta* a été récemment isolée au moment de l'altération des crevettes cuites décortiquées et désignée comme l'un des altérants majeurs de cette matrice à l'instar de *C. maltaromaticum* et *C. divergens* (Jaffrès *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2006; Mejlholm *et al.*, 2005). *L. monocytogenes* demeure le principal danger biologique à maîtriser sur les produits prêts à consommer dont la durée de vie est supérieure à 5 jours et même si aucune épidémie de listériose n'a pour l'instant impliqué des crevettes cuites, sa présence et son développement dans ces produits a été montré dans plusieurs études (Gudmundsdóttir *et al.*, 2006; Valdimarsson *et al.*, 1998).

Dans le chapitre 1, les travaux ont été engagés sur crevettes cuites décortiquées sous atmosphère protectrice et entreposées à 8°C pour tester le caractère bioprotecteur de *L. piscium* sur la crevette artificiellement contaminée par *B. thermosphacta*. Par cette application, il a été démontré que *L. piscium* et *B. thermosphacta* étaient des germes très adaptés à cette matrice lorsqu'ils sont inoculés en culture pure. Cependant, lorsque ces deux bactéries sont en co-inoculation, la croissance de *B. thermosphacta* est réduite de 4 log UFC/g par *L. piscium*, maintenant ainsi sa population à 10⁴⁻⁵ UFC/g. Sur les produits inoculés uniquement

par *B. thermosphacta*, le jury d'analyse sensorielle a déclaré les lots altérés au bout de 11 jours de stockage, correspondant à une population de 10^8 UFC/g, avec l'émission de fortes odeurs de beurre caramel. Les molécules associées aux odeurs décrites par le jury d'analyse sensorielle sont associées à la production par *B. thermosphacta* de 2,3 butanedione, cyclopentanol, 3-methylbutanol, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 4-methyl-3-chloro-3-pentanol, ethanol et diacétyl. Ces molécules ont déjà été associées à *B. thermosphacta* dans d'autres études sur la crevette (Laursen *et al.*, 2006; Jaffrés *et al.*, 2011). Par contre, il est intéressant de constater que certaines de ces molécules (diacétyl, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal) sont aussi produites par la souche protectrice sans que cela ne soit détecté par le jury d'analyse sensorielle. En effet, les lots inoculés avec *L. piscium* en culture pure ou en co-inoculation restent non altérés jusqu'à la fin des 31 jours d'entreposage. La détection de composés volatils comme le diacétyl qui semblait être à priori un marqueur intéressant de l'altération sensorielle (caractéristique de l'odeur beurre-caramel notée sur produits altérés) doit donc être utilisée de façon prudente car il est difficile de déterminer si les odeurs détectées sont liées à la quantité de molécule produite, à la combinaison de ces molécules entre elles ou avec d'autres composés du métabolisme.

Aucune différence sur l'odeur et la saveur n'a par ailleurs été notée par le jury entre le lot témoin non-ensemencé et les lots ensemencés avec *L. piscium*, malgré la production d'acide lactique par *L. piscium*. Ces résultats sont importants pour envisager l'utilisation de flores bioprotectrices qui doivent être le plus neutres possible sur les caractéristiques organoleptiques du produit. Par contre, si une application de la souche de *L. piscium* sur d'autres produits est envisagée, notamment des produits destinés à la cuisson comme les filets de poissons emballés sous atmosphère modifiée, des tests sur la saveur après cuisson devront être effectués pour vérifier que l'acidité ne nuit pas à la saveur ni à la texture du produit.

L'efficacité de *L. piscium* pour assurer la qualité organoleptique des crevettes cuites décortiquées a donc été démontrée car cette bactérie arrive à maintenir *B. thermosphacta* à un niveau de population très bas sans modifier la qualité organoleptique du produit frais. A notre connaissance, aucun auteur n'avait obtenu de résultats concluants sur le sujet. Laursen *et al.* (2006) avaient testé des souches de carnobactéries, sans succès pour limiter la croissance de *B. thermosphacta* sur la crevette cuite décortiquée. Les meilleures applications sur la limitation de la croissance de *B. thermosphacta* ont été obtenues sur matrice viande, mais au niveau organoleptique les souches utilisées donnaient une légère acidité au produit. Ces résultats nous ont permis d'expliquer en partie l'effet de *L. piscium* sur l'amélioration de l'altération sensorielle de la crevette cuite en montrant son efficacité à inhiber un des

microorganismes spécifiques d'altération. Cependant, il faut garder à l'esprit que d'autres bactéries participent à l'altération de ce produit comme *Carnobacterium maltaromaticum* (Jaffrès *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2006). Par ailleurs, selon les lots de produits et les procédés de fabrication, la composition de la flore d'altération peut être très variable. L'efficacité de *L. piscium* CNCM I-4031 doit donc être confirmée sur des produits naturellement contaminés issus de différentes productions, et pourrait être testée de façon plus spécifique vis à vis d'autres bactéries altérantes seules ou en mélanges. Des tests sur ce sujet sont actuellement en cours à l'Ifremer et à ONIRIS.

Il est nécessaire de comprendre les mécanismes d'action impliqués dans cette activité bioprotectrice. Les études réalisées dans ce sens, en faisant croître *B. thermosphacta* en présence de la quantité d'acide lactique produite par *L. piscium* ont démontré que ce composé n'était pas impliqué dans cette inhibition. Les profils de consommation en acides aminés ne semblent pas non plus aller dans le sens d'une compétition nutritionnelle pour ces composés. Les milieux chimiquement définis décrits dans le chapitre 3 et élaborés pour mieux comprendre les relations entre les deux bactéries, n'ont pas permis la croissance de *B. thermosphacta* et ne nous ont donc pas donné la possibilité d'étudier de façon plus approfondie les mécanismes d'interaction avec *L. piscium*. La mise au point de milieux plus proches de la matrice comme des jus de crevette enrichis en éléments nutritifs pourrait être une solution pour continuer ce travail. De même, une meilleure connaissance du métabolisme de cette bactérie particulièrement bien adaptée à la matrice crevette pourrait permettre de mieux cibler les composés nécessaires à sa croissance pour élaborer ces milieux. Des données génomiques sur *B. thermosphacta* apporteront probablement des informations pertinentes pour alimenter ces travaux. Néanmoins, sans comprendre les mécanismes d'action, l'optimisation de cette activité antibactérienne peut passer par la compréhension de leur comportement en fonction des paramètres physico-chimiques de la crevette cuite décortiquée qui a fait l'objet du chapitre suivant

Étudier l'effet des paramètres physico-chimiques pour optimiser cette activité bioprotectrice ?

Le comportement des souches de *L. piscium* et *B. thermosphacta* en fonction de la variation des paramètres température, NaCl et pH a été modélisé par l'approche définie par Sym'previus (www.symprevius.net). Les valeurs cardinales de croissance des bactéries ont été établies en milieu conventionnel de culture légèrement modifié et un modèle multiplicatif de croissance a été proposé. Une expérience en crevette cuite décortiquée a permis d'adapter spécifiquement le modèle à cette matrice. Le facteur "niveau initial d'ensemencement par *L. piscium*" ne pouvait pas être modélisé par cette approche. Son effet a donc été modélisé par la réalisation d'un plan d'expériences menées en matrice crevette à différentes conditions de niveau d'inoculum initial, de température et de sel. Ces tests en crevette ont également permis de modéliser l'effet des paramètres sur la qualité organoleptique du produit. Les tests en milieu liquide ont montré que les deux souches avaient des optima de croissance proches mais que *B. thermosphacta* tolérait une concentration en NaCl deux fois supérieure à celle de *L. piscium*. Ce résultat pose *a priori* le problème de l'application de *L. piscium* dans des produits ayant une salinité supérieure à 2% (WP) qui n'est pourtant pas apparu sur crevette ni sur saumon fumé (Matamoros *et al.*, 2009a). L'accumulation de composés à activité osmoprotectrice comme la glycine bêtaïne à partir des matrices marines, déjà montrée chez *S. putrefaciens* dans le saumon (Leblanc *et al.*, 2003), pourrait expliquer ce phénomène et permettre d'étendre les applications de la souche bioprotectrice à des produits contenant une teneur en sel supérieure à 2%. *L. piscium* est par ailleurs plus psychrotolérante que *B. thermosphacta* car elle a un optimum de croissance à 23°C et un minimum à -4.6 tandis que *B. thermosphacta* a son optimum de croissance à 27°C et un minimum à -3.6. Ces résultats confirment la très bonne adaptabilité de *L. piscium* aux basses températures qui peut être liée à la production de protéines d'adaptation au froid démontrée par Garnier *et al.* (2010).

Les applications sur crevettes ont montré qu'aucun des paramètres étudiés n'avait d'effet sur le nombre maximum de cellules de *L. piscium* et *B. thermosphacta* et que les valeurs obtenues étaient identiques. Cependant, un effet positif de la température a été observé sur leur taux de croissance lorsqu'elles étaient en cultures pures. Quelles que soient les conditions de sel et de température, le taux maximum de croissance de *L. piscium* sur crevette est toujours un peu plus rapide que celui de *B. thermosphacta*, conférant un avantage à la bactérie bioprotectrice pour son implantation dans la matrice. L'étude de l'impact des paramètres sur l'interaction entre les deux bactéries en co-inoculation sur la crevette révèle que plus le niveau d'inoculum initial de *L. piscium* est élevé plus l'inhibition de *B. thermosphacta* est importante.

En revanche, les échantillons sont jugés comme pas ou très faiblement altérés, que le taux initial de *L. piscium* soit de 3 Log UFC/g ou 7 Log UFC/g. Ces résultats montrent qu'il n'est pas nécessaire d'inoculer le produit avec une très forte concentration en flore bioprotectrice pour garantir la qualité sensorielle du produit pendant au moins 28 jours. Cela pose la question du mécanisme d'action de l'effet bioprotecteur de *L. piscium*. A la vue de ces résultats, il semble qu'inhiber la croissance de *B. thermosphacta* est peut-être l'unique solution pour garantir la qualité sensorielle des produits. *B. thermosphacta* peut atteindre des niveaux élevés qui, lorsque ce germe est seul, provoquent l'altération du produit. En revanche, à ces mêmes taux, la présence de *L. piscium* empêche la perception de mauvaises odeurs, ce qui laisse présager de phénomènes plus complexes de métabiose, ou de modification des odeurs lorsque certains composés volatils sont en mélange. Les effets du taux d'inoculum seraient pertinents à tester en produits naturellement contaminés. Si les résultats se confirment, cela pourrait permettre de limiter le coût lié à l'utilisation industrielle des ferments de biopréservation.

L'approche modulaire type Sym'previus est très intéressante en ce sens qu'elle permet de faire la plupart des expérimentations en milieu liquide avec des lecteurs automatisés de croissance. Une seule expérience en matrice alimentaire est nécessaire pour ensuite adapter le modèle à la matrice choisie. Ceci nous permettra par exemple de modéliser très rapidement le comportement des deux souches dans d'autres produits de la mer. Par ailleurs, par cette approche, les résultats obtenus sont normalement valables dans tout le domaine de croissance des bactéries. Cependant, il faut bien être conscient que les valeurs de μ_{\max} à basses températures (ou plus généralement dans les conditions ne permettant pas une forte croissance) sont difficiles à obtenir et présentent une plus forte variabilité que celles obtenues aux optima de croissance. Les produits de la mer sont conservés au froid, et la qualité du modèle finale sur produit dans ce domaine peut donc s'avérer parfois assez médiocre. La présence d'osmolites protecteurs des bactéries est normalement prise en compte dans le μ_{opt} produit. Cependant, dès que le taux de sel atteint une valeur supérieure à T_{\max} , le module gamma devient nul et le modèle prédit donc une absence totale de croissance, ce qui n'est pas le cas dans la réalité.

La modélisation des effets des facteurs directement en matrice alimentaire est beaucoup plus lourde. Par ailleurs, les résultats ne sont valables que dans le domaine d'étude et pas extrapolables à d'autres matrices. Cependant, il est possible de réduire le nombre d'expériences à réaliser en les organisant (plan d'expériences) de façon à garder un maximum de fiabilité des résultats (isovariance, orthogonalité etc). Par ailleurs, nous avons vu que

certains facteurs ou certaines réponses ne peuvent être étudiés qu'en matrice alimentaire. Dans nos travaux, nous avons choisi des modèles polynomiaux, qui ont donné de bons résultats. Cependant, les données seront retraitées ultérieurement avec d'autres utilisant des équations différentielles.

D'autres facteurs importants sur l'implantation de *L. piscium* dans la matrice et sur l'interaction avec *B. thermosphacta*, tels que le CO₂ ou la présence d'autres molécules à activité antibactérienne comme les acides organiques ou les extraits de plantes qui pourraient être utilisés en petites quantités en association avec les flores bioprotectrices, sont à étudier. Cela pourrait permettre d'élargir le domaine d'application à d'autres germes altérants comme des bactéries à Gram négatif que nous n'avons pas encore testées. Ces travaux pourraient être réalisés en fermenteur avec des conditions contrôlées.

***L. piscium* CNCM I-4031 pour assurer la sécurité des crevettes cuites décortiquée ?**

Assurer la sécurité des produits alimentaires est un enjeu essentiel pour tous les acteurs concernés. La présence de bactéries pathogènes comme *L. monocytogenes* y a été décrite par plusieurs auteurs (Gudmundsdóttir *et al.*, 2006; Valdimarsson *et al.*, 1998). Dans le produit fini, la présence de ces pathogènes est expliquée par une contamination croisée lors des étapes de transformation. Lutter contre ces germes est d'autant plus nécessaire que les techniques de préservation actuellement utilisées ne montrent pas toujours une grande efficacité (Heavin *et al.*, 2009; Mejlholm *et al.*, 2008).

Dans ce chapitre, l'activité inhibitrice de *L. piscium* a été testée sur crevettes cuites décortiquées stériles contaminées artificiellement par *L. monocytogenes*. Cette souche s'est très bien implantée dans cette matrice. En co-inoculation, une inhibition de 4 log UFC/g a été observée sur la croissance de *L. monocytogenes*. Une production d'acide L-lactique de 89 mM entraînant une baisse du pH de 6.6 à 5.9 a été mesurée dans le lot inoculé avec *L. piscium*. Une consommation de 56% du glucose a été observée en 3 jours dans les lots inoculés par *L. piscium* en culture pure ou en culture mixte, contre 17 jours dans le lot inoculé (à plus faible niveau) par *L. monocytogenes*. L'utilisation du logiciel Seafood Spoilage and Safety Predictor (<http://sssp.dtuqua.dk/>) a montré que la quantité d'acide lactique produite ne pouvait pas expliquer l'effet inhibiteur observé. L'inhibition observée avec *L. piscium* est moins importante que celle mise en évidence par Brillet *et al.* (2004) sur du saumon fumé avec la souche *C. divergens* V41 productrice de bactériocine. Néanmoins *L. piscium* n'est pas producteur de bactériocine, ce qui peut être un élément intéressant dans le cadre d'une future réglementation européenne qui pourrait prendre en compte ce critère.

Par ailleurs, l'effet de *L. piscium* à la fois sur des bactéries d'altération et des bactéries pathogènes présente un intérêt incontestable pour une application dans l'amélioration de la qualité et sécurité des produits de la mer.

Comprendre les mécanismes d'action impliqués dans l'inhibition de *L. monocytogenes*.

Les interactions entre bactéries bioprotectrices et les bactéries pathogènes ou altérantes ont souvent été liées à la production de bactériocines, d'acides ou de peroxyde d'hydrogène. Dans le cas d'interactions non liées à la production de composés inhibiteurs, les explications restent rares, en dehors de celle de Nilsson *et al.* (2005) dans laquelle l'inhibition de *L. monocytogenes* par *C. maltaromaticum* a été expliquée par une compétition pour le glucose. Nous avons décidé de mener une étude plus approfondie des mécanismes impliqués dans l'inhibition de la croissance de *B. thermosphacta* par *L. piscium* sur un milieu chimiquement défini. Les données recueillies dans le chapitre 1 sur la caractérisation de la crevette, combinées à des données de la littérature sur les exigences nutritionnelles de chaque souche, ont dans un premier temps été utilisées pour cette mise au point mais il s'est vite avéré que cette option ne permettait pas d'obtenir une composition satisfaisante. La difficulté d'une telle démarche résidait dans le fait de trouver un milieu commun permettant d'une part d'obtenir la croissance simultanée des deux souches étudiées, d'autre part de reproduire l'inhibition observée en matrice crevette, alors que très peu d'études sur ce type d'approche sont disponibles. Néanmoins, un milieu MSMA répondant à ces deux exigences a pu être élaboré dans lequel des essais de co-cultures ont montré une inhibition de 3 log UFC/ml de *L. monocytogenes* par *L. piscium*. Les analyses réalisées après croissance des souches sur ce milieu montrent que *L. monocytogenes* consomme pratiquement tous les acides aminés du milieu à l'exception de la proline et préférentiellement la glycine, la valine et l'histidine tandis que *L. piscium* ne consommerait que la cystéine, l'histidine et la glycine. L'hypothèse d'une compétition nutritionnelle pour les acides aminés est donc peu probable ce qui s'est confirmé par la suite en montrant que la supplémentation en acides aminés ne permettait pas de faire repartir la croissance de *L. monocytogenes* en co-culture. L'approche métabolomique utilisée de façon exploratoire dans cette étude nous a permis de montrer que les bases azotées sont totalement consommées par *L. piscium* et peu par *L. monocytogenes*. Les besoins en vitamines de deux souches semblent similaires, car la riboflavine est la seule vitamine consommée totalement par les deux souches. Pour ces composés, l'hypothèse d'une compétition nutritionnelle est donc également peu probable, et de façon plus large, l'ajout de mélanges de bases et de vitamines dans les cultures où l'inhibition avait été observée n'a permis aucune

amélioration de la croissance de *L. monocytogenes*. Dans le milieu MSMA après 48 h, la consommation de glucose est similaire pour les deux souches en culture pure ainsi que la production d'acide lactique. L'implication du glucose n'a pu être clairement définie, car son ajout en co-culture provoque une chute importante du pH entraînant l'arrêt de la croissance de *L. monocytogenes*. Des cinétiques de consommation du glucose par chaque souche pure et dans la co-culture restent à effectuer pour déterminer son rôle dans l'interaction, car la compétition pour la glucose a déjà été prouvée dans l'inhibition de *L. monocytogenes* par une souche de *C. piscicola* (Nilsson *et al.*, 2005). Des essais en fermenteur à pH régulé pourraient également être réalisés. Par contre, nous avons montré que l'inhibition de *L. monocytogenes* n'était obtenue qu'en co-culture avec contact cellulaire entre les bactéries. Aucune inhibition de *L. monocytogenes* n'a été observée dans le milieu MSMA préfermenté par *L. piscium* puis filtré sur 0.45 µm, pas plus quand les cultures étaient réalisées dans des flacons à doubles compartiments. Ceci va à l'encontre des résultats de Nilsson *et al.* (2005).

Une des approches envisagées pour poursuivre l'étude des interactions cellulaires était de caractériser la réponse protéomique de *L. monocytogenes* en présence de *L. piscium*. La récupération spécifique de *L. monocytogenes* en cultures compartimentées n'est donc pas envisageable et d'autres solutions devront être trouvées (séparation immuno-magnétique par exemple).

Pour finir...

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de démontrer le caractère bioprotecteur de la souche *L. piscium* CNCM I-4031 contre *B. thermosphacta* et *L. monocytogenes* dans la crevette tropicale cuite décortiquée. L'effet des facteurs environnementaux sur son activité anti-*B. thermosphacta* a également permis de déterminer les facteurs qui permettront d'optimiser cette interaction. Cependant, malgré les tests réalisés, les mécanismes d'action impliqués dans ces inhibitions restent inconnus à ce jour. Le fait que le contact cellulaire soit indispensable pour obtenir une inhibition laisse penser que d'autres mécanismes que la production de métabolites ou la compétition pour certains composés sont impliquées. Des phénomènes de communications cellulaires ont été déjà mis en évidence chez des bactéries lactiques (De Keersmaecker et Vanderleyden, 2003) et il a été montré qu'ils pouvaient être impliqués dans le comportement de cultures mixtes de levains de panification (Di Cagno *et al.*, 2009).

Il serait donc pertinent de déterminer si la production de composés participant aux communications intercellulaires est possible chez *L. piscium* CNCM I-4031 et s'ils permettent d'expliquer le comportement de cette souche et de *B. thermosphacta* en interaction.

**Références
Bibliographiques**

A

- Aasen, I.M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., Naterstad, K.** 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology* 87, 35-43.
- Abdalla, O.M., Davidson, P.M., Christen, G.L.** 1993. Survival of selected pathogenic bacteria in white pickled cheese made with lactic acid bacteria or antimicrobials. *Journal of Food Protection* 56, 972-976.
- Alomar, J., Loubiere, P., Delbes, C., Nouaille, S., Montel, M.C.** 2008. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiology* 25, 502-508.
- Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M.A., 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.
- Augustin, J.C., Carlier, V.** 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 56, 29-51.
- Augustin, J.C., Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L.** 2005. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1019-1042.

B

- Baranyi, J., Jones, A., Walker, C., Kaloti, A., Robinson, T., Mackey, B.** 1996. A combined model for growth and subsequent thermal inactivation of *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1029-1035.
- Barbosa, L.N., Rall, V.L.M., Fernandes, A.A.H., Ushimaru, P.I., Probst, I.D., Fernandes, A.** 2009. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 725-728.
- Benner, R.A., Otwell, W.S.** 1999. Seafood HACCP, safety, and quality on the internet: selected site list with brief descriptions. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 8, 3-9.
- Benner, R.A., Staruszkiewicz, W.F., Otwell, W.S.** 2004. Putrescine, cadaverine, and indole production by bacteria isolated from wild and aquacultured Penaeid shrimp stored at 0, 12, 24, and 36°C. *Journal of Food Protection* 67, 124-133.

- Bhugaloo.Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P., Marion, D.** 1996. Purification and amino acid sequences of Piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4410-4416.
- Borch, E., Kant-Muermans, M.L., Blixt, Y.** 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 103-120.
- Breidt, F., Fleming, H.P.** 1998. Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3159-3165.
- Brillet, A., Pilet, M.F., Prévost, H., Bouttefroy, A., Leroi, F.** 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Bacteriology* 97, 1029-1037.
- Brillet, A., Pilet, M.F., Prévost, H., Cardinal, M., Leroi, F.** 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 104, 309-324.

C

- Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., Barros-Velazquez, J.** 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food and Bioprocess Technology* 1, 43-63.
- Chinivasagam, H.N., Bremner, H.A., Thrower, S.J., Nottingham, S.M.** 1996. Spoilage pattern of five species of Australian prawns: deterioration is influenced by environment of capture and mode of storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 5, 25-30.
- Chinivasagam, H.N., Bremner, H.A., Wood, A.F., Nottingham, S.M.** 1998. Volatile components associated with bacterial spoilage of tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology* 42, 45-55.
- Cho, S.L., Nam, S.W., Yoon, J.H., Lee, J.S., Sukhoom, A., Kim, W.** 2008. *Lactococcus chungangensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1844-1849.
- Choi, Y.M., Kim, O.Y., Kim, K.H., Kim, B.C., Rhee, M.S.** 2009. Combined effect of organic acids and supercritical carbon dioxide treatments against nonpathogenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *E-coli* O157:H7 in fresh pork. *Letters in Applied Microbiology* 49, 510-515.
- Cobb, E.F., Vanderzant, C., Hanna, M.O., Chia-Ping, S.Y.E.H.** 1976. Effect of ice storage on microbiological and chemical changes in shrimp and melting ice in a model system. *Journal of Food Science* 41, 29-34.

Cordano, A.M., Rocourt, J. 2001. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. International Journal of Food Microbiology 70, 175-178.

Cornu, M., Beaufort, A., Rudelle, S., Laloux, L., Bergis, H., Miconnet, N., Sérot, T., 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

Dainty, R.H., Shaw, B.G., Harding, C.D., Michanie, S. 1979. The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. In: Russell A.D. and Fuller R. (Eds), Cold tolerant microbes in spoilage and the environment, SAB Technical Services, Vol. 13. Academic Press, London 83-100.

Dalgaard, A., Huss, H.H., Kittikun, A.H., Larsen, L. 1995. Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. International Journal of Food Microbiology 28, 101-113.

Dalgaard, P. 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. International Journal of Food Microbiology 26, 305-317.

Dalgaard, P. 2000. Freshness, quality and safety in seafoods. Flair Flow Europe Technical Manual F-FE 380A/00, 1-31.

Dalgaard, P., Buch, P., Silberg, S. 2002. Seafood spoilage predictor-development and distribution of a product specific application software. International Journal of Food Microbiology 73, 343-349.

Dalgaard, P., Gram, L., 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., 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., Leisner, J.J. 2003. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C. Journal of Applied Microbiology 94, 80-89.

De Keersmaecker, S.C.G., Vanderleyden, J. 2003. Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. Microbiology Comment 149, 1953-1956.

Delignette-Muller, M.L., Cornu, M., Pouillot, R., Denis, J.B. 2006. Use of Bayesian modelling in risk assessment: application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. International Journal of Food Microbiology 106, 195-208.

- Di Cagno, R., De Angelis, M., Coda, R., Minervini, F., Gobbetti, M.** 2009. Molecular adaptation of sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400 under co-cultivation with other lactobacilli. *Research in Microbiology* 160, 358-366.
- Dortu, C., Thonart, P.** 2009. Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement* 13, 143-154.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.** 1956. Method for determination of sugars and related substances. *Analyse Chemistry* 28, 350-356.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X., Boyaval, P.** 1999. 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., Dousset, X.** 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology* 47, 33-42.
- Duran, G.M., Marshall, D.L.** 2005. Ready-to-eat shrimp as an international vehicle of anti biotic-resistant bacteria. *Journal of Food Protection* 68, 2395-2401.

E

- EFSA** 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee (Question No EFSA-Q-2005-293). Adopted on 19 November 2007. *The EFSA Journal* 587, 1-16.
- EFSA** 2008. The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. *The EFSA Journal* 923, 1-48.
- Elmasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., Federighi, M.** 2007. Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 53, 813-821.

F

- Farber, J.M.** 2000. Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood products. *International Journal of Food Microbiology* 62, 247-251.
- Fall, P.A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F., Pilet, M.F.** 2010a. Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Letters in Applied Microbiology* 50, 357-361.
- Fall, P.A., Leroi, F., Chevalier, F., Guerin, C., Pilet, M.F.** 2010b. Protective effect of a non-bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 strain against *Listeria monocytogenes* in sterilized tropical cooked peeled shrimp. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 19, 84 - 92.

G

- Gardner, G.A.** 1980. *Brochothrix thermosphacta* (*Microbacterium thermosphactum*) in the spoilage of meats. Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity, 139-143.
- Garnier, M., Matamoros, S., Chevret, D., Pilet, M.F., Leroi, F., Tresse, O.** 2010. Adaptation to cold and proteomic responses of the psychrotrophic biopreservative *Lactococcus piscium* Strain CNCM I-4031. Applied and Environmental Microbiology 76, 8011-8018.
- Gecan, J.S., Bandler, R., Staruszkiewicz, W.F.** 1994. Fresh and frozen shrimp: A profile of filth, microbiological contamination, and decomposition. Journal of Food Protection 57, 154-158.
- Gimenez, B., Dalgaard, P.** 2004. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. Journal of Applied Microbiology 96, 96-109.
- Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S.** 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., Melchiorson, J.** 1996. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. Journal of Applied Bacteriology 80, 589-595.
- Gram, L., Trolle, G., Huss, H.H.** 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°) temperatures. International Journal of Food Microbiology 4, 65-72.
- Gudmundsdóttir, S., Gudbjörnsdóttir, B., Einarsson, H., Kristinsson, K.G., Kristjansson, M.** 2006a. Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants. Journal of Food Protection 69, 1304-1311.
- Gudmundsdóttir, S., Roche, S.M., Kristinsson, K.G., Kristjansson, M.** 2006b. Virulence of *Listeria monocytogenes* isolates from humans, smoked salmon, peeled shrimp, and their processing environments. Journal of Food Protection 69, 2157-2160.

H

- Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Morita, H.** 2003. Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. Applied and Environmental Microbiology 69, 3668-3671.
- Heavin, S.B., Brennan, O.M., Morrissey, J.P., O' Byrne, C.P.** 2009. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by acetate, benzoate and sorbate: weak acid tolerance is not influenced by the glutamate decarboxylase system. Letters in Applied Microbiology 49, 179-185.

Heu, M.-S., Kim, J.-S., Shahidi, F. 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry* 82, 235-242.

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

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

J

Jaffrès, E., Prevost, F., Joffraud, J.J., Dousset, X. 2010. *Vagococcus penaei* sp. nov., isolated from spoilage microbiota of cooked shrimp (*Penaeus vannamei*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prévost, H., Joffraud, J.J., Dousset, X. 2009. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 131, 20-29.

Jaffrès, E., Lalanne, V., Macé, S., Cornet, J., Cardinal, M., Sérot, T., Dousset, X., Joffraud, J.-J. 2011. Sensory characteristics of spoilage and volatile compounds associated with bacteria isolated from cooked and peeled tropical shrimps using SPME-GC-MS analysis. *International Journal of Food Microbiology In Press*.

Jameson, J.E. 1962. A discussion of dynamics of *Salmonella* enrichment. *Journal of Hygiene* 60, 193-207.

Jayaweera, V., Subasinghe, S. 1988. Some chemical and microbiological changes during chilled storage of prawns (*Penaeus indicus*). *FAO fisheries report* 401, 19-22.

Jensen, P.R., Hammer, K. 1993. Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis* *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4363-4366.

Jeppesen, V.F., Huss, H.H. 1993. Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C. *International Journal of Food Microbiology* 19, 179-186.

Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Anandaraj, R., Jeya Shakila, R., Sukumar, D. 2006. Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. *Food Microbiology* 23, 526-533.

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

Jorgensen, B.R., Gibson, D.M., Huss, H.H. 1988. Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish. *International Journal of Food Microbiology* 6, 295-307.

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

Juven, B.J., Barefoot, S.F., Pierson, M.D., McCaskill, L.H., Smith, B. 1998. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* FloraCarn L-2. *Journal of Food Protection* 61, 551-556.

K

Katla, T., Moretro, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L., 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.

L

Laghmari, H., El Marrakchi, A. 2005. Organoleptic and physical-chemical assessment of shrimp *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) stored in ice at ambient temperature. *Revue de medecine veterinaire* 156, 221-226.

Lalitha, K.V., Surendran, P.K. 2006. Microbiological quality of farmed tropical freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). *Journal of Aquatic Food Product Technology* 15, 72-82.

Lannelongue, M., Hanna, M.O., Finne, G., Nickelson, R., Vanderzant, C. 1982. Storage characteristics of finfish fillets (*Archosargus probatocephalus*) packaged in modified gas atmospheres containing carbon dioxide. *Journal of Food Protection* 45, 440-444.

Lauret, R., Morel-Deville, F., Berthier, F., Champomier-Verges, M., Postma, P., Ehrlich, S.D., Zagorec, M. 1996. Carbohydrate utilization in *Lactobacillus sakei*. *Applied Environmental Microbiology* 62, 1922-1927.

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

Leblanc, L., Leboeuf, C., Leroi, F., Hartke, A., Auffray, Y. 2003. Comparison between NaCl tolerance response and acclimation to cold temperature in *Shewanella putrefaciens*. *Current Microbiology* 46, 157-162.

Leroi, F. 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology* 27, 698-709.

Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J.J., 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., Cardinal, M. 1998. Study of the microbial ecology of cold smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 111-121.

Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., 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*, 578-587.

Lin, Y.T., Labbe, R.G., Shetty, K. 2005. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6, 453-458.

López-Caballero, M., Gonçalves, A., Nunes, M. 2002. Effect of CO₂/O₂-containing modified atmospheres on packed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *European Food Research and Technology* 214, 192-197.

M

Mahmoud, B.S.M., Yamasaki, K., Miyashita, K., Kawai, Y., Shin, I.S., Suzuki, T. 2006. Preservative effect of combine treatment with electrolysed NaCl solutions and essential oil compounds on carp fillets during convectional air -drying. *International Journal of Food Microbiology* 106, 331-337.

Malle, P., Poumeyrol, M. 1989. A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/ Total Volatile Basique Nitrogen. *Journal of Food Protection* 52, 419-423.

Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Kasbi Chadli, F., Cornet, J., Prevost, F., Pilet, M.F. 2009a. Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* 72, 365-374.

Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost, H., Leroi, F. 2009b. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* 26, 638-644.

Matches, J.R. 1982. Effects of temperature on the decomposition of pacific coast shrimp (*Pandalus jordani*). *Journal of Food Science* 47, 1044-1047.

Mc Clure, P.J., Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T.M., Roberts, T.A. 1993. A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology* 19, 161-178.

Mc Clure, P.J., Beaumont, A.L., Sutherland, J.P., Roberts, T.A. 1997. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes*. The effect on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *International Journal of Food Microbiology* 34, 221-232.

Mejlholm, O., Boknaes, N., 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.

Mejlholm, O., Dalgaard, P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology* 34, 27-31.

Mejlholm, O., Dalgaard, P. 2007. Modeling and predicting the growth of lactic acid bacteria in lightly preserved seafood and their inhibiting effect on *listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 70, 2485-2497.

Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., Dalgaard, P. 2010. Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* - An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *International Journal of Food Microbiology* 2010, 137-150.

Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M.B., Bøknæs, N., Koort, J., Björkroth, J., Dalgaard, P. 2008. Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* 124, 250-259.

Mendes, R., Gonçalves, A., Pestana, J., Pestana, C. 2005. Indole production and deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) decomposition. *European Food Research and Technology* 221, 320-328.

Métivier, A., Pilet, M.F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J.C., Marion, D., Cenatiempo, Y., Fremaux, C. 1998. Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology* 144, 2837-2844.

Michel, C., Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D.G., Lautraite, A., Tailliez, P. 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2947-2955.

Motes, M.L. 1991. Incidence of *Listeria* spp in shrimp, oysters and estuarine waters. *Journal of Food Protection* 54, 170-173.

N

Nilsson, L., Gram, L., 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., Gravesen, A. 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a non bacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* 98, 172-183.

Nilsson, L., Ng, Y.Y., Christiansen, J.N., Jorgensen, B.L., Grotnum, D., 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.

P

Pilet, M.F., Leroi, F. 2011. Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products. In: Lacroix, C., (Ed.), *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Woodhead Publishing Limited, Oxford 324-347.

Pin, C., Garcia de Fernando, G.D., Ordonez, J.A. 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4441-4447.

Premeratne, R.J., Lin, W.-J., Johnson, E.A. 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environment Microbiology* 57, 3046-3048.

Pridmore, R.D., Pittet, A.C., Praplan, F., Cavadini, C. 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. *FEMS Microbiology Letters* 283, 210-215.

R

Reilly, P.J.A., Twiddy, D.R. 1992. *Salmonella* and *Vibrio cholerae* in brackishwater cultured tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology* 16, 293-301.

Règlement (CE) n° 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal Officiel de l'Union Européenne* du 22/12/2005.

Règlement (CE) N° 1333/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires. *Journal Officiel de l'Union Européenne* du 31/12/2008.

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

Richard, C., Leroi, F., Brillet, A., Rachman, C., Connil, N., Drider, D., Pilet, M.F., Onno, B., Dousset, X., Prévost, H. 2004. Maîtrise du développement de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé: intérêt de la biopréservation par des bactéries lactiques. *Le Lait* 84, 135-144.

Rodgers, S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trends in Food Science and Technology* 12, 276-284.

Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62, 231-245.

Ross, T., McMeekin, T.A. 1991. Predictive microbiology - application of a square root model. *Food Australia* 43, 202-207.

Rosso, L. 1995. Modélisation et microbiologie prévisionnelle : élaboration d'un nouvel outil pour l'agroalimentaire. Thèse de l'Université Claude Bernard, Lyon I, France.

S

Sadok, S., Abdelmoulah, A., El Abed, A. 2004. Combined effect of sepia soaking and temperature on the shelf life of peeled shrimp *Penaeus kerathurus*. *Food Chemistry* 88, 115-122.

Sakala, R.M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C., Ogawa, M. 2002. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. *Journal of Applied Microbiology* 92, 173-179.

Sanjose, C., Fernandez, L., Palacios, P. 1987. Compositional changes in cold raw-milk supporting growth of *Pseudomonas fluorescens* NCDO-2085 before production of extracellular proteinase. *Journal of Food Protection* 50, 1004-1008.

Schleifer, K.H., Klipper.Balz, R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*. *Systematic Applied Microbiology* 10, 1-19.

Shubha, G., Otta, S.K., Sanath, K., Indrani, K., Nishibuchi, M., Iddya, K. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 102, 151-159.

Stanley, G., Shaw, K.J., Egan, A.F. 1981. Volatile compounds associated with spoilage of vacuum packaged sliced luncheon meat by *Brochothrix thermosphacta* *Applied and Environmental Microbiology* 41, 816-818.

Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., Leroi, F. 2001. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* 34, 797-806.

T

Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I. 2009. Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Food Microbiology* 26, 783-793.

Tsironi, T., Dermesonlouoglou, E., Giannakourou, M.C., Taoukis, P.S. 2009. Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. *LWT - Food Science and Technology* 42, 664-671.

V

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

Vanderzant, C., Cobb, B.F., Thompson, C.A., Parker, J.C. 1973. Microbial flora, chemical characteristics and shelf life of four species of pond reared shrimp. *Journal of Milk and Food Technology* 36, 443-449.

Vescovo, M., Scolari, G., 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.

W

Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S., von Wright, A. 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science and Technology* 15, 498-505.

Wijtzes, T., Mc Clure, P.J., Zwietering, M.H., Roberts, T.A. 1993. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 18, 139-149.

Williams, A.M., Fryer, J.L., Collins, M.D. 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters* 68, 109-114.

Y

Yamagata, M., Low, L.K. 1995. Banana shrimp, *Penaeus merguensis*, quality changes during iced and frozen storage. *Journal of Food Science* 60, 721-726.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., 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.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., Montville, T.J. 2005. Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, pisciocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Applied and Environment Microbiology* 71, 554-557.

Yang, Z., Jiao, X., Li, P., Pan, Z., Huang, J., Gu, R., Fang, W., Chao, G. 2009. Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. *Food Microbiology* 26, 606-614.

Z

Zhang, H., Banaszak, J.E., Parameswaran, P., Alder, J., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E. 2009. Focused-Pulsed sludge pre-treatment increases the bacterial diversity and relative abundance of acetoclastic methanogens in a full-scale anaerobic digester. *Water Research* 43, 4517-4526.

Zhou, K., Fu, P., Li, P.L., Cheng, W.P., Liang, Z.H. 2009. Predictive modeling and validation of growth at different temperatures of *Brochothrix thermosphacta* *Journal of Food Safety* 29, 460-473.

Zwietering, M.H., de Wit, J.C., Notermans, S. 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55-70.