

VIANDES BOVINES À LONGUE DURÉE DE CONSERVATION CONDITIONNÉES SOUS VIDE : ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE SOUCHES DE *CARNOBACTERIUM*

**IMAZAKI P.H.¹, TAHIRI A.¹, RODRIGUES A.¹, TAMINIAU B.¹, NEZER C.², DAUBE G.¹,
CLINQUART A.¹**

¹ **Université de Liège, Département des Sciences des Denrées alimentaires, Sart Tilman B43b,
4000 Liège, Belgique**

² **Quality Partner, Rue Hayeneux, 62, 4040 Herstal, Belgique**

Abstract : Isolation and characterization of *Carnobacterium* from long shelf-life vacuum-packed beef

The lactic acid bacteria *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* are often associated to meat and meat products and may be used as a protective culture, improving the microbial stability and the safety of these products. In this context, the aim of this study was to isolate and characterize *Carnobacterium* from long shelf-life vacuum-packed beef. LAB counts after culture at +22°C remained below 2.0 log UFC/cm², even at the end of shelf life. On the other hand, the ecosystem evaluation performed by metagenomics revealed the predominance of *Carnobacterium* and *Lactobacillus* on the samples. After spreading of a peptone water suspension obtained from the samples on PCA, pure isolates were collected and identified by API 50 CHL galleries. Seventy-eight % of isolates were *C. maltaromaticum*, 3 % *C. divergens* and 19 % could not be identified. The next step of this work will consist in performing a genotypic and functional characterization of these *Carnobacterium* isolates.

Introduction

Le conditionnement de la viande sous vide associé à une température de conservation proche du point de congélation permet des conservations de très longue durée, jusqu'à plusieurs mois (Jeremiah et Gibson, 2001), ce qui rend possible le commerce de la viande à l'échelle de la planète sans recourir à la surgélation. Outre le type de conditionnement et la température de conservation, la durée de vie d'une viande est directement liée à sa qualité microbiologique initiale (Nychas *et al.*, 2008) et à l'évolution de l'écosystème microbien associé à celle-ci.

Un grand nombre de bactéries lactiques associées à la viande sont connues comme d'importants producteurs de bactériocines (Castellano *et al.*, 2008). Ces bactériocines sont des peptides présentant une activité bactéricide ou bactériostatique contre d'autres souches, espèces ou genres bactériens. De cette manière, la présence de certaines bactéries lactiques dans la viande fraîche pourrait prolonger la durée de conservation, et améliorer la stabilité microbienne et la sécurité de ce produit.

Le genre *Carnobacterium* fait partie des bactéries lactiques et est composé de huit espèces, mais seulement les espèces *Carnobacterium divergens* et *Carnobacterium maltaromaticum* sont généralement associées à la viande (Hugas, 1998 ; Nieminen *et al.*, 2011). Même si ces deux espèces peuvent être utilisées en tant que flore de protection, la production de bactériocines n'est pas un pré-requis à leur capacité bioprotectrice. (Laursen *et al.*, 2005). Cependant, Leisner et collaborateurs (1995) ont constaté que le genre *Carnobacterium* peut être lié à des phénomènes d'altération de la viande.

Dans ce contexte, cette étude a pour objectif d'isoler et de caractériser *Carnobacterium* à partir de viandes bovines fraîches à longue durée de conservation sur lesquelles une étude de l'écosystème microbien avait été préalablement réalisée.

Matériel et méthodes

Deux lots composés de trois contre-filets (muscle *longissimus dorsi*) d'origine australienne emballés sous vide, affichant une durée de vie commerciale (DVC) de 140 jours, ont été fournis par un grossiste localisé en Région wallonne (Belgique). Après réception dans le laboratoire, les échantillons ont été découpés en tranches ; celles-ci ont été reconditionnées sous vide, et conservées à -1 °C jusqu'aux 2/3 de la DVC (93 jours) et puis à +4 °C jusqu'à la fin de la DVC. Aux 2/3 et à la fin de DVC, 25 g de viande ont été homogénéisés dans 225 mL d'eau peptonée, et des dénombrements des bactéries lactiques après incubation à +22 °C ont été réalisés par la méthode automatisée TEMPO[®]. La diversité bactérienne des échantillons a été évaluée par approche métagénomique (extraction de l'ADN total, amplification du gène codant pour l'ARNr 16S, pyroséquençage, analyse des données). La caractérisation des souches isolées a été réalisée à l'aide de galeries API 50 CHL.

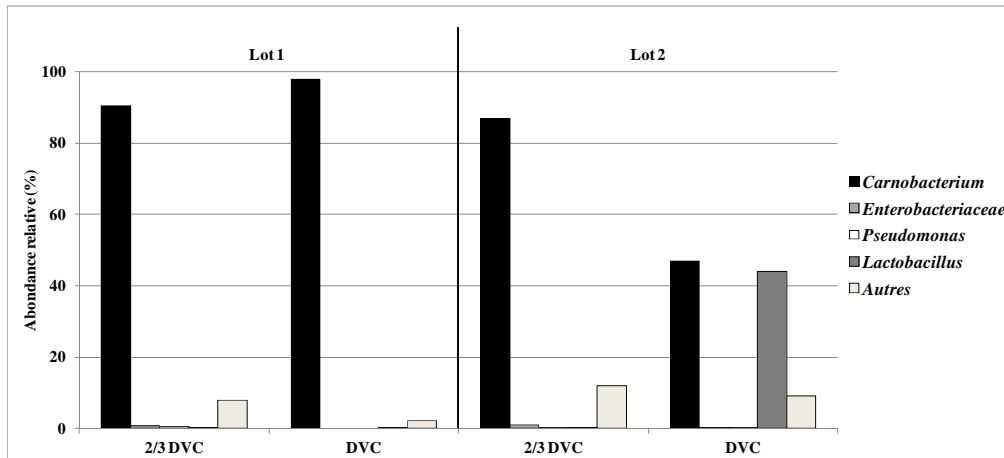
Résultats et discussion

Dénombrement des bactéries lactiques. Le nombre des bactéries lactiques des deux lots est resté sous le seuil de dénombrement, à savoir 2,0 log UFC/cm², pendant toute la période de conservation. La présence de bactéries lactiques

en grand nombre étant très probable dans ce type de viande (Dainty et Mackey, 1992), l'hypothèse qui a été émise est la présence, dans ces échantillons, de bactéries lactiques adaptées à des températures plus faibles que celle qui est appliquée (+22°C) au cours du processus analytique réalisé par le TEMPO[®]. Ceci est un exemple de biais qui peut être lié à l'approche analytique classique (culture/dénombrement) et qui peut être évité par l'approche métagénomique puisque celle-ci ne nécessite pas une phase de culture préalable.

Évaluation de la diversité bactérienne. Dans le but d'étudier l'écosystème microbien associé aux viandes étudiées et aux conditions de conservation qui leur ont été appliquées, une analyse par approche métagénomique ciblée a été réalisée. En raison du coût élevé de ce type d'analyse, un « pool » équimolaire de l'ADN extrait des 3 échantillons d'un même lot a été réalisé (figure 1).

Figure 1. Abondance relative de gènes d'origine bactérienne dans deux lots de viandes bovines conditionnées sous vide déterminée aux 2/3 (2/3 DVC) et à la fin (DVC) de leur durée de vie commerciale.



Il a été observé une faible diversité de la population bactérienne dans les deux lots étudiés, où on constate une prédominance des bactéries lactiques (en particulier des genres *Carnobacterium* et *Lactobacillus*) pouvant jouer un rôle bioprotecteur. Après une analyse plus approfondie des données, un seul génotype de *Carnobacterium* et de *Lactobacillus*, respectivement, a été plus souvent détecté sur les viandes, ce qui pourrait indiquer la présence d'une flore protectrice, ajoutée ou non.

Isolement et caractérisation des souches de *Carnobacterium*. A partir des suspensions-mère des échantillons homogénéisés dans de l'eau peptonée, des étalements sur gélose PCA ont été réalisés. Après 48 h d'incubation à +22 °C, 32 colonies ont été sélectionnées de manière aléatoire et deux isollements successifs sur gélose PCA ont été réalisés dans le but d'obtenir des souches pures. Les 32 colonies pures obtenues ont été caractérisées à l'aide de galeries API 50 CHL. Vingt-cinq isolats (78 %) ont été identifiés comme étant *C. maltaromaticum*, 1 isolat (3 %) a été identifié comme étant *C. divergens* et 6 isolats (19 %) n'ont pas pu être identifiés.

Conclusions

Les techniques classiques d'analyse microbiologique (par culture et dénombrement) ne permettant pas de mettre en évidence les microorganismes qui ne se développent pas sur le milieu utilisé et à la température employée, une évaluation de la diversité bactérienne par approche métagénomique a donc été envisagée. Cette approche permet de mettre en évidence une gamme plus large de bactéries présentes dans un aliment, ce qui constitue un avantage majeur.

Ce travail a permis d'isoler et de caractériser sur galerie API 50 CHL *C. divergens* et *C. maltaromaticum*. Etant donné que ces isolats proviennent des viandes à très longue durée de conservation, il est fort probable qu'il s'agisse des souches ayant des propriétés bioprotectrices. L'étape ultérieure de cette étude consistera en réaliser une caractérisation génotypique et fonctionnelle des ces isolats.

Cette étude a été financée par la Direction générale opérationnelle Agriculture, Ressources naturelles et Environnement (DGARNE) de la Région wallonne – Projet D31-1275.

Castellano P., Belfiore P., Fadda S., Vignolo G., 2008. Meat Sci., 79, 483-499.

Dainty R.H., Mackey B.M., 1992. J. Appl. Bact., 73, 103S-114S.

Jeremiah L.E., Gibson L.L., 2001. Food Res. Int., 34, 815-826.

Hugas M., 1998. Meat Sci., 49, S139-S150.

Laursen B.G., Bay L., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Swings J., Dalgaard P., Leisner J.J., 2005. Syst. Appl. Microbiol., 28, 151-164.

Leisner J.J., Greer G.G., Dilts B.D., Stiles M.E., 1995. Int J Food Microbiol, 26, 231-243.

Nieminen T.T., Vihavainen E., Paloranta A., Lehto J., Paulin L., Auvinen P., Solismaa M., Björkroth K.J., 2011. Int. J. Food Microbiol., 144, 360-366.

Nychas G.-J. E., Skandamis P.N., Tassou C.C., Koutsoumanis K.P., 2008. Meat Sci., 78, 77-89.