

**COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE**  
**ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE**  
**FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBOUX**

**SELECTION ET CARACTERISATION DE SOUCHES BACTERIENNES APTES A  
AMELIORER LA TECHNIQUE DE CONSERVATION DES POISSONS PAR  
SALAISON AU SENEGAL**

**Michel Bakar DIOP**

**Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences  
Agronomiques et Ingénierie Biologique**

**PROMOTEURS**

P. THONART (CWBI-FUSAGx, Belgique)

A. NGOM (ESP-UCAD, Sénégal)

**2008**

**DIOP Michel Bakar (2008). Sélection et caractérisation de souches bactériennes aptes à améliorer la technique de conservation du poisson par salaison au Sénégal, Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. p. 213; Figures : 29 ; Tableaux : 25**

### **Résumé**

Une recherche de souches bactériennes lactiques productrices de bactériocine a été entreprise à partir d'aliments traditionnels d'origine sénégalaise et les souches les plus actives ont été mises en œuvre comme barrière en supplément du sel (NaCl) contre la croissance de la flore contaminante de différents poissons maigre [sompat (*Pomadasy jubelini*)], moyennement gras [capitaine (*Polydactylus quadrifilis*)], et gras [mâchoiron (*Arius heudeloti*)] de production artisanale au Sénégal.

La prévalence des bactéries lactiques a été déterminée à  $10^9$  UFC/(g ou ml) dans les produits fermentés traditionnels à base de céréale et de lait, et  $10^3$  UFC/g dans les produits de la pêche fermentés. Douze souches bactériennes à activité inhibitrice de type bactériocine ont été détectées au sein de 220 souches de bactéries lactiques isolées de 32 échantillons de ces différents types de produits. Les 11 souches ont été caractérisées (API 50 CH, 16S rDNA) comme étant des souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* qui portent le gène codant pour la nisine, la souche restante est une souche d'*Enterococcus faecium* et possède le gène codant pour l'Entérocoque B. Les deux souches, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1410, isolée de farine de mil fermentée et productrice de nisine, et la souche *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 provenant de la collection du CWBI de la FUSAGx, produisant trois bactériocines de type curvalicine 28<sub>a, b et c</sub>, ont été mises en œuvre en combinaison avec du sel comme barrière contre la croissance de la flore contaminante dans les poissons.

La flore totale dans les poissons de production artisanale atteignait 5,70 log UFC/g. La transformation des poissons par fermentation naturelle à 30°C (sans traitement préalable : procédé traditionnel), entraîne une prolifération de bactéries Gram-négatives comme *Proteus* sp, *Shewanella putrefaciens* et des souches de *Bacillus* sp qui atteignent  $10^{9-10}$  UFC/g en moins de 24 h dans les produits. L'utilisation de CWBI-B1410 ( $10^7$  UFC/g) comme ferment avec ajout de glucose (1% m/m) dans les filets, entraîne une production *in situ* de substances antagonistes (acides organiques et bactériocine). Il en résulte une réduction du niveau de la flore contaminante entérique de 2 (*P. quadrifilis*) et de 4 (*P. jubelini*) log UFC/g par rapport aux poissons préparés traditionnellement. L'ajout de sel dans des produits ainsi fermentés réduit la flore entérique.

L'addition des surnageants de culture neutralisés (pH 6) bactéricides issus de CWBI-B1410 ou de CWBI-B28 en combinaison avec du chlorure de sodium (0,14 g/ml) sur les filets crus (100 ml/100 g) incubés à 10°C réduit le niveau de la contamination bactérienne de 1,5 log UFC/g et retarde l'augmentation de la flore qui reste à un niveau  $< 10^6$  UFC/g pendant 13 à 18 jours d'incubation à 10°C selon le type de poisson, alors que pour les filets contrôles, traités avec des surnageants de culture neutralisés de souches non productrices de bactériocines (*Lactobacillus curvatus* LMG 21688 et *Lactococcus lactis* LMG 6890) salés (NaCl 0,14 g/ml), la flore contaminante dépasse  $10^6$  UFC/g au bout de 3 à 7 jours. Les effets antibactériens des surnageants de cultures neutralisés bactéricides et salés (NaCl 0,14 g/ml), sont par ailleurs, plus importants que ceux d'une solution salée (NaCl 0,14 g/ml) supplémentée de sels de benzoate et de sorbate en concentration de 0,5 mg/ml chacun sur les poissons riches en lipides.

Ces résultats suggèrent que, la combinaison des effets antibactériens des bactéries lactiques productrices de bactériocines et du sel, plus particulièrement l'utilisation de SCN salés, comme préservatifs, peut constituer un moyen approprié d'amélioration de la conservation et de la qualité microbiologique des produits de la pêche artisanale au Sénégal. Le traitement des poissons selon l'une ou l'autre des stratégies décrites précédemment, combiné à un système de séchage devrait permettre de produire des produits halieutiques traditionnels de meilleures qualités microbiologiques et de durée de conservation plus longue, justifiant l'importance de continuer cette étude sur l'amélioration de la productivité de bactériocine par CWBI-B1410, et les impacts des nouveaux traitements sur les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits.

**Mots-clés:** Bactéries lactiques ; *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus curvatus*; 16S ADNr; Prepeptides ; Bactériocines ; Nisine ; Curvalicine 28 ; Antibactérien, Poissons de Production Artisanale ; Fermentation ; Contamination Bactérienne ; Chlorure de Sodium ; Barrières, Qualité Bactérienne.

**DIOP Michel Bakar (2008). Selection and characterisation of bacterial strains capable of enhancing the process of fish preservation by salting in Senegal, PhD Thesis, Gembloux Agricultural University. p. 213; Figures : 29 ; Table : 25**

### **Abstract**

A screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Senegalese traditional food products was undertaken and the most active strains were tested in combination with sodium chloride as barrier to control spoilage bacteria growth on different artisanal fish products [lean sumpat grunt (*Pomadasy jubelini*), moderately fat giant African threadfin (*Polydactylus quadrifilis*) and fat smoothmouth sea catfish (*Arius heudeloti*)] in Senegal.

The prevalence of lactic acid bacteria was determined at  $10^9$  CFU/(g or ml) in traditional fermented cereals and fermented milk products, and  $10^3$  CFU/g in fermented seafood products. Twelve bacteriocin-producing strains were detected of 220 lactic acid bacteria strains randomly selected from such products. The eleven were characterized (API 50CH and 16S rDNA) as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains and contain gene encoding nisin, and the remaining one an *Enterococcus faecium* strain which contains gene encoding Enterocin B. Two strains, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1410, a nisin producer isolated from fermented millet flour from Senegal, and *Lactobacillus curvatus* CWBI B28 which produces three bacteriocins (Curvalicin 28<sub>a, b et c</sub>) from CWBI collection, were tested in combination with sodium chloride as barrier to control spoilage bacteria growth on fish from artisanal production.

The total bacterial counts of fishes reached 5.7 log CFU/g. The processing of such products by natural fermentation at 30°C (without any preliminary treatment as in traditional process) result in proliferation of Gram-negative bacteria such as *Proteus* sp and *Shewanella putrefaciens*, and some *Bacillus* sp strains, which reached  $10^{9-10}$  CFU/g in products within less than 24 h of incubation. When using CWBI-B1410 living culture ( $10^7$  CFU/g) with glucose (1% wt/wt) supplementation as barrier against bacterial growth in fishes, a depression of the pH as well as a bacteriocin-like activity were noted, resulting in a decrease of the Gram negative strains counts of 4 log CFU/g (*P. jubelini*) and 2 log CFU/g (*P. quadrifilis*) in comparison to fishes prepared in using traditional process. The addition of salt in such fermented products reinforced the antimicrobial effect by CWBI-B1410 strain.

The addition of neutralized (pH 6) culture supernatants of CWBI-B1410 or CWBI-B28 strains in combination with sodium chloride (0.14 g/ml) as preservatives on fishes (100 ml/100 g) incubated at 10°C, declined the level of total bacterial counts of 1.5 log CFU/g within 48 h, and delayed the increase of bacteria number in fishes: bacterial counts remained under  $10^6$  CFU/g for 13 to 18 days of storage at 10°C following the fish, whereas they were over  $10^6$  CFU/g after 3 to 7 days fish storage at 10°C in controls, treated with salted (NaCl 0.14 g/ml) neutralized (pH 6) culture supernatants of non-bacteriocin producers (*Lactococcus lactis* LMG 6890 and *Lactobacillus curvatus* LMG 216888). The antimicrobial effects by salted neutralized culture supernatants of the bacteriocin producers were higher to those of salted solution (NaCl 0.14 g/ml) supplemented with benzoate and sorbate acid salts each at concentration of 0.5 mg/ml on the moderate and fat fishes.

These data suggest that the use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in combination with sodium chloride as described above, particularly the use of salted bacteriocin culture supernatant, as preservatives, can be a suitable strategy to enhance the storage and the bacterial quality of traditional fish products in Senegal. The treatment of fishes in using one of the strategies as described above combined with a drying process could permit production of seafood commodities with higher bacterial quality and time of storage, justifying to continue this investigation on the enhancement of the bacteriocin-productivity by CWBI-B1410, and the evaluation of the effects of the new treatments on the organoleptic and nutritional quality of products.

**Key-word:** Lactic Acid Bacteria; *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus curvatus*; 16S rDNA; Prepeptides; Bacteriocins; Nisin; Curvalicin 28; Antibacterial; Artisanal Fish Products; Fermentation; Bacterial Spoilage; Sodium Chloride; Barriers; Bacterial Quality.

© *Copyright*. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière que se soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et des modifications ultérieures.

Je dédie ce travail:

A notre ***Dame de Mont-Rolland*** ;

Aux moments les plus difficiles et les plus solitaires de ce parcours, les merveilleuses litanies apprises dans cette Eglise de Mont Rolland dans ma jeunesse, ont été mes meilleurs réconforts.

A ma ***mère Anna yacine CISS*** et à mon ***beau-père Raphaël GUEYE*** ;

Pour tous les sacrifices consentis, pour les vertus de patience et de persévérance dans le travail que vous m'avez enseignées.

A mon regretté ***père Jean Loukhous DIOP*** ;

Que la terre du Ndut te soit légère.

A mon regretté ***grand-père Pierre Birame CISS*** ;

Dès ma tendre enfance, tu me faisais déjà comprendre qu'il faut toujours être persévérant, particulièrement dans les moments difficiles.

Que la terre du Ndut te soit légère.

A mon regretté ***frère Dominique DIOP*** ;

Tu as guidé mes premiers pas sur le chemin de l'école, et tu avais entrepris de me donner tous les moyens nécessaires pour ma réussite scolaire. Le Destin en a décidé autrement.

Que la terre du Ndut te soit légère.

A tous ***mes frères et sœurs*** ;

Merci pour votre soutien moral et financier durant ce parcours.

A mon ***Epouse Viviane Marie Solange MBENGUE DIOP*** et à mon ***fils Jacques Raphaël Amar DIOP*** ;

Pour tous les sacrifices, la patience, et les encouragements sans lesquels ce travail ne saurait aboutir.

A tous ***ceux qui oeuvrent à la généralisation de l'accès au savoir et à la connaissance*** à travers le monde particulièrement dans les Pays et les Familles en difficulté.

## **Remerciements**

Au Professeur P. THONART du CWBI de la FUSAGx, Promoteur Nord, et à Mr El H. A. NGOM Directeur de l'ESP, promoteur SUD ;

Pour la confiance que vous avez placée en moi en me confiant ce travail.

A la CUD, qui a financé mes études doctorales.

Aux Docteurs :

Emmanuel TINE (Laboratoire L-Magi, ESP, Dakar), Jacqueline Destain (CWBI-FUSAGx), Robin Dubois-Dauphin (CWBI-FUSAGx) ;

Pour vos conseils, vos suggestions et votre aimable collaboration.

Aux autres membres du jury, en particulier à Mr D. Portetelle de me faire l'honneur de juger cette thèse, à Mr G. Lognay et à Mr B. Wathelet pour leur disponibilité.

A mes collègues du sous-groupe bactériocine, le Dr H. Galfi, Carine Dortu, Anna Aguilar et Privat Kouakou ;

Pour votre aimable collaboration.

Au Professeur Van Beumen et à son assistante Isabelle de l'Université de Gand/ Département de Biochimie ;

Pour votre disponibilité et votre aimable collaboration.

A Madame Marina Chanet et à toute sa famille ;

Pour tous ces merveilleux moments passés ensemble.

A Marguerite ;

Pour ta disponibilité.

A mes collègues de bureau, Fabienne, Annick, Lamia, Magalie, et Christophe ;

Pour tous les moments formidables de rigolades.

A Martine, Annick, Samuel, Benoit, Dominique, Caty, Mireille, Antoine, Khady, Mohamed Cissé, Mohamed, Ibrahim, Cedric, Charles; Jean Marc, Frank, Marc, Laurent, Danielle, Dominique, Francine, Michel, Venant, Guillaume ;

Pour tous ces moments d'échanges très enrichissants.

A Alphonse Diedhiou et son épouse Celestine, Thomas (Bruxelles - Belgique) et à toute la communauté sénégalaise à Gembloux (Bintou Diouf, Tanor Ndao, Djibril Sarr, Ousseynou Coly, Khady Ba Sy, Christine Moreira), aux familles Fall et Dramé et à Anne Totté et sa famille (Gembloux – Belgique) ;

Pour tous ces merveilleux moments de discussions politiques, et de partage de notre fameux « tièb » national.

A Jacques et Collette de St Gérard (Belgique), à mes collègues Katy et Josiane (Sauvenière - Belgique) membres fondateurs de l'ASBL les « Etoiles de l'espoir », et à la famille HUHN à Canzo (Italy) ;

Pour votre disponibilité et vos encouragements.

## Listes des abréviations

(B+S): (benzoate de sodium + sorbate de potassium)  
°C : degré celcius  
16S rDNA : gène codant pour l'ARNr 16S  
ADN : acide desoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
ATP: adénosine triphosphate  
AU/ml : activity Unit/ millititer  
AUF : agence universitaire de la francophonie  
Bac-: not bacteriocin producers  
Bac+: bacteriocin producers  
BPBC: Baird-Parker bacterial counts  
CCB: crud concentrated bacteriocin  
cDNA: complementary desoxyribonucleic acid  
CFS: cell-free supernatant  
CFU : colony format unit  
CWBI : Centre Wallon de Biologie Industrielle  
CWBI-B1410 : *Lc lactis* CWBI-B1410  
CWBI-B28 : *Lb curvatus* CWBI-B28  
D. O.: densité optique  
Da : Dalton  
DOPM : Direction des pêches maritimes (Dakar/ Sénégal)  
EMBL: European Molecular Biology Laboratory  
Ent. : enteric bacteria  
ESP : Ecole Supérieure Polytechnique  
F: forward  
FAO : organisation des Nations unies pour l'agriculture et l'alimentation  
FMP: force motrice protonique  
g : gramme  
GRAS: generally recognized as safe  
HekBC: hektoen bacterial counts  
HPA : hydrocarbures aromatiques polycycliques  
HPLC-RP: High pressure liquid chromatography- reverse phase  
l : litre  
LAB: lactic acid bacteria  
*Lb* : *Lactobacillus*  
*Lc* : *Lactococcus*  
LMG: Laboratory for Microbiology of the Faculty of Sciences of the Ghent University.  
LMG21688 : *Lb curvatus* 6890  
LMG6890 : *Lc lactis* LMG6890  
log : logarithme décimal  
MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight  
mARN: messenger ribonucleic Acid  
MIC: minimal inhibitory concentration  
min.: minute  
ml: millilitre  
mM : millimolaire  
MRSBC: de Man, Rogosa and Sharpe (milieu de culture de bactéries lactiques)  
MRSm: MRS modified (reduction of glucose or peptone content)



N: normalité  
NCFS: neutralized cell-free supernatant  
NTS: not treated sample  
pb : paire de bases  
PCA: plate count agar  
PCR: polymerase chain reaction  
R: reverse  
Res.act.: residual activity  
RGBC: Rose Gal Bcig bacterial counts  
rpm: round per minute  
RT-PCR: reverse transcription- polymerase chain reaction  
SCN : surnageant de culture neutralisé  
TBC: total bacterial counts  
TFA : acide trifluoro acétique  
UCAD : Université Cheikh Anta DIOP de Dakar  
UFC : unité formant colonie  
UI : unité internationale  
WDA: well diffusion assay

## Tables des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>PREAMBULE A LA PARTIE SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE 1 : PROBLEMATIQUE DE LA CONSERVATION DES PRODUITS DE LA PECHE ARTISANALE AU SENEGAL ; POTENTIALITES DES BACTERIES LACTIQUES PRODUCTRICES DE BACTERIOCINES COMME BIO-CONSERVATEURS .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>2. COMPOSITION CHIMIQUE ET VALEUR NUTRITIONNELLE DU POISSON ....</b>	<b>10</b>
<b>3. DEGRADATIONS DES PRODUITS DE LA PECHE.....</b>	<b>11</b>
3.1 Dégradation enzymatique : installation et disparition de la rigor mortis .....	11
3.2 Auto-oxydation des graisses et dégradation de la matière azotée .....	12
3.3 Dégradation microbienne .....	12
<b>4. CRITERES MICROBIOLOGIQUES DANS LES PRODUITS DE LA PECHE .....</b>	<b>14</b>
<b>5. CONSERVATION ET CONTROLE DE LA FLORE DANS LES PRODUITS DE LA PECHE .....</b>	<b>14</b>
5.1 Effets de la température .....	15
5.1.1 Traitement par le froid.....	15
5.1.2 Traitement par la chaleur.....	15
5.2 Effets des conservateurs .....	16
5.2.1 Le sel .....	16
5.2.2 Le nitrite et le nitrate .....	17
5.2.3 Les acides .....	17
5.3 Effets du séchage .....	18
5.4 Effets du fumage.....	18
5.4.1 Fumage à chaud.....	19
5.4.2 Fumage à froid .....	19
5.5 Effets des atmosphères modifiées dans les produits emballés .....	20
5.6 Effets des ferments lactiques et des bactériocines .....	20
5.7 Ionisation des produits de la pêche.....	21
5.8 Problématique de la salubrité des produits de la pêche dans les pays tropicaux .....	21
<b>6. LA FILIERE DE LA PECHE AU SENEGAL.....</b>	<b>22</b>

<b>6.1 Production, diversité des produits, et principales destinations .....</b>	<b>22</b>
<b>6.2 Pêche artisanale au Sénégal.....</b>	<b>24</b>
6.2.1 Principaux sites de débarquement et de commercialisation .....	24
6.2.2 Conditionnement du poisson et transformations artisanales.....	25
6.2.3 Fermentation traditionnelle du poisson au Sénégal.....	27
<b>6.3 Problématique de la salubrité des produits de la pêche artisanale sénégalaise .....</b>	<b>29</b>
<b>7. POTENTIALITES DES BACTERIES LACTIQUES COMME BIO- CONSERVATEURS DANS LES PRODUITS DE LA PECHE.....</b>	<b>29</b>
<b>7.1 Classification du groupe des bactéries lactiques.....</b>	<b>29</b>
<b>7.2 Propriétés antibactériennes des bactéries lactiques .....</b>	<b>30</b>
<b>7.3 Utilisation des bactéries lactiques comme bio-conservateurs dans les produits de la pêche .....</b>	<b>31</b>
7.3.1 Utilisation de souches acidifiantes .....	31
7.3.2 Utilisation de souches productrices de bactériocines .....	31
<b>8. CONCLUSION: APPLICABILITE DES SOUCHES LACTIQUES BACTERICIDES COMME BIO-CONSERVATEURS DE POISSONS AU SENEGAL.....</b>	<b>36</b>
<b>9. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>37</b>
<b>CHAPITRE 2 : LES BACTERIOCINES DES BACTERIES LACTIQUES : MODE D’ACTION BACTERICIDE, CLASSIFICATION, ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE DANS LES ALIMENTS.....</b>	<b>45</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>45</b>
<b>2. ACTION BACTERICIDE AU NIVEAU DES CELLULES CIBLES .....</b>	<b>45</b>
<b>3. CLASSIFICATION DES BACTERIOCINES.....</b>	<b>45</b>
3.1 Les lantibiotiques .....	47
3.2 Les bactériocines non-modifiées de type-pédiocine.....	51
3.3 Les bactériocines de la Classe III.....	53
3.4 Les bactériocines de la classe IV .....	53
<b>4. CONCLUSION: EVALUATION DE L’ACTIVITE DES BACTERIOCINES DANS LES ALIMENTS .....</b>	<b>53</b>
<b>5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>54</b>
<b>PREAMBULE A LA PARTIE SELECTION DE SOUCHES PRODUCTRICES DE BACTERIOCINES A PARTIR DE PRODUITS ALIMENTAIRES TRADITIONNELS D’ORIGINE SENEGALAISE. ....</b>	<b>61</b>

<b>CHAPITRE 3: BACTERIOCIN PRODUCERS FROM TRADITIONAL FOOD PRODUCTS .....</b>	<b>63</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>65</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>65</b>
2.1 Culture and media .....	65
2.2 Food sources .....	65
2.3 Detection of antimicrobial activity.....	66
2.4 Bacteriocin assay .....	66
2.5 Bacterial identification.....	67
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>68</b>
3.1 Detection of antimicrobial activity and bacteriocin assay .....	68
3.2 Inhibitory spectra.....	69
3.3 Bacteriocin activity .....	69
3.4 Identification of bacteriocin-producers.....	71
<b>4. CONCLUSION .....</b>	<b>72</b>
<b>5. REFERENCES .....</b>	<b>73</b>
<b>CHAPITRE 4: <i>IN VITRO</i> DETECTION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) ISOLATED FROM SENEGALESE LOCAL FOOD PRODUCTS.....</b>	<b>75</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>77</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>78</b>
2.1 Bacterial strains and media.....	78
2.2 Source and nature of food samples .....	78
2.3 Isolation of foods lactic acid bacteria and selection of isolates for bacteriocin assays .....	78
2.4 Detection of bacteriocine-like inhibitory substances production by selected isolates .....	79
2.5 Phenotypic characterization of the bacteriocin producers .....	80
2.6 Characterization of the bacteriocin producer strains by 16Sr DNA .....	80
2.7 Genetic characterization of nisin and enterocin B structural genes .....	81

2.8 Determination of transcription of nisin structural gene to mRNA in the main screened bac+ strain (CWBI-B1410).....	81
2.9 Comparison of the bacteriocin-like inhibitory substance of CWBI-B1410 with nisin .....	82
<b>3. RESULTS .....</b>	<b>83</b>
3.1 Detection, and biochemical characterization of the bacteriocin-producers and bactericidal activity ...	83
3.2 Genetic characterization of the strains and the bacteriocins.....	88
3.3 Similarities of the bacteriocin-like inhibitory substance of Lactococcus lactis CWBI-B1410 with nisin .....	90
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>94</b>
<b>5. CONCLUSION .....</b>	<b>96</b>
<b>6. REFERENCES .....</b>	<b>97</b>
<b>PREAMBULE A LA PARTIE MISE EN ŒUVRE DES SOUCHES SELECTIONNEES (CWBI-B1410 ET CWBI-B28) SUR POISSONS .....</b>	<b>101</b>
<b>CHAPITRE 5: ANTIBACTERIAL EFFECTS BY LACTOCOCCUS LACTIS CWBI-B1410 STRAIN WITH GLUCOSE SUPPLEMENTATION TO CONTROL ENTERIC SPOILAGE BACTERIA GROWTH ON TWO FISHES INCUBATED AT 30°C FOR FERMENTATION IN SENEGAL .....</b>	<b>103</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>105</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>107</b>
2.1 Bacterial strains.....	107
2.2 Fish source and filleting conditions .....	107
2.3 Raw fillets treatments and fish fermentation conditions .....	108
2.4 Analysis of samples .....	108
2.5 Determination of bacteriocin-like activity by CWBI-B1410 on fishes.....	109
2.6 Post-fermentation salting of fillets .....	110
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>110</b>
<b>4. CONCLUSION .....</b>	<b>115</b>
<b>5. REFERENCES .....</b>	<b>115</b>

**CHAPITRE 6 : EFFETS ANTIBACTERIENS DU SURNAGEANT DE CULTURE NEUTRALISE D'UNE SOUCHE LACTIQUE PRODUCTRICE DE BACTERIOCINE, ADDITIONNE DE SEL (NACL), SUR DIFFERENTS POISSONS CONSERVES A 10°C AU SENEGAL .....119**

**1. INTRODUCTION .....121**

**2. MATERIELS ET METHODES .....122**

2.1 Souches lactiques, milieux et conditions de culture..... 122

2.2 Activité des surnageants de cultures neutralisés des deux souches lactiques..... 123

2.3 Préparation des solutions de préservation ..... 123

2.4 Origine des poissons, conditions de filetage, teneur en lipides totaux et traitements de préservation. 124

**3. RESULTATS ET DISCUSSIONS .....125**

**4. CONCLUSION .....127**

**5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....128**

**CHAPITRE 7: SPOILAGE BACTERIA CONTROL OF FISH FROM ARTISANAL PRODUCTION IN SENEGAL WITH BACTERIOCIN-PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA COMBINED WITH SALT ADDITION .....131**

**1. INTRODUCTION .....133**

**2. MATERIALS AND METHODS .....135**

2.1 Bacterial strains and media..... 135

2.2 Fish source, preparation and filleting conditions ..... 135

2.3 Quantitative and qualitative assessment of fishes spoilage bacteria..... 136

2.4 Antibacterial solutions and treatment of fish fillets ..... 137

2.5 Sampling and bacterial flora load in treated fish fillets..... 138

2.6 Evaluation of the residual bactericidal activity in antibacterial solutions during storage trials..... 139

**3. RESULTS .....139**

3.1 In vitro antibacterial activity by tested lactic acid bacteria and level of microbial spoilage in fresh fishes..... 140

3.2 Antibacterial effects of lactic acid bacteria culture supernatants in combination with sodium chloride on fishes..... 142

<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>144</b>
<b>5. CONCLUSION .....</b>	<b>146</b>
<b>6. REFERENCES .....</b>	<b>147</b>
<b>PREAMBULE A LA PRESENTATION DES RESULTATS GENERAUX, AUX DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>151</b>
<b>CHAPITRE 8: PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS .....</b>	<b>153</b>
<b>1. ISOLEMENT DE SOUCHES BACTERIENNES LACTIQUES A ACTIVITE INHIBITRICE DE TYPE BACTERICIDE .....</b>	<b>153</b>
<b>2. CARACTERISATION GENETIQUE DES SOUCHES ISOLEES .....</b>	<b>154</b>
<b>3. CARACTERISATION GENETIQUE DES BACTERIOCINES DES SOUCHES ISOLEES .....</b>	<b>155</b>
<b>4. PRODUCTIVITE ET CARACTERISATION DE LA BACTERIOCINE PRODUITE PAR LA SOUCHE CWBI-B1410.....</b>	<b>157</b>
<b>5. NIVEAU DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE DE POISSONS DE PRODUCTION ARTISANALE AU SENEGAL .....</b>	<b>159</b>
<b>6. EFFETS ANTIBACTERIENS DE <i>LC LACTIS CWBI-B1410</i> AVEC ADDITION DE GLUCOSE SUR POISSONS FERMENTES AU SENEGAL .....</b>	<b>160</b>
<b>7. EFFETS ANTIBACTERIENS DE SCN BACTERICIDES ISSUS DE CWBI-B1410 ET CWBI-B28, EN PRESENCE DE NACL SUR POISSONS AU SENEGAL.....</b>	<b>161</b>
<b>8. PRODUCTION DE BACTERIOCINE PAR CWBI-B1410 EN FERMENTEUR....</b>	<b>166</b>
<b>9. ADSORPTION DE BACTERIOCINES .....</b>	<b>167</b>
<b>CHAPITRE 9 : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES .....</b>	<b>169</b>
<b>1. BACTERIES LACTIQUES PRODUCTRICES DE BACTERIOCINE ET CONSERVATION DES ALIMENTS .....</b>	<b>169</b>
<b>2. DETECTION, IDENTIFICATION DE SOUCHE BAC+ ET CARACTERISATION DE BACTERIOCINES .....</b>	<b>170</b>

<b>3. APPLICATION DE SOUCHES BACTERIENNES BAC+ A L'AMELIORATION DE LA CONSERVATION DE POISSONS .....</b>	<b>173</b>
<b>4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHES .....</b>	<b>178</b>
<b>5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DES CHAPITRES 8 ET 9 .....</b>	<b>183</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>189</b>
Annexe 1 : Morphologies des cellules des souches bactériennes bac <sup>+</sup> isolées .....	i
Annexe 2 : Origine des échantillons et composition des milieux d'isolement .....	ii
Annexe 3 : Méthodes de caractérisation génétique des souches et des bactériocines.....	iii
Annexe 4 : Poissons marins utilisés pour les essais de conservation.....	v
Annexe 5 : Pêche artisanale au Sénégal : acteurs et circuits de distribution des produits transformés.....	vi
Annexe 6: Publications, activités et distinctions.....	vii



## INTRODUCTION GENERALE

Les produits à base de poissons sont comparables du point de vue de la qualité nutritionnelle, à ceux à base de viande et de lait. La teneur en protéines de nombreux poissons avoisine 15 à 20%. Dans certaines régions du monde, le poisson constitue la première source de protéines alimentaires d'origine animale.

Cependant, le poisson est un produit de base particulièrement périssable. Sa qualité se détériore très rapidement s'il n'est pas manipulé correctement. En effet, dès qu'un poisson meurt, les réactions d'autodestruction liées à l'activité des enzymes autolytiques libèrent dans la chair du poisson des molécules simples constituant des substrats favorisant la propagation *in situ* des microorganismes notamment les bactéries. Par conséquent, le poisson doit être conservé aussitôt après capture à des températures comprises entre -2 et 0°C et être maintenu dans la chaîne de froid tout au long du circuit de distribution pour ralentir les réactions biochimiques et les changements biologiques post-mortem *in situ* pouvant le rendre impropre à la consommation.

Dans de nombreux pays, l'utilisation des techniques du froid pour le conditionnement des produits de la pêche frais à bord des embarcations de pêche ou dans les sites de débarquement et de commercialisation n'est pas assez répandue, du fait essentiellement du manque de ressources.

En l'Afrique de l'Ouest, le Sénégal est connu pour le niveau élevé de production et d'exportation de produits de la pêche. La moyenne de la production annuelle totale de poissons au cours de cette dernière décennie est de 403 911 tonnes. La pêche maritime fournit environ 90% du total des captures et est la première source de devise devant le tourisme. Elle constitue de ce fait un secteur vital pour le pays. La moyenne nationale de consommation de poisson par habitant est estimée à 28,1 kg/an, plaçant ce produit comme la première source de protéines animales pour les populations, loin devant la viande (17,1 kg/an).

La part des captures de la pêche artisanale représente en moyenne environ 85% du total des débarquements au Sénégal (DOPM<sup>1</sup>, Rapport 2004). Le marché du poisson frais est très important mais le conditionnement utilise de faibles quantités de glace et les températures ambiantes qui avoisinent 30°C. De plus, la préparation du poisson est réalisée dans des environnements généralement mal adaptés du point de vue sanitaire. Par conséquent, les

---

<sup>1</sup> Direction de l'office de la pêche maritime, Sénégal, rapports généraux des pêches 2004

produits se dégradent vite et les pertes élevées sont estimées à environ 25% des débarquements.

Les transformations artisanales par salage, fumage à chaud, fermentation et séchage sous soleil, ou leur combinaison restent les principaux moyens de conservation des produits. Les produits de la pêche transformés sont exportés dans toute l'Afrique de l'Ouest ou Centrale où ils constituent les principaux ingrédients de plusieurs soupes traditionnelles. Toutefois, la qualité hygiénique ou microbiologique de ces produits est douteuse (caractère empirique des transformations). De plus, les études relatives aux risques sanitaires qu'ils présentent sont rares.

Une amélioration des techniques de conservation et des transformations traditionnelles pourrait permettre de réduire les pertes post-captures et d'augmenter la salubrité des produits traditionnels à base de poisson destinés à la consommation humaine.

La bio-conservation peut constituer une stratégie permettant d'arriver à ce but. Cette technologie connaît un essor fulgurant ces dernières décennies du fait qu'elle satisfait à la fois les exigences de salubrité et de demande de plus en plus élevée des consommateurs en produits biologiques. Elle utilise les principes antimicrobiens de certains microorganismes généralement reconnus comme non pathogènes pour réduire ou empêcher la prolifération des germes indésirables dans les aliments.

Les bactéries lactiques font partie de la gamme de microorganismes utilisés à des fins de bio-conservations alimentaires. Ces bactéries produisent des acides organiques permettant d'acidifier les aliments et de les rendre résistants aux germes sensibles à ces pH. Certaines souches lactiques produisent en plus des substances antimicrobiennes de nature peptidique appelées bactériocines généralement actives contre des bactéries proches phylogénétiquement. Certaines bactériocines de bactéries lactiques ont un spectre d'inhibition assez large incluant des bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp...) d'origine alimentaire. L'utilisation des souches productrices de bactériocines comme cultures protectrices et de préparations de bactériocines, seules ou en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens traditionnels, comme additifs alimentaires, a permis d'améliorer le contrôle de plusieurs types de microorganismes indésirables et la flore contaminante totale de différents produits alimentaires y compris des produits halieutiques.

L'adaptation des principes préservatifs des bactéries lactiques productrices de bactériocines dans la transformation de produits halieutiques au Sénégal pourrait permettre

d'améliorer la qualité hygiénique des produits et de réduire les quantités le chlorure de sodium, principal agent antimicrobien utilisé en grandes quantités pouvant atteindre 30-40% (m/m).

Les souches lactiques productrices de bactériocines isolées originellement d'un aliment sont les mieux indiquées pour améliorer la salubrité de ces aliments car elles sont adaptées aux conditions *in situ* et devraient par conséquent être plus compétitives que d'autres souches isolées d'autres aliments. L'objectif de ce travail est :

- d'identifier des souches productrices de bactériocines à partir de bactéries lactiques isolées d'aliments traditionnels d'origine sénégalaise;
- de caractériser les bactériocines qu'elles produisent ;
- de caractériser le niveau de la contamination bactérienne de produits de la pêche artisanale au Sénégal ;
- d'appliquer les souches productrices de bactériocine les plus performantes en combinaison avec du chlorure de sodium, comme barrière additionnelle contre le développement de la flore contaminante de produits de la pêche, à travers des technologies de transformations simples basées sur les modèles traditionnels utilisés au Sénégal pour la transformation du poisson.

Cette étude rentre dans le cadre de la collaboration entre l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar et la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, dont l'un des objectifs principaux est de contribuer à l'amélioration des techniques de conservation des aliments traditionnels au Sénégal, à travers des technologies de conservation simple, adaptées au contexte socio-économique local.



## **PREAMBULE A LA PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

Cette première partie de synthèse bibliographique est subdivisée en deux chapitres : le chapitre 1 et chapitre 2.

Le premier chapitre présente une revue des techniques de préservation de la qualité microbiologique des produits de la pêche ainsi que les méthodes de conservation et de transformation des produits de la pêche les plus utilisées dans la filière artisanale sénégalaise. Les stratégies utilisant les bactéries lactiques productrices de bactériocines comme bio-conservateurs de produits de la pêche ont été détaillées dans le but d'identifier les adaptations possibles pour les produits de la pêche artisanale au Sénégal.

Le second chapitre présente les principaux groupes de bactériocines de bactéries lactiques, leur mode d'action au niveau des cellules cibles, ainsi que les méthodes d'évaluation de l'activité des bactériocines de bactéries lactiques dans les aliments.



**CHAPITRE 1 : PROBLEMATIQUE DE LA CONSERVATION DES PRODUITS DE LA PECHE  
ARTISANALE AU SENEGAL ; POTENTIALITES DES BACTERIES LACTIQUES PRODUCTRICES DE  
BACTERIOCINES COMME BIO-CONSERVATEURS**

**Michel Bakar DIOP<sup>1,2</sup>, Emmanuel TINE<sup>2</sup>, Jacqueline DESTAIN<sup>1</sup>, Philippe THONART<sup>1</sup>**

**1 : Centre Wallon de Biologie Industrielle, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux,  
Passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux (Belgique)**

**2 : Université Cheikh Anta DIOP, Ecole Supérieure Polytechnique, Bp 5085 Dakar, Sénégal**

***Soumis à BASE***

## **Conserver le poisson au Sénégal : contraintes, problèmes et bio-préservation**

### **Résumé**

Les bactéries lactiques et leurs bactériocines (peptides antibactériens) sont utilisées comme bio-conservateurs dans les préparations de produits de pêche élaborées pour de courtes durées de conservation. Elles permettent de réduire la teneur en certains ingrédients tels que le sel, le sucre, la teneur en graisse et en acides qui sont d'habitude utilisés comme facteurs d'inhibition de la croissance des microorganismes. Au Sénégal, les produits de la pêche artisanale sont essentiellement transformés par fermentation naturelle, salage (NaCl) et séchage, ou par salage et séchage. Les bactéries lactiques productrices de bactériocines pourraient être utilisées comme ferment au cours de la préparation du poisson pour rendre ce dernier résistant à la croissance des bactéries indésirables par la production *in situ* d'acides organiques et de bactériocines. Une seconde alternative est l'utilisation de solutions bactéricides issues de la culture de ces souches, additionnées de sel (NaCl), comme barrière contre le développement de la flore bactérienne contaminante au cours de la conservation des produits. Ces deux stratégies pourraient être des technologies convenables d'amélioration de la qualité microbiologique des produits de la pêche artisanale et permettraient de réduire les quantités de chlorure de sodium généralement incorporé en grandes quantités (30-40% m/m) pour contrôler la flore bactérienne.

### **Poissons, Sénégal, Conservation, Sel, Bactéries Lactiques, Bactériocines**

#### ***Problematic of preservation of artisanal fish products in Senegal; potentialities of bacteriocin-producing lactic acid bacteria as bio-preservatives***

##### ***Abstract***

*Lactic acid bacteria and their bacteriocins (antibacterial peptides) are used as bio-preservatives in lightly preserved fish products with reduced contents of ingredients such as salt, sugar, fat, and acid that usually serve as inhibitory factors to microbial growth in fish products. In Senegal, artisanal fish products are generally processed by natural fermentation (without any treatment), salting (with sodium chloride) and drying, or salting and drying. The bacteriocin-producing lactic acid bacteria could be used as starters during fish preparation for rendering it unsuitable for growth of spoilage bacteria by in situ production of antimicrobial substances such as organic acids and bacteriocins. A second alternative to control growth of undesirable flora in such products is the use of bacteriocin solutions obtained from cultures of these bacteria supplemented with sodium chloride, as barriers against growth of the spoilage bacteria during storage of fishes. These two strategies could be suitable technologies of enhancing the bacterial quality of traditional fish commodities, and reducing the amount of sodium chloride generally incorporated at high level reaching (30-40% wt/wt) as preservative.*

### ***Fish, Senegal, Preservation, Salt, Lactic Acid Bacteria, Bacteriocins***



## 1. INTRODUCTION

Dans de nombreuses parties du globe, les produits de la pêche constituent la première source de protéines animales pour les populations. Toutefois ces produits sont connus pour leur grande susceptibilité à la dégradation. Ils posent des problèmes tant hygiéniques, toxicologiques, qu'économiques.

Différentes technologies basées sur le froid ou la chaleur, ou utilisant des agents chimiques de conservation ont été développées afin d'étendre la durée de conservation des produits de la pêche. Avec le développement de la bio-préservation, certaines nouvelles stratégies de conservation des produits de la pêche utilisent les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques, particulièrement celles productrices de bactériocines. La bio-conservation permet d'obtenir des produits de bonne qualité microbiologique, contenant moins de conservateurs chimiques (O' Sullivan *et al.*, 2002 ; Garneau *et al.*, 2002).

Les bactériocines utilisées à cet effet sont des peptides (ou protéines complexes) antibactériens produits par certaines souches bactériennes, et libérés dans le milieu extérieur, qui ont un effet antagoniste contre d'autres bactéries, généralement phylogénétiquement proches (Flynn *et al.*, 2002). Certaines bactériocines de bactéries lactiques ont un spectre d'inhibition assez large incluant des bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp...) d'origine alimentaire.

Trois stratégies sont utilisées pour l'application des bactériocines dans le cadre de la conservation alimentaire (Schillinger *et al.*, 1996) :

- inoculation de l'aliment avec des bactéries lactiques qui produisent une bactériocine *in situ*;
- addition de la bactériocine purifiée ou partiellement purifiée;
- utilisation de solutions brutes de bactériocine issues de la culture d'une souche productrice de bactériocine comme ingrédient dans la transformation des produits alimentaires.

Certaines de ces stratégies ne nécessitent pas d'équipements lourds ni de dépense énergétique élevée. Leur adaptation dans le contexte de la transformation des produits de la pêche artisanale au Sénégal pourrait permettre d'améliorer la qualité microbiologique des produits et de réduire les quantités de sel (NaCl) incorporées.

Cette synthèse bibliographique présente les différentes techniques de préservation de la qualité microbiologique des produits de la pêche notamment les plus utilisées dans la filière artisanale sénégalaise. Les stratégies utilisant les bactéries lactiques productrices de

bactériocines comme bio-conservateurs de produits de la pêche ont été détaillées dans le but d'identifier des possibilités d'adaptation de ces techniques dans la transformation des produits de la pêche au Sénégal.

Les produits de la pêche destinés à la consommation humaine renferment des animaux appartenant à différents groupes zoologiques. Il s'agit principalement de poissons [poissons cartilagineux (Elasmobranches) et poissons osseux (Ostéichyens)], de mollusques [gastéropodes, céphalopodes, et bivalves (huîtres)] et de crustacées. Au niveau des captures de la pêche artisanale au Sénégal, les poissons plats, essentiellement les Actinoptérygiens, sont généralement prédominants (DOPM, 2004). Le terme poisson est utilisé, tout au long de cette étude, pour désigner les poissons et aussi les mollusques et les crustacés marins.

## 2. COMPOSITION CHIMIQUE ET VALEUR NUTRITIONNELLE DU POISSON

A l'instar de nombreux produits animaux, le poisson renferme de l'eau, des protéines, ainsi que des composés azotés, des lipides, des hydrates de carbone, des minéraux et des vitamines. Le poisson est principalement composé de protéines et de lipides (tableau 1).

Tableau 1: Principaux constituants (%) du poisson et du muscle de bœuf – *Comparison of chemical composition (%) of fish flesh and that of beef*

Constituants	Boeuf (muscle isolé)	Poisson (filet)		
		Minimum	Variation normale	Maximum
Protéines	20	6	16-21	28
Lipides	3	0.1	0.2-25	67
Glucides	1		<0.5	
Minéraux	1	0.4	1.2-1.5	1.5
Eau	75	28	66-81	96

Source: Stansby, 1962

En général, la chair du poisson est une bonne source de vitamines B et également, dans le cas des espèces grasses, de vitamines A et D. En ce qui concerne les éléments minéraux, la chair du poisson est considérée comme une source appréciable de calcium et de phosphore en particulier mais également de fer, cuivre et sélénium. Les poissons d'eau de mer ont une forte teneur en iode.

Les lipides du poisson contiennent jusqu'à 40% d'acide gras à longue chaîne parmi lesquels des acides gras insaturés tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique, reconnus comme favorables pour la santé humaine, notamment pour préserver des maladies de la peau.

La valeur nutritive élevée du poisson est particulièrement importante pour certains groupes à faibles revenus, qui dépendent parfois d'un régime alimentaire fondé sur des céréales pour satisfaire leurs besoins nutritionnels. Les teneurs en lysine et en acides aminés soufrés des céréales étant généralement faibles, l'ajout du poisson à un régime alimentaire augmente sa valeur nutritive.

### 3. DEGRADATIONS DES PRODUITS DE LA PECHE

Aussitôt après sa mort, le poisson subit un processus naturel de décomposition qui est le résultat de la succession de réactions enzymatiques, chimiques et bactériennes. La conséquence en est une rapide altération des propriétés organoleptiques, une réduction de la valeur nutritive et la formation de composés toxiques.

#### **3.1 Dégradation enzymatique : installation et disparition de la *rigor mortis***

Dès la mort du poisson, l'arrêt de la circulation sanguine et de l'apport d'oxygène provoque un ensemble de changements dans le métabolisme du muscle, qui, en continuant à «vivre», épuise ses réserves. Ces modifications dans le métabolisme ont des répercussions sur le tissu musculaire lui-même d'abord, puis vont contribuer à faire passer le muscle par une phase de *rigor mortis* (pertes des propriétés élastiques du muscle).

L'apparition de l'inextensibilité du muscle s'explique essentiellement par la diminution de la concentration musculaire en adénosine tri-phosphate (ATP), ce qui permet à l'actine et à la myosine de se lier irréversiblement. En réalité, on observe dans l'établissement de la *rigor mortis* une phase de latence, une phase d'installation de la *rigor* et une phase de *rigor* installée.

Durant la première phase, l'extensibilité du muscle reste constante et égale à la valeur qu'elle présentait au moment de la mort du poisson. Biochimiquement, cela s'explique par le fait que l'ATP musculaire, hydrolysée par la myokinase et l'ATP-ase sarcoplasmique, est régénérée à partir des réserves musculaires notamment le glycogène (réserve d'hydrates de carbone) et la créatine phosphate (pour les poissons téléostéens) ou l'arginine phosphate (pour les céphalopodes) (Huss, 1986). La durée de cette phase dépend des réserves disponibles dans le tissu musculaire au moment de la mort du poisson.

Durant la deuxième phase, l'extensibilité de la fibre musculaire décroît rapidement jusqu'à s'annuler. Ceci correspond biochimiquement au fait que la créatine phosphate est épuisée. Le taux d'ATP musculaire diminue rapidement car la voie glycolytique ne permet pas de produire de l'ATP en quantité suffisante pour compenser la perte résultant des activités ATP-asiques. De plus, le muscle de poisson contient généralement un taux faible de glycogène comparé aux mammifères.

Durant la phase de *rigor* installée, le muscle est parfaitement inextensible du fait que les liaisons actine-myosine s'y intensifient, rendant l'association irréversible, et ceci à cause de la

disparition de l'ATP grâce à l'activité de l'ATP-ase. Pendant la *rigor*, Les membranes musculaires perdent leurs sélectivités et ne s'opposent plus à la diffusion des enzymes lytiques tissulaires (ou des bactéries). Les catépsines, issues des lysosomes, hydrolysent les fibres musculaires. C'est l'état de *post rigor* qui se caractérise par une flaccidité des tissus et un retour à l'aspect souple existant en *pré-rigor* (Kodo, 1990).

La vitesse des réactions enzymatiques est très ralentie à 0°C (conservation des poissons dans de la glace). Les réactions de ce type sont presque totalement arrêtées à des températures de -30°C (congélation du poisson). Pour un poisson stocké à des températures élevées (températures ambiantes en milieu tropical), la vitesse des dégradations enzymatiques est plus importante. La *rigor* à de telles températures peut produire des déchirures musculaires qui favorisent l'extension rapide de la contamination microbienne dans les tissus musculaires. Il en résulte une moins bonne conservation des poissons mal conditionnés (traitement par le froid) aussitôt après captures.

### **3.2 Auto-oxydation des graisses et dégradation de la matière azotée**

Les lipides du poisson sont très insaturés. L'instabilité qui en résulte permet la fixation d'oxygène. Il s'en suit des réactions en chaîne aboutissant à la formation de composés divers (aldéhydes, cétones, alcools à chaîne courte, alcanes), responsables de la flaveur désagréable de « graisse oxydée ».

Les protéines sont très peu touchées pendant la *rigor mortis*. Elles le seront ultérieurement par les enzymes protéolytiques tissulaires. Il en résulte une augmentation en certains composés tels que l'acide glutamique, NH<sub>3</sub>, la tyrosine...

L'ATP qui se dégrade permet la formation d'inosine monophosphate (IMP), d'un peu de NH<sub>3</sub>, de H<sub>2</sub>S, d'acétaldéhyde, de diacétyl, responsables du développement de saveurs et d'arômes particuliers.

### **3.3 Dégradation microbienne**

Normalement, la chair du poisson est stérile, les régions contaminées sont les branchies, le mucus qui recouvre la peau et le tube digestif (Baross et Liston, 1970 ; Shewan, 1977). Les réactions d'autolyse des muscles du poisson favorisent la diffusion de liquides biologiques et la progression des bactéries. L'altération bactérienne prend le pas sur les dégradations enzymatiques d'autant plus rapidement que la contamination microbienne est élevée dans les foyers normaux d'infection du poisson, précités. La conséquence est l'accélération de la dégradation du poisson.

De nombreux facteurs conditionnent les modalités de l'altération microbienne: variété de poisson, pH de la chair, richesse en graisse, habitat du poisson, type et étendue de la contamination microbienne, conditions de la pêche et du stockage.

La microflore contaminante du poisson est fortement influencée par celle du milieu aquatique. Certains travaux ont montré une prédominance des bactéries Gram-négatives dans la flore initiale de poissons issus des eaux tempérées (Gram et Dalgaard, 2002) alors qu'une proportion élevée de coques Gram-positifs et de *Bacillus* sp peut être trouvée dans certains poissons provenant des mers chaudes et des eaux tropicales. Certaines études estiment ces bactéries à plus de 50-60% de la flore contaminante totale (Shewan, 1977).

La chair du poisson contient peu de glucides, mais a typiquement une teneur élevée en composés azotés non protéiques directement disponibles pour les bactéries et qui permettent dès lors leur croissance dans les produits. Beaucoup de poissons marins contiennent dans leur chair des composés comme l'oxyde de triméthylamine (OTMA) que certaines bactéries (*Photobacterium phosphoreum*, *Vibrionaceae*) sont capables d'utiliser sous conditions anaérobies entraînant la libération d'amines comme la triméthylamine (TMA) (Gram et Dalgaard, 2002). L'activité bactérienne aboutit aussi à la libération d'ammoniac et à la production d'H<sub>2</sub>S, de diméthylsulfure, de méthyl mercaptan et autres composés nauséabonds. Les acides aminés peuvent être soit désaminés en acides gras inférieurs, soit décarboxylés pour donner naissance à des amines toxiques (tyramine, histamine...). La formation d'histamine est fréquente chez certaines familles de poissons (Thonidés, Scrombidés, Clupéidés) (Guiraud, 1998).

Les poissons de mer occupent au sein des produits de la pêche une place de choix tant du point de vue quantitatif que qualitatif. Les sources des principaux agents étiologiques potentiels dans ces produits sont présentées au tableau 2.

**Tableau 2 :** Sources des principaux agents étiologiques dans les produits de la pêche – *Pathogenic agents potentially transmitted to human from fish and fish products*

Habitat naturel	Agents étiologiques dans les produits de pêche				
	Bactéries	Virus	Parasites	Toxines aquatiques	Amines biogéniques
Sources aquatiques	<i>Cl botulinum</i> (E, B et F), <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Aeromonas</i> sp., <i>Plesiomonas</i>		Nématodes, ( <i>Anisakis</i> , <i>Pseudoterranova</i> ), Cestodes, Trematodes	Ciguatera, Tetrodotoxine	Entérobactéries, <i>Photobacterium</i>
Environnement général	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Cl botulinum</i> A et B,				
Réservoir animal et humain	<i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>E. coli</i>	Noro, Hep A, B, SRV, Rotavirus			Entérobactéries

Cl: *Clostridium*; S: *Staphylococcus*; L.: *Listeria*

Source : Adaptée de (Huss *et al.*, 2001 ; Olsen *et al.*, 2000)

#### 4. CRITERES MICROBIOLOGIQUES DANS LES PRODUITS DE LA PECHE

La dégradation des poissons est la résultante de l'activité *in situ* des enzymes et des microorganismes contaminants notamment des bactéries (Baird-Parker, 2000 ; Gram et Dalgaard, 2002). Certains de ces microorganismes sont la cause de maladies chez l'homme (Olsen *et al.*, 2000). Les critères microbiologiques dans les poissons et les produits dérivés destinés à l'alimentation humaine sont exprimés en unités format colonie par gramme (UFC/g) à l'exception de certaines bactéries tels que *Salmonella* ou *Listeria monocytogenes* qui sont exprimées en bactéries par 25 grammes. Le tableau 3 présente les limites généralement acceptables dans certains produits de la pêche en France et dans les pays de l'Union européenne. Pour certaines bactéries (*Clostridium* sp, *Listeria monocytogenes* et *Vibrio parahaemolytica*), les limites ont été indiquées seulement pour les produits où le risque est le plus élevé. Ces limites (tableau 3) constituent également la référence en ce qui concerne le Sénégal dont les produits de la pêche sont essentiellement exportés vers l'Union européenne notamment en France et en Italie (DOPM, 2004).

**Tableau 3 :** Critères microbiologiques dans les poissons et produits dérivés destinés à l'alimentation humaine – *Microbiological criteria in fish and fish products destined for human consumption.*

Type de produits	Microorganismes*							
	FMT	Salm.	E coli	Colif.	S aureus	Cl perf.	L monocyt.	V parahem.
Poissons marins frais ou congelés, ronds ou en filet	10 <sup>6</sup>	Abs.	20	10	10 <sup>5</sup>			10 <sup>2</sup>
Poissons frais ou congelés ou surgelés : filets, darnes et autres morceaux et céphalopodes de présentation similaire	10 <sup>5</sup>	Abs.	10	10	10 <sup>2</sup>			
Produits sous conditionnement hermétique	10 <sup>5</sup>	Abs.	10		10 <sup>2</sup>			
Poissons fumés : Fabrication	10 <sup>5</sup>	Abs.	10	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>		
Fin conservation	5 x 10 <sup>5</sup>							
Poissons salés et séchés		Abs.	10	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>		
Poissons salés et séchés, marinés, fumés prêts à manger	10 <sup>6</sup>	Abs.	10		10 <sup>3</sup>		Abs.	10 <sup>2</sup>

\*Norme exprimée UFC/g, à l'exception de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* exprimées en bactéries/ 25 grammes sauf indication contraire. Échantillon acceptable si le résultat est égal ou inférieur à la valeur indiquée.

*S aureus*: *Staphylococcus aureus* = Staphylococques = Staphylococoques à coagulase positive) ; FMT (flore mésophile totale) = microorganismes aérobies à 30°C ; *E coli*: *Escherichia coli* ; *Cl perf.*: *Clostridium perfringens* ; *L monocyt.*: (*Listeria monocytogenes*) ; *V parahem.*: (*Vibrio parahaemolytica*) ; *S*: *Salmonella* ; Abs. : Absence – Norms are expressed in cfu/g excepted for *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* expressed in number of bacteria/ 25 g; samples are acceptable when the result is equal or under the indicated value; FMT: total mesophilic flora (aerobic microorganisms at 30°C); Abs: absence.

Source : adapté de Jouve (1996)<sup>2</sup> et de Guiraud (1998).

#### 5. CONSERVATION ET CONTROLE DE LA FLORE DANS LES PRODUITS DE LA PECHE

Les réactions chimiques et enzymatiques d'autodestruction, ainsi que l'action des microorganismes contaminants responsables de la dégradation des poissons, ne se réalisent

<sup>2</sup> Jouve (1996) cité par Quittet et Nelis (1999)

que dans des conditions physico-chimiques bien spécifiques. Changer ces conditions peut permettre de ralentir, voire arrêter cette dégradation.

## **5.1 Effets de la température**

### **5.1.1 Traitement par le froid**

La température constitue le principal facteur influençant le taux de croissance et la composition de la flore dans les aliments très dégradables comme le poisson. Les méthodes modernes de conservation du poisson sont basées sur l'utilisation du froid (réfrigération et congélation). La conservation à basses températures réduit la croissance et l'activité des bactéries à l'origine de la dégradation et prolonge la durée de conservation des produits.

A des températures comprises entre 0 et -20°C, les bactéries et les microorganismes sont en état de vie ralentie et ne peuvent pas se reproduire et envahir les muscles du poisson. La conservation à des températures en dessous du minimum de croissance entraîne une prolongation continue de la phase de latence jusqu'à ce que la multiplication cesse et la croissance du microorganisme s'arrête (Doyle *et al.*, 1997). Aux températures comprises entre 0 et 10°C des changements mineurs dans les conditions physico-chimiques ont de grands effets sur la croissance bactérienne (Korkeala *et al.*, 1989).

Toutefois la réfrigération ne tue pas ou n'élimine pas une contamination microbienne. Elle permet de limiter la croissance, le développement aux seuls microorganismes psychrophiles capables de croître sur des produits frais stockés à des températures en dessous de 7°C (Ashie *et al.*, 1996). Aussitôt après capture, le poisson frais doit être conservé à des températures comprises entre -2 et 0°C pour éviter qu'il ne se détériore en mer (avant le débarquement) (Boyd *et al.*, 1992).

La conservation par le froid suppose l'existence d'une infrastructure lourde, coûteuse et énergivore (bateaux de pêche avec équipements frigorifiques, entrepôts frigorifiques, transports frigorifiques, utilisation généralisée des congélateurs chez les distributeurs et les particuliers). Ces méthodes sont très répandues dans les pays industrialisés contrairement aux pays en voie de développement où le conditionnement du poisson est essentiellement de type artisanal du fait du manque de ressources (Gérard, 1989).

### **5.1.2 Traitement par la chaleur**

L'application de hautes températures représente le traitement le plus ancien et le plus efficace contre les microorganismes et les enzymes. Leur destruction est partielle dans le cas

de la pasteurisation où la température ne dépasse pas 100 °C, totale pour la stérilisation où la température est supérieure à 100 °C. Les principaux produits issus de cette technologie sont les conserves de poisson, les poissons fumés à chaud et les farines de poisson (alimentation animale).

## **5.2 Effets des conservateurs**

La réduction de l'activité de l'eau dans les aliments permet de limiter la croissance des microorganismes et l'activité des enzymes d'autodestruction dans les aliments. Dans les produits à base de poisson, cela a longtemps été réalisé par ajout de solutés notamment du sel.

### **5.2.1 Le sel**

Le salage est l'une des méthodes de conservation du poisson les plus anciennes. Au cours du salage, la concentration en sel dans le produit augmente soit à travers le phénomène de l'exsudation soit par la diffusion du sel dans le produit (Horner, 1997). En plus de son effet préservatif, le traitement par salage est aussi appliqué comme traitement préliminaire au fumage pour produire du goût, pour empêcher la décoloration et rendre ferme le muscle du poisson (Deng *et al.*, 1974).

Le sel le plus utilisé est le chlorure de sodium. Le salage peut s'effectuer soit, à sec, le sel étant mis directement sur le poisson (5-10% m/m), soit en saumure, le poisson étant plongé dans une solution saline à un certain niveau de saturation. Le chlorure de sodium est plus efficace et moins coûteux que d'autres conservateurs alimentaires sûrs et plus chers tels que les sucres (Horner, 1997).

L'action du sel contre l'activité bactérienne ne devient efficace que lorsque la concentration dans la chair atteint et dépasse 5 - 6% (Gérard, 1989). Les poissons gras (teneur en lipides totaux > 6,5%) sont connus pour leur propriété à ne pas absorber assez rapidement le sel (OSU, 1993). Les bactéries Gram négatives sont réputées plus sensibles à l'effet antimicrobien du sel que les bactéries Gram positives (Leroi *et al.*, 2000).

Quelle que soit la méthode de salage utilisée, le sel doit être aussi propre que possible. Un sel de bonne qualité contient 95 à 98% de chlorure de sodium et des impuretés (chlorure et sulfate de calcium et magnésium et sulfate et carbonate de sodium). L'aspect, le goût et la durée de la conservation du poisson traité dépendent de la qualité et la propreté du sel utilisé.



### 5.2.2 Le nitrite et le nitrate

Les nitrates et les nitrites ont été utilisés comme conservateurs dans différents types de denrées alimentaires (viandes, poissons et fromages) (Ingram, 1973). Les deux composés, généralement utilisés en combinaison avec du NaCl, sont considérés comme des sels de préservation.

Le nitrite est un important agent antimicrobien. Son effet inhibiteur contre les bactéries, la croissance et la production de toxines par *Clostridium botulinum* a été décrit par Sofos *et al.* (1979). Toutefois, compte-tenu de sa capacité, sous certaines conditions, de réagir avec les amines pour former des composés cancérigènes de type nitrosamines, de nombreux pays européens, le Parlement européen et la commission de la Communauté européenne (1995) restreignent où interdisent l'utilisation du nitrite.

Le nitrate est fréquemment utilisé comme conservateur dans la production de viandes salées séchées et dans une moindre mesure dans la préservation des poissons et des fromages (Meah *et al.*, 1994 ; Sanz *et al.*, 1997). Dans les pays scandinaves, le nitrate est ajouté dans le mélange de sel utilisé pour le salage de certains produits à base de poisson pour contrôler l'activité des microorganismes durant la conservation en saumure dans des fûts (Knøchel and Huss, 1984). Le nitrate agit plutôt comme un réservoir de nitrite en présence de bactéries réductrices de nitrate. Son effet bactériostatique ou bactéricide est faible voire inexistant compte-tenu des concentrations utilisées (Skovgaard, 1992).

### 5.2.3 Les acides

Le pH constitue un autre facteur sur lequel on peut agir pour réduire l'activité des microorganismes dans divers aliments, y compris les produits à base de poisson. Dans les produits de poissons marinés, la préservation est réalisée par ajout de sel, de vinaigre (acide acétique), de sucre, et de conservateurs comme l'acide benzoïque et l'acide sorbique ou leurs sels (tableau 4), qui abaissent le pH en dessous de 5. L'acidification et/ou le salage sont appliqués pour inhiber ou réduire l'activité des bactéries Gram négatives non acidophiles et/ou non halophiles et productrices de mauvaises odeurs putrides (Blood, 1975).

A des températures inférieures à 10°C, les poissons marinés (semi-conserves de poissons) ont des durées de conservation ne dépassant généralement pas 6 à 12 mois de conservation (Blood, 1975 ; Gram et Huss, 2000).

**Tableau 4 :** Quantités maximales (mg/ kg) de sorbate et benzoate autorisées dans les semi-conserves de poissons et dans les poissons salés et séchés – *Maximal quantities (mg/kg) of benzoate and sorbate (B+S) preservative agents authorized in semi-preserved fish products and in salted and dried fish products*

Denrées alimentaires	Benzoate + Sorbate (B+S)
Produits de poissons en semi-conserves, y compris ceux à base d'oeufs de poisson	2000
Poissons salés et séchés	200
Crevettes cuites	2000

Source: adapté de Moll et Moll (1998)

### 5.3 Effets du séchage

Cette technique a pour but le dessèchement partiel du poisson en vue d'augmenter son temps de conservation. Par la perte d'eau dans les tissus, les activités enzymatiques deviennent minimales et on observe, comme pour le salage, une diminution voire un arrêt de l'activité des microorganismes.

Le séchage peut se faire à l'air (Fellows, 1997) ou par utilisation d'équipement permettant de contrôler les paramètres de séchage (Gérard, 1989). La teneur finale en eau des produits secs est généralement de 25 à 32% (GRET et CTA, 1993). L'activité de l'eau ( $a_w$ ) dans les produits séchés est suffisamment basse pour empêcher l'activité des microorganismes, excepté quelques moisissures xérophiles et des bactéries halophiles (Doe et Olley, 1990; Gram et Huss, 1996).

### 5.4 Effets du fumage

Le fumage est l'une des méthodes de conservation du poisson les plus anciennes. Il combine les effets du salage, du séchage, du chauffage et de la fumée (Blight *et al.*, 1988).

L'imprégnation dans la chair du poisson des composants de la fumée lui donne un goût et une odeur spécifique (Southcott and Razzell, 1973). La formation d'arômes et de saveurs particulières est due essentiellement aux phénols de la fumée. L'action la plus importante est un effet antioxydant du phénol sur les lipides, cela est d'autant plus important que le poisson est gras (GRET et CTA, 1993).

La fumée contient une grande variété de constituants organiques tels que les composés phénoliques et carbonyliques, et des acides organiques (Asita et Campbell, 1990 ; Horner, 1997). Ces composés bactériostatiques et bactéricides, combinés à l'effet limitant du faible niveau de l'activité de l'eau, de la chaleur appliquée, des changements aux niveaux des parties protéiques des enzymes et des composés lipidiques, inactivent les enzymes d'autodestruction et retardent le développement de la flore contaminante (Gilbert and Knowles, 1995 ; Ashie *et al.*, 1996).

Certains travaux ont montré que les effets antimicrobiens du fumage sont plus importants contre les bactéries Gram négatives que contre les bactéries Gram positives. Cela est sans

doute dû à la plus grande sensibilité des bactéries Gram négatives aux composés antimicrobiens dans la fumée (Salama and Chalafalla, 1993 ; Efiuvwevwere and Ajiboye, 1996).

#### **5.4.1 Fumage à chaud**

Dans le cas du fumage à chaud, le poisson est exposé à des températures d'au moins 70°C dans le but de cuir la chair en plus de l'imprégnation de fumée.

Au cours du traitement, une pellicule constituée de sels de protéines solubles se forme à la surface. Cette pellicule capte une part importante des composés antioxydants et des substances bactériostatiques provenant de la fumée (Horner, 1992). A la fin du fumage, la majorité de la flore dans le produit est détruite par la chaleur (Horner, 1992).

Cependant l'absence d'une flore compétitive dans ces produits fait qu'ils sont très susceptibles d'être contaminés par certaines souches bactériennes comme *Listeria monocytogenes*, comme indiqué au tableau 3, contrairement aux poissons fumés à froid dans lesquels la flore de maturation, essentiellement lactique, constitue une barrière contre ces souches (Jemmi et Keusch, 1992).

Selon Horner (1997), d'importantes quantités d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HPA) de type benzopyrènes (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>) peuvent se former durant le fumage du poisson à chaud à des températures de 70-80°C. Les HPA sont des substances cancérigènes. Les teneurs en composés de types HPA sont plus importants dans les poissons fumés à chaud que dans ceux fumés à froid, du fait que la formation de ces composés dépend de la température (Horner, 1997).

#### **5.4.2 Fumage à froid**

Dans le fumage à froid, le poisson est traité à des températures de fumage ne dépassant généralement pas 28°C (Horner, 1992).

Ces produits sont préservés par salage avec des teneurs en NaCl de 2% à 3% (m/m), et sont souvent emballés sous vide. Le fumage à froid ne détruit pas la flore microbienne naturelle du poisson ou les agents pathogènes psychrophiles du poisson cru. Il ne réduit pas non plus suffisamment l'activité de l'eau de manière à inhiber la croissance microbienne dans les produits obtenus (Horner, 1992).

Par conséquent, les produits prêts doivent être conservés aux températures de réfrigération (Gram et Huss, 2000). Certains procédés utilisent des ferments lactiques producteurs de bactériocines (*Carnobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. et *Lactococcus lactis*) pour améliorer le

contrôle des bactéries Gram positives dans le produit (Brillet *et al.*, 2004 ; Brillet *et al.*, 2005 ; Ghalfi *et al.*, 2006<sub>a</sub>, Wessels *et al.*, 1996). Le poisson fumé à froid est généralement consommé comme aliment prêt à l'emploi, sans chauffage.

### **5.5 Effets des atmosphères modifiées dans les produits emballés**

La compréhension de la contamination microbienne des produits de la pêche a permis de développer de nouvelles stratégies de préservation tels que l'utilisation d'emballages à atmosphère modifiée et des emballages sous vide permettant de protéger le produit contre la contamination, l'oxydation des lipides, la détérioration de la couleur.

Le facteur le plus important dans la microbiologie des aliments périssables emballés tels que les poissons est la relative perméabilité du matériel d'emballage au CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> et vapeur d'eau (Cavett, 1968 ; Adams et Moss, 2000).

Un exemple dans cette catégorie est la conservation de filets de poissons marins sous emballage à CO<sub>2</sub>. Ceci permet d'inhiber la respiration de certaines bactéries contaminantes (*Shewanella* et *Pseudomonas*) et devrait en principe entraîner une importante extension de la durée de conservation. Toutefois du fait de la présence de bactéries résistant au CO<sub>2</sub>, comme *P. phosphoreum* réduisant l'oxyde de triméthyl amine (TMAO), le produit se dégrade presque au même taux que les filets non emballés sous atmosphère à CO<sub>2</sub>. L'inhibition ciblée de *P. phosphoreum* (par congélation ou par addition d'épices) réduit sa croissance, entraînant une augmentation de la durée de conservation (Mejlholm et Dalgaard, 2002).

### **5.6 Effets des ferments lactiques et des bactériocines**

Des souches de bactéries lactiques sélectionnées (ferments) ou des préparations de bactériocines ont été appliquées pour prolonger la durée de conservation de poissons qui, s'il ne sont pas ainsi préservés, se détériorent du fait de la croissance de la flore lactique contaminante (Einarsson et Lauzon, 1995 ; Brillet *et al.*, 2005). Les principales souches lactiques utilisées sont des souches acidifiantes tels que *Lactobacillus* sp., *Carnobacterium* sp., *Pediococcus* sp. et *Lactococcus* sp. La chair du poisson ayant une teneur en hydrates de carbone très faible, certains procédés de fermentation font intervenir une source externe de carbone pour améliorer l'activité antimicrobienne du ferment. La durée de la fermentation des poissons est variable et peut atteindre 8 jours à plusieurs mois (Bourgeois et Larpent, 1996).

### **5.7 Ionisation des produits de la pêche**

C'est un procédé qui consiste à exposer les produits à l'action directe de certains rayons photoniques ou électroniques. Ces rayonnements sont pour la plupart soit générés par une source radioactive tel que le Cobalt<sup>60</sup>, ou le Cesium<sup>137</sup> (rayonnement  $\gamma$ ), soit par un accélérateur d'électrons (rayonnement  $\beta$ ). Ces particules de hautes énergies provoquent la formation d'ions dans la matière exposée sans aller cependant jusqu'à la genèse d'une forme de radioactivité. L'ionisation entraîne une destruction des bactéries pathogènes et accroît la durée de conservation par réduction de la flore d'altération (Kodo, 1990). Elle provoque au niveau moléculaire, des perturbations des systèmes enzymatiques et des altérations des molécules d'ADN (rupture des liaisons hydrogènes et des chaînes et formation de ponts), et au niveau cellulaire, des modifications membranaires.

Les rayonnements ionisants bouleversent aussi les structures lipo-protéiques des membranes cellulaires (surtout mitochondriale). Il s'en suit des perturbations biochimiques et des modifications de la perméabilité cellulaire. Toutefois, les doses d'ionisation généralement appliquées aux denrées alimentaires, ne suffisent pas à bloquer et à supprimer l'activité de leurs systèmes enzymatiques (Kodo, 1990).

De plus, cette technologie n'est autorisée que dans quelques pays de l'Union européenne dont la Belgique, et est très rare dans les pays en voie de développement (Kodo, 1990).

### **5.8 Problématique de la salubrité des produits de la pêche dans les pays tropicaux**

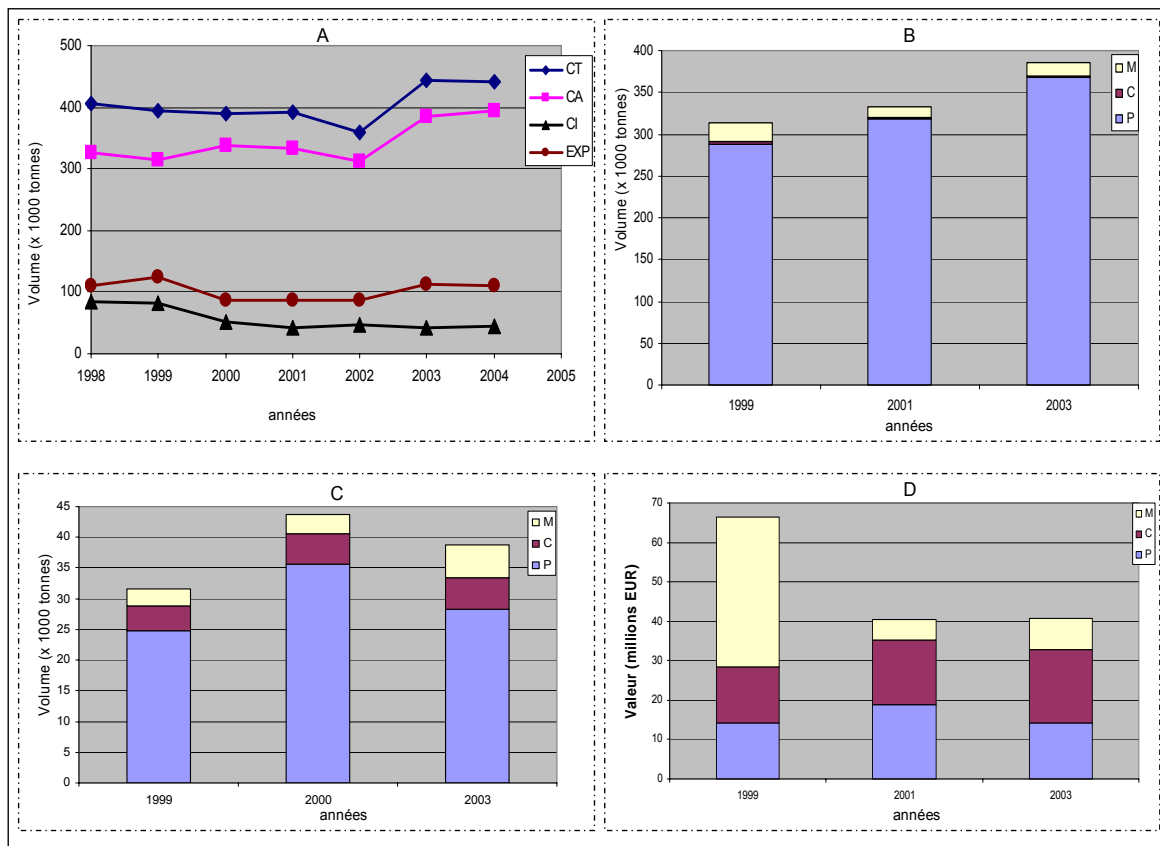
Le caractère très périssable des produits de la pêche pose des problèmes tant hygiéniques, toxicologiques, qu'économiques, particulièrement dans les pays tropicaux qui manquent d'infrastructures adéquates de conservation des produits frais par le froid. On estime, par exemples, les pertes post-captures de perche du Nil, pêchée de façon artisanale en Ouganda, à 25-30% des prises totales. De même, en Gambie et au Sénégal, les pertes post-récoltes sont estimées à 20-30 % du total des captures. Dans ces pays, les méthodes traditionnelles de conservation (stockage des prises aux températures ambiantes) et de transformations (salage, séchage et fumage à chaud ou leurs combinaisons) du poisson, qui modifient beaucoup les caractéristiques organoleptiques des produits frais, sont encore répandues.

## 6. LA FILIERE DE LA PECHE AU SENEGAL

### 6.1 Production, diversité des produits, et principales destinations

Dans l'Afrique de l'Ouest, le Sénégal est connu pour le niveau élevé de sa production et d'exportation de produits de la pêche. La pêche maritime fournit environ 90% du total des captures. La pêche est la première source de devise devant le tourisme, et constitue de ce fait un secteur vital pour le pays. La pêche industrielle ne représente que 15% des captures et est essentiellement tournée vers l'exportation (figure 1).

**Figure 1** : Filière pêche de la au Sénégal – *Fishing sector in Senegal*

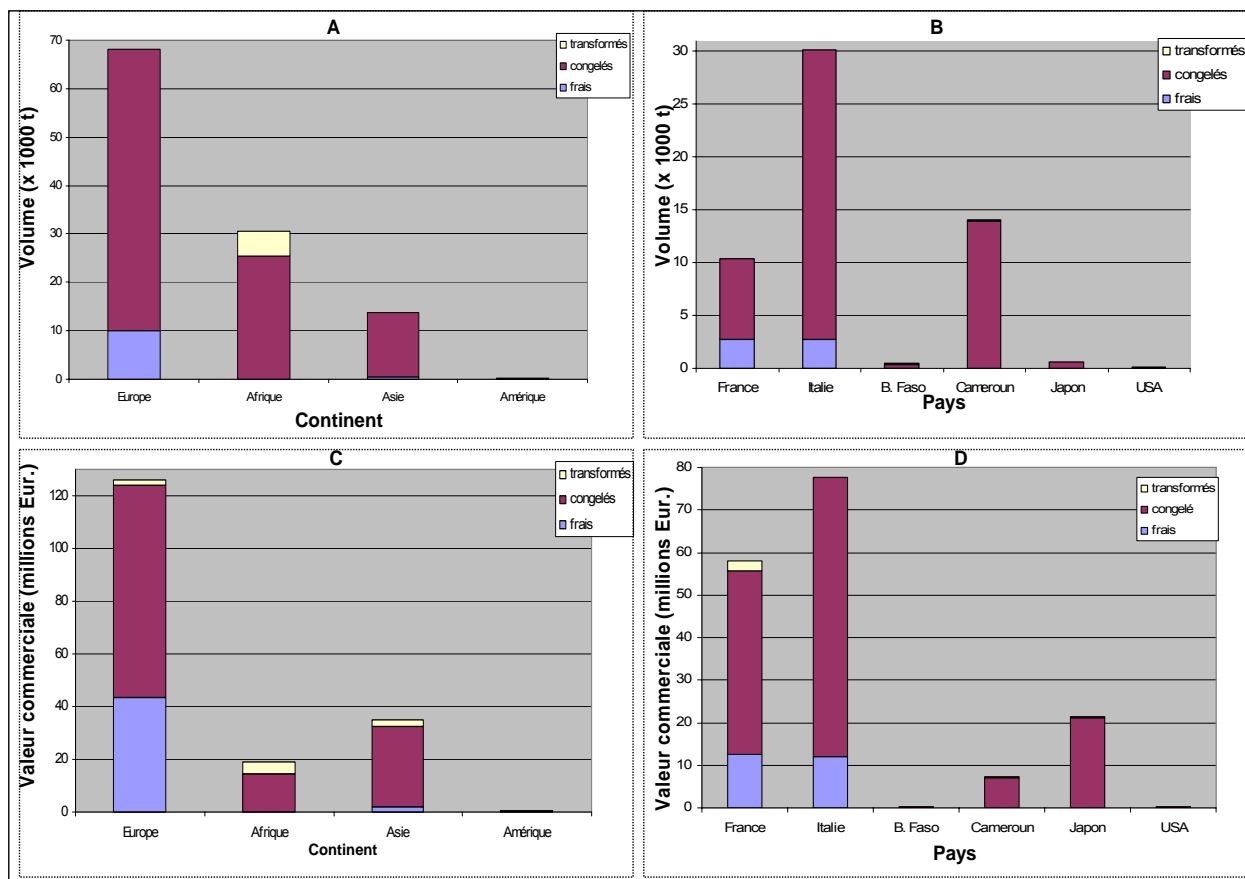


**A**: Production et exportation des produits de la pêche par le Sénégal [CT (captures totales), CA (captures artisanales), CI (captures industrielles) et EXP. (exportations)] ; **B**: Répartition des poissons (P), des mollusques (M) et des crustacés (C) dans les débarquements de la pêche artisanale ; **C** : Répartition des poissons (P), des mollusques (M) et des crustacés (C) dans les produits de la pêche industrielle ; **D** : Répartition de la valeur commerciale des poissons (P), des mollusques (M) et des crustacés (C) dans les exportations de produits de la pêche – *A: Production and exportation of fish products by Senegal [CT (total landings), CA (artisanal landings), CI (industrial landings) and EXP. (exportation)] ; B: Repartition of fishes (P), shell-fish (M) and crustaceans (C) in artisanal landings; C: Repartition of fishes (P), shell-fish (M) and crustaceans (C) in industrial landings; D: Répartition of commercial value of fishes (P), shell-fish (M) and crustaceans (C) in Exportation of fish products.*

L'Europe est la principale destination des produits de la pêche sénégalaise. Elle absorbe à elle seule environ 52% des exportations (DOPM, 2004). En 2003 la production totale de poissons maritimes est estimée à 444111 tonnes, tandis que les exportations s'élèvent à

95 675 tonnes soit 21,5% de la production totale. Les produits frais représentent environ 7,52% des exportations contre 74,84% pour les produits congelés, 11% pour les produits en boîtes (conserves et farine de poisson) et 6% pour les produits transformés artisanalement (figure 2).

**Figure 2** : Principales destinations des produits de la pêche sénégalaise – *Main destination of Senegalese fish products*



frais: produits frais; congelés: poissons congelés entiers et poissons filetés congelés; transf.: Produits de la pêche transformés – *frais: fresh products; congelés: frozen [whole frozen fish] + (frozen filleted fish); transf.: processed fish products*

La valeur totale des exportations de produits de la pêche a été estimée à 164 milliards de FCA (environ 250, 38 millions d'Eur) pour l'année 2003 (DOPM, 2004). En ce qui concerne les exportations de produits transformés, pour l'Europe, les produits sont essentiellement issus de la transformation industrielle (97%), tandis que pour l'Afrique, les produits issus de la transformation artisanale sont dominants (75%).

La pêche artisanale draine l'essentiel de la production de poissons maritimes avec près de 85% à son actif (DOPM, 2004). Elle permet le ravitaillement des marchés locaux et ceux de pays limitrophes (Mauritanie, Mali, Guinée Bissau), d'Afrique Centrale (Cameroun, République Démocratique du Congo) et d'Afrique de l'Ouest (Burkina Faso) (DOPM, 2004).

Le poisson constitue également la première source de protéines animales pour les populations au Sénégal. La moyenne nationale de la consommation de poisson par habitant est estimée à 28,1 kg/an, loin devant la viande (17,1 kg/an) (FAO, 2004).

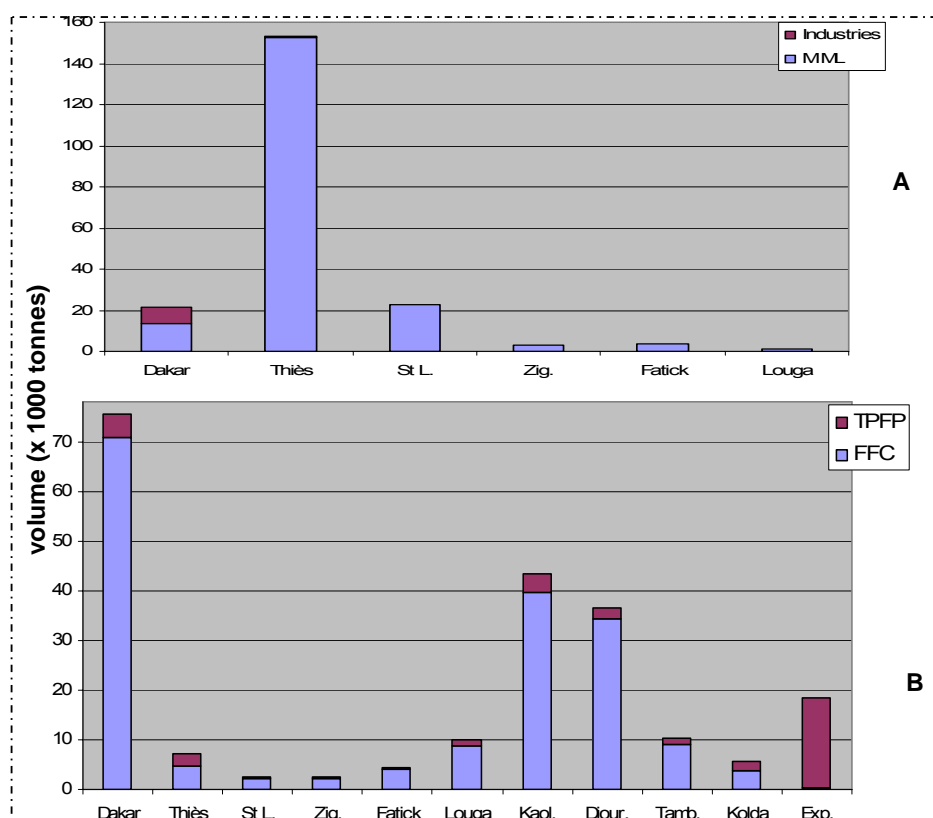
## **6.2 Pêche artisanale au Sénégal**

### **6.2.1 Principaux sites de débarquement et de commercialisation**

Les principaux centres de pêche se trouvent dans les régions de Thiès (MBour), de Dakar et de Saint Louis. Le marché du poisson frais est très important dans les sites de commercialisation à travers le pays parmi lesquels le marché central au poisson de Dakar apparaît comme le principal. Il reçoit des produits en provenance de toutes les régions maritimes du Sénégal, ainsi que de pays limitrophes (Mauritanie, Gambie, et Guinée). Il constitue également un lieu d'éclatement de ces produits vers les marchés de l'intérieur du pays (Figure 3).



**Figure 3** : Pêche artisanale sénégalaise – *Senegalese artisanal fishery sector*



A : principales zones de débarquement, et répartitions des produits frais destinés au mareyage dans les marchés (MML) et vers les industries ; B : proportion des produits frais (FFC) et des produits transformés traditionnellement (TPFP) dans les principaux sites locaux de commercialisation dans les dix régions administratives, et pour les produits exportés en Afrique – A: *main landing sites and repartition of fresh fish products destined to local marketing site trade (MML) and to industries (ind.)* ; B: *repartition of fresh fish products (FFC) and traditionally processed fish products in the main marketing sites and exported fish products in Africa*

St L.: Saint Louis; Zig.: Ziguinchor ; Diour. : Diourbel; Kaol.: Kaolack; Tamb.: Tambacounda

Source : Données statistiques de la DOPM/Sénégal (2003)

### 6.2.2 Conditionnement du poisson et transformations artisanales

Selon Gram (1992), le niveau de la flore contaminante des poissons pêchés sur les côtes de Dakar est de  $10^{6-7}$  UFC/g. La flore contaminante des poissons est très sensible au traitement par le froid: la conservation des poissons dans de la glace (100 g de poisson/100 g de glace) entraîne une réduction immédiate du nombre de bactéries viables à  $10^3-10^4$  UFC/g, et sa stabilisation à cette valeur pendant 7 jours ; le niveau des bactéries psychrotrophiques est estimé à  $10^9$  ufc/g au bout de 3 à 4 semaines (Gram, 1992). Toutefois, dans la majorité des sites de débarquement et de commercialisation, le poisson est conditionné à température ambiante ou dans de faibles quantités de glace (GRET et CTA, 1993). De plus, la préparation du poisson est réalisée dans des environnements généralement mal adaptés du point de vue sanitaire (Figure 4) (Diei-Ouadi, 2005).

**Figure 4 :** Conditionnement du poisson frais dans les sites de commercialisations locaux: cas du marché de Soumbédioune (Dakar Sénégal) – *Conditions of fresh fish products handling in the local marketing sites: case of Soumbédioune Dakar*

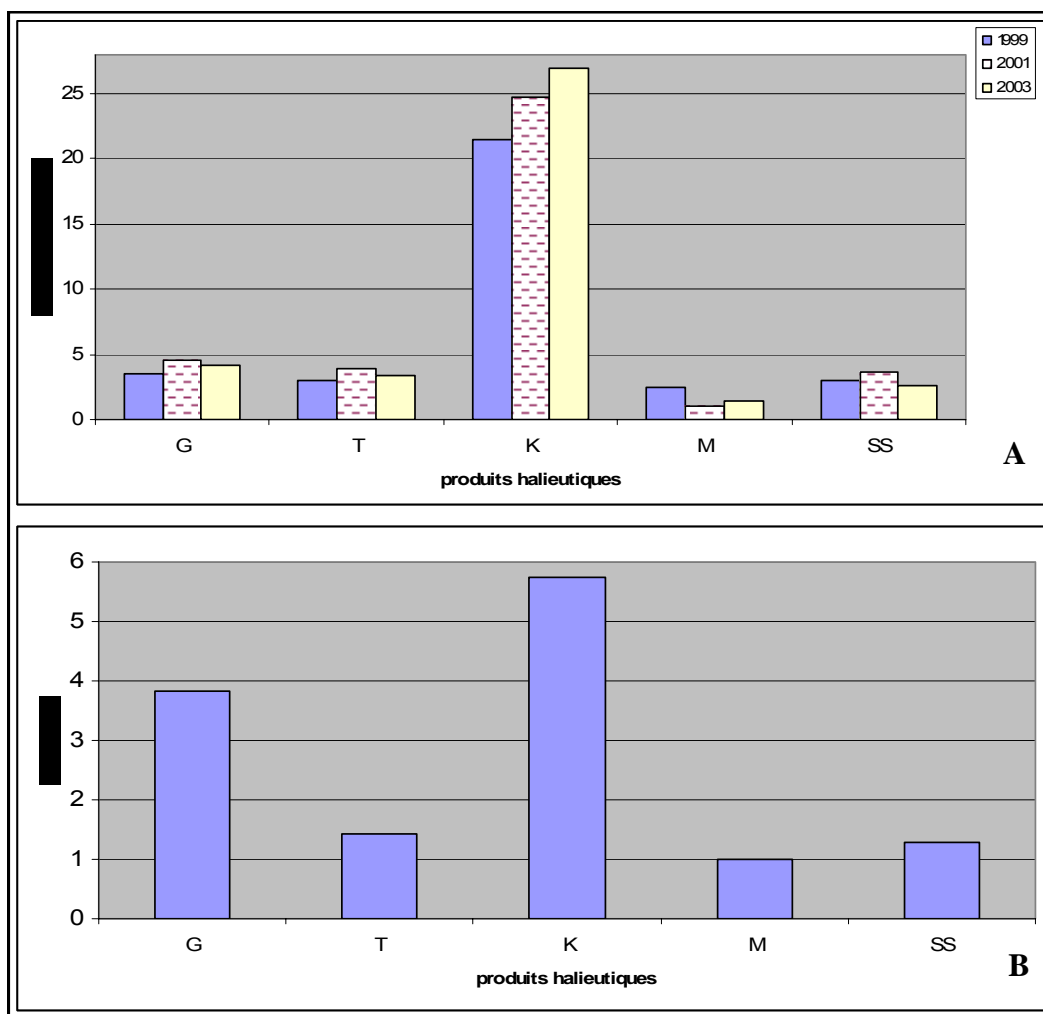


La transformation artisanale est une filière essentiellement occupée par les femmes ; elle absorbe 30 à 40% des débarquements de la pêche artisanale, auxquels s'ajoutent les invendus de la pêche industrielle (GRET et CTA 1993), et permet de valoriser et d'atténuer les pertes. Elle contribue également à l'approvisionnement régulier en protéines animales des populations de l'intérieur du pays.

Différents procédés conduisent à l'élaboration des produits traditionnels: « Kéthiakh » (sardinelle braisée, salée et séchée), « Sali » (poissons salés et séchés), « Tambadiang » (petits poissons salés séchés entiers, faisandés ou non), « Guédj » (poisson fermenté, salé et séché), « Yeet » (gastéropode fermenté séché), « Yokhoss » (huître séchée), Touffa (gastéropode fermenté séché), « Métorah » (poisson fumé à chaud puis séché), « yoss » (poisson juvénile séché) (Figure 5). Les quantités de sels incorporés peuvent atteindre 30-40 % (m/m) du poids du poisson (GRET et CTA, 1993).

Du fait des saveurs exceptionnelles qu'ils procurent, ces produits sont très appréciés par une bonne partie des populations en Afrique de l'Ouest et Centrale, où ils constituent une part non négligeable de la satisfaction des besoins en protéines alimentaires (Fellows, 1997). Ils sont une source importante de devises pour les populations des zones côtières au Sénégal (GRET et CTA, 1993).

**Figure 5** : Productions (A) et valeurs commerciales (B) des principaux types de produits de pêche transformés artisanalement – *Production (A) and commercial value (B) of the main traditional processed fish products*



G : « Guedj » ; T : « tambadiang » ; K : « Kethiak » ; M : « Métorah » ; SS : « Sali salé »  
 « Kéthiakh » (sardinelle braisée, salée et séchée), « Sali » (poissons salés et séchés), « Tambadiang » (petits poissons salés séchés entiers, faisandés ou non), « Guédj » (poisson fermenté, séché), « Métorah » (poisson fumé à chaud puis séché) – *G: fermented, salted and dried fish; T: whole dried fish; K: roasted, salted and dried fish; M: heat smoked and dried fish; SS: salted and dried fish*

### 6.2.3 Fermentation traditionnelle du poisson au Sénégal

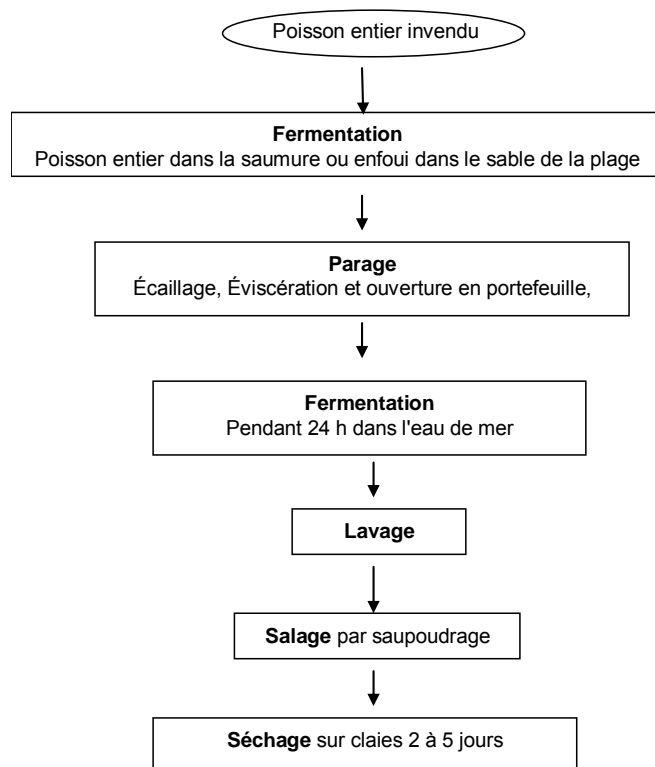
La fermentation des produits de la pêche est une pratique très ancienne et largement répandue dans le monde, mais particulièrement diffusée en Europe et en Asie (Bourgeois et Larpent, 1996). En Asie, les produits de la fermentation se présentent sous forme de pâtes ou de liquide « nuocnam ». Certains procédés font intervenir un ensemencement en ferments ou l'addition d'une source de carbone (Bourgeois et Larpent, 1996).

En Afrique, peu de données existent sur les caractéristiques de la fermentation. Il s'agit généralement de fermentations spontanées, réalisées par simple incubation des poissons crus, parfois ajoutés de sel, aux températures ambiantes. La connaissance scientifique sur les

changements biochimiques et microbiologiques au cours de la fermentation demeure limitée et les résultats publiés sont parfois contradictoires (GRET et CTA, 1993).

La figure 6 présente le procédé traditionnel de préservation du poisson par fermentation suivie de salage et séchage au Sénégal. Le produit obtenu appelé « Guedj » est typique par le fait qu'il garde sa texture comme dans le cas du colombo en Inde (Bourgeois et Larpent, 1996).

**Figure 6** : Schéma de préparation du « guedj » (poisson fermenté, salé et séché) au Sénégal – *Processing scheme of fermented, salted and sun-dried fish product (guedj) in Senegal*



Source: GRET et CTA, 1993

Le « Guedj » est généralement très apprécié par les populations locales et de l’Afrique de l’Ouest et Centrale, à cause des saveurs exceptionnelles qu’il procure (GRET et CTA, 1993 ; Fellows, 1997). Toutefois, la nature spontanée de la fermentation et les conditions hygiéniques déplorables de cette fermentation laisse présager des niveaux de pH élevés dans les produits et une possibilité de contamination croisée. Selon Gram (1992), le stockage du poisson aux températures ambiantes entraîne une augmentation relativement importante de bactéries Gram négatives tel que les Entérobactéries et *Shewanella putrefaciens* dans les produits.

### **6.3 Problématique de la salubrité des produits de la pêche artisanale sénégalaise**

La pêche constitue un secteur vital pour le Sénégal. Elle se caractérise par une prédominance de la pêche artisanale où le conditionnement et la préparation du poisson ne sont généralement pas conformes à ceux requis pour des produits aussi périssables que ceux de la pêche. Le poisson est consommé frais ou transformé traditionnellement par salage et séchage au soleil, par fermentation, salage suivi de séchage, ou encore par salage, fumage et séchage. Ces produits constituent une part non négligeable de la satisfaction des besoins en protéines alimentaires des populations locales et de l'Afrique de l'Ouest et Centrale et une source importante de revenus dans les zones côtières du Sénégal. Toutefois, la qualité hygiénique des produits est douteuse du fait de la nature empirique des procédés de transformations. La tendance dans les procédés traditionnels de transformation consiste à incorporer du chlorure de sodium en grandes quantités afin de réduire la prolifération des microorganismes. L'utilisation d'une barrière additionnelle à celle du chlorure de sodium pourrait permettre d'améliorer la qualité microbiologique des produits. Dans cette perspective, l'utilisation de bactéries lactiques productrices de bactériocines peut constituer une piste intéressante. Certaines stratégies d'application de ces bio-conservateurs dans les aliments ne nécessitent pas d'équipements lourds ni de dépense énergétique élevée.

## **7. POTENTIALITES DES BACTERIES LACTIQUES COMME BIO-CONSERVATEURS DANS LES PRODUITS DE LA PECHE**

### **7.1 Classification du groupe des bactéries lactiques**

A quelques exceptions près, les bactéries lactiques ont pour principales caractéristiques d'être des microorganismes Gram positifs, généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais aérotolérants. Elles ne possèdent ni catalase (certaines possèdent une pseudocatalase), ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase et ont besoin de glucides fermenticibles pour leur croissance. Le produit du catabolisme du glucose est principalement de l'acide lactique (bactéries homofermentaires) ou de l'acide lactique, du CO<sub>2</sub>, et de l'éthanol ou de l'acide acétique ou les deux (bactéries hétérofermentaires). La teneur en guanine et cytosine (G+C) de leur ADN est moins de 50%.

L'application des nouvelles techniques moléculaires de taxonomies a profondément modifié la classification des bactéries sur la base de leur structure génomique. Ces méthodes,

qui consistent, notamment au séquençage des acides nucléiques (ARNr 16S et 23S) permettent de reconnaître les relations phylogénétiques existant entre les bactéries.

L'analyse des séquences des ARNr 16S et 23S, respectivement d'environ 1500 et 2900 nucléotides chez les procaryotes (Guiraud, 1993), révèle que ces molécules présentent des régions variables et des régions hautement conservées, ce qui reflète des degrés différents de contrainte fonctionnelle sur les diverses parties de la molécule ou cours de l'évolution. Les régions conservées correspondent à des structures secondaires permettant d'obtenir un ribosome fonctionnel ; les zones variables (séquences qui changent dans le temps et de façon randomisée) permettent de comparer des organismes proches, alors que les organismes éloignés sont regroupés grâce aux zones conservées (Woese, 1985).

L'utilisation couplée des critères phylogénétiques et phénotypiques ou taxonomie polyphasique, permet de différencier au sein du groupe des bactéries lactiques les genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* et *Carnobacterium* (Vandamme *et al.*, 1996).

## **7.2 Propriétés antibactériennes des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont généralement considérées comme inoffensives et utilisées, depuis l'antiquité pour conserver des denrées alimentaires (Ennahar *et al.*, 2000). Elles sont présentes dans la flore des matières premières crues (lait, poisson, viande, farine, etc.) et sont utilisées en tant que telles (biotechnologies empiriques) ou sous forme de ferment (souche sélectionnée et purifiée) pour réaliser les fermentations alimentaires (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Rodríguez *et al.*, 2000). Elles réalisent dans les aliments une acidification, une production d'arômes, une production d'enzymes permettant d'améliorer la digestibilité des aliments et une inhibition des microorganismes contaminants et pathogènes. Cette dernière activité est due à la production de substances antagonistes tels que les acides organiques (acétique et lactique), le peroxyde d'hydrogène, et le diacétyl (Atrih *et al.*, 2001 ; Lasagno *et al.*, 2002 ; Messens et De Vuyst, 2002), de composés antifongiques tels que les acides gras (Corsetti *et al.*, 1998), ou l'acide phényl-lactique (Lavermicocca *et al.*, 2000), et/ou de bactériocines (De Vuyst et Vandamme, 1994).

## **7.3 Utilisation des bactéries lactiques comme bio-conservateurs dans les produits de la pêche**

### **7.3.1 Utilisation de souches acidifiantes**

Ces souches sont utilisées pour la production d'ensilages de poissons et des produits élaborés fermentés.

Les ensilages de poissons reposent sur les mêmes principes que les ensilages d'herbes ou de maïs: stabilisation du produit par un abaissement rapide du pH et du potentiel d'oxydo-réduction. Dès les années 1950, on a cherché à substituer une fermentation lactique à l'utilisation d'acides minéraux.

Les souches utilisées sont *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus halophilus* et *Pediococcus acidilactici*. L'addition d'une source de carbone s'impose généralement, les quantités d'acide lactique nécessaires à l'abaissement du pH à 4,5 sont plus importantes que dans le cas des ensilages végétaux, en raison du pouvoir tampon du milieu (Bourgeois et Larpent, 1996).

Sur la base des modèles scandinaves de préparation de filets de saumon crus fermentés (gravlax) et de canapés de poissons crus fermentés (i-suchis), on envisage actuellement la fermentation lactique dans un but exclusif de conservation prolongée des produits de la mer en rayons frais. Les premiers travaux qui ont porté sur des produits d'humidité intermédiaire du type surimi fermenté par *Lactobacillus plantarum* ou *Pediococcus damnosus* ont fourni des résultats encourageant (Bourgeois et Larpent, 1996).

### **7.3.2 Utilisation de souches productrices de bactériocines**

- **Unités de mesure d'activité des bactériocines**

L'activité antibactérienne d'une bactériocine contre une souche bactérienne contaminante cible peut être détectée à des concentrations de l'ordre du pico ou nano molaire bien que le spectre d'inhibition à de telles concentrations soit souvent étroit (Nissen-Meyer et Nes, 1997).

L'activité est généralement évaluée de manière semi-quantitative par détermination de la concentration minimale inhibitrice (MIC), c'est-à-dire la plus petite concentration de la bactériocine à laquelle aucune croissance de la souche cible n'est observée. La MIC est exprimée en unité arbitraire/ millilitre ou par gramme (AU/ml ou AU/g). L'unité arbitraire par millilitre (AU/ml) est déterminée en utilisant les techniques de la dilution critique et de diffusion (Parente and Hill, 1992), et la formule  $[(1000/50) \times (1/D)]$ . Cinquante étant le

volume de l'échantillon ( $\mu\text{l}$ ) inoculé dans le puits et D, la plus grande dilution de la solution de bactériocine ayant montré une activité inhibitrice contre la souche indicatrice. Des dilutions de  $\frac{1}{2}$  sont réalisées pour déterminer le MIC.

Une autre unité d'activité de bactériocine, BU, est aussi utilisée dans la littérature. Dans ce cas la croissance de la souche indicatrice est mesurée par spectrophotométrie : un BU est défini comme la plus petite quantité de bactériocine nécessaire pour inhiber la croissance d'une souche indicatrice de 50% [50% de l'absorbance ( $A_{450}$  sur bouillon MRS) de la culture témoin (sans bactériocine)] après 24 h d'incubation des cultures à 30°C (Einarsson et Lauzon, 1995). Par ailleurs, pour certaines préparations de bactériocines disponibles dans le commerce comme la nisine, approuvée à l'utilisation alimentaire dans de nombreux pays (E234), l'activité est aussi déterminée en unité internationale (UI).

Trois stratégies d'application des bactériocines de souches bactériennes lactiques comme bio-conservateur dans les aliments sont généralement répertoriées dans la littérature : l'utilisation de la souche productrice de bactériocine comme culture protectrice, l'addition de la bactériocine purifiée ou partiellement purifiée et l'utilisation de solutions de bactériocine brute issues de la culture d'une souche productrice de bactériocine comme ingrédient dans la transformation des produits alimentaires.

- **Utilisation de cellules vivantes comme cultures protectrices**

Plusieurs travaux ont montré une amélioration du contrôle de certains germes indésirables tels que *Listeria monocytogenes* dans des filets de saumon fumés à froid, en y inoculant des cellules vivantes de souches lactiques productrices de bactériocines (*Lactococcus* sp, *Lactobacillus* sp et *Carnobacterium* sp) comme cultures protectrices au cours de la conservation à des températures variant entre 4 et 10°C (Brillet *et al.*, 2004 ; Brillet *et al.*, 2005 ; Ghalfi *et al.*, 2006<sub>a</sub> et <sub>b</sub> ; Wessels *et al.*, 1996). Cette stratégie a des effets bactériostatiques contre la souche précitée dans les produits permettant d'augmenter leur durée de conservation (tableau 5). Toutefois les effets bactériostatiques contre la flore contaminante totale sont limités voire inexistants lorsque le niveau de cette dernière dans les produits à conserver atteint ou dépasse  $10^{4-5}$  UFC/g (Brillet *et al.*, 2005).



**Tableau 5:** Exemples d'utilisation de cellules vivantes de souches productrices de bactériocine comme cultures protectrices au cours de la conservation de filets de saumon fumé à 4-8°C – *Use of bacteriocin-producing LAB as protective cultures on cold smoked salmon fish products stored at 4-8 °C*

Cultures protectrices et matrice	Bactéries cibles	T (°C)	Effets observés	Source
<i>Cb divergens</i> V41 sur filet de saumon fumé à froid	Mélange de souches de <i>L. monocytogenes</i> (20 ufc/g)	4 - 8	Stabilisation de <i>L. monocytogenes</i> à un niveau < 50 cfu/g pendant 4 semaines	Brillet <i>et al.</i> , 2004
<i>Cb divergens</i> V41 sur filet de saumon fumé à froid (10 <sup>4-5</sup> ufc/g)	Flore contaminante totale (20 ufc/g)	4 - 8	Faible inhibition des Entérobactéries, Lactobacilles, et Moisissures	Brillet <i>et al.</i> , 2005
	Flore contaminante totale (10 <sup>4-5</sup> ufc/g)		Aucun effet sur les Entérobactéries, Lactobacilles, et Moisissures	
<i>Lb curvatus</i> CWBI-B28 sur filet de saumon fumé (10 <sup>6</sup> ufc/cm <sup>2</sup> )	<i>L. monocytogenes</i> (100 ufc/g)	4°C	Stabilisation de <i>L. monocytogenes</i> entre 1,1 et 1,3 log ufc/g pendant 22 jours	Ghali <i>et al.</i> , 2006 <sub>a</sub>
<i>Lc Lactis</i> ATCC 11454 (8x10 <sup>7</sup> ufc/g) Saumon fumé à froid	<i>L. monocytogenes</i> (3x10 <sup>4</sup> ufc/g)	10°C	Réduction du nombre initial de microorganisme de moitié au bout de 1,5 jour, suivi d'une reprise de la croissance (rebond) à un taux inférieure à celui observé sur le témoin négatif (non inoculé avec <i>Lc lactis</i> )	Wessels <i>et al.</i> , 1996

*Cb*: Carnobacterium; *Lb*: Lactobacillus; *Lc*: Lactococcus; *L.*: Listeria.

### • Utilisation de préparations bactéricides comme conservateurs

Dans cette stratégie, les solutions bactéricides plus ou moins pures [surnageants de culture d'une souche productrice de bactériocine, préparations de bactériocine partiellement purifiées à partir du surnageant de culture de la souche productrice ou de poudre commerciale de bactériocine comme la nisine] sont utilisées comme additifs alimentaires le plus souvent en combinaison avec d'autres agents conservateurs chimiques notamment le chlorure de sodium en quantité beaucoup plus réduite par rapport à leur utilisation comme unique conservateur. Ceci est généralement pratiqué dans les produits de pêche élaborés pour de courtes durées de conservation, conservés à basses températures (entre 4 et 8°C). L'effet antibactérien synergique du sel, de la bactériocine, des autres conservateurs chimiques et de la température permet d'améliorer le contrôle des microorganismes dans les produits.

Ainsi, Einarsson et Lauzon (1995) ont rapporté des extensions plus ou moins significatives de la durée de conservation de crevettes (*Pandalus borealis*) en ajoutant dans la saumure du surnageant sans cellule de culture (10%, v/v) de *Lc lactis* (21 jours) ou de *Lb bavaricus* (6 jours), une solution bactéricide de nisine commerciale (21 jours), ou une solution de carnocin UI49 (3 jours), au cours de la conservation à 4,5°C. Ces auteurs ont aussi observé une augmentation de 49 jours de la durée de conservation des crevettes en combinant le sel avec du sorbate de sodium et du benzoate de potassium en concentration finale de 100 ppm chacun (tableau 6). Toutefois, la tendance chez beaucoup de consommateurs est une préférence des produits préservés en utilisant des conservateurs d'origine biologique.

Des résultats similaires relatifs à l'inhibition de *Listeria monocytogenes* sur chair de crabes ont été publiés par Degnan *et al.* (1994) : l'imprégnation de la chair de crabes préalablement déshydratée (par pression) pendant 30 à 60 secondes avec une solution de Alta 2341 (pédiocine), de nisine ou de surnageant de culture bactéricide de *Enterococcus faecium*, permet d'inhiber la croissance de *Listeria monocytogenese* dans le produit au cours de la conservation pendant 6 jours à 4°C (tableau 6).

Ghalfi *et al.* (2006) ont montré que l'ajout d'une suspension bactéricide à base de bactériocines adsorbées aux débris de la membrane des cellules productrices (Yang *et al.*, 1992 ; Benkerroum *et al.*, 2002) dans des filets de saumon fumés à froid permet de contrôler la croissance de *Listeria monocytogenes* dans le produit pendant 22 jours de conservation à 4°C (tableau 6).

Par ailleurs Al-Holy *et al.* (2004) ont montré que le traitement préalable par imprégnation pendant 40 secondes des œufs de saumon (*Oncorhynchus keta*) et d'esturgeon (*Acipenser transmontanus*) avec une solution de nisine (500 UI/ml) salée (3% NaCl), permet de réduire de moitié le temps de réduction décimale à 65°C ( $D_{65^{\circ}\text{C}}$ ) de *Listeria innocua* ATCC5142 de même que le contrôle de la flore mésophile totale contaminante (tableau 7).

Toutefois, certains auteurs ont montré que l'activité antibactérienne des bactériocines dans les aliments dépend de plusieurs facteurs physico-chimiques et biologiques tels que le pH, les forces intra et intermoléculaires, la température et les microorganismes cibles. Les bactériocines sont généralement moins efficaces dans les aliments, comparées à leur activité bactéricide sur milieux de cultures synthétiques. Une des principales limites de l'application des bactériocines dans les produits carnés et sans doute de la mer est leur susceptibilité d'être dégradée par les enzymes protéolytiques (Kouakou *et al.*, 2008). Elles peuvent aussi s'oxyder ou interagir avec les constituants (molécules lipidiques et protéiques) des aliments (Aasen *et al.*, 2003), les rendant non disponibles pour tuer les microorganismes cibles. D'autre part, leur efficacité dépend aussi de la bactériocine utilisée ou de la méthode de conservation (Shelef et Seiter, 1993). Certaines combinaisons de diverses bactériocines avec d'autres conservateurs chimiques peuvent être synergiques ou antagonistes (Gänzle *et al.*, 1999). Par conséquent, les tests sont nécessaires pour évaluer l'efficacité d'une bactériocine donnée dans un système alimentaire donné.

**Tableau 6:** Effets antibactériens de préparations de bactériocines de bactéries lactiques et de leurs combinaisons avec différents conservateurs chimiques sur des produits à base de poisson – *Antibacterial effects by LAB bacteriocin preparations and their combination with different chemical preservative on fish products*

Matrice T (°C)	Bactéries cibles	Solution antibactérienne	V/m (ml/g)	Tps	Effets préservatifs	Source
Crevette <i>P. borealis</i> 4,5 °C	Flore totale	Sol. <sup>a</sup> nisin Z (10 ml) + saumure (90 ml)	1/1	Ind.	D. vie* : 31 jrs	Einarsson et Lauzon, 1995
	contaminant	SNC <sup>b</sup> de <i>Lc lactis</i> SIK-83 (10 ml) + saumure (90 ml)			D. vie : 31 jrs	
		Sol. <sup>c</sup> de carnocin UI49 (10 ml) + saumure (90 ml)			D. vie : 13 jrs	
		SNC <sup>d</sup> de <i>Lb bavaricus</i> MI401 + (10 ml) + saumure (90 ml)			D. vie : 16 jrs	
		(B+S) <sup>e</sup> (10 ml) + saumure (90 ml) Eau potable (10 ml) + saumure (90 ml)			D. vie : 59 jrs D. vie : 10 jrs	
Crabe <i>C. sapidus</i> 4°C	(5x ufc/g)	Alta 2341(pediocin) (2000 – 20000 AU/ml)	200/200	30 à 60 sec.	Baisse de 1,2 à 2,7 du log ufc/g au bout de 0,04 jours, suivie d'une augmentation de 0,5 à 1,6 du log ufc/g au bout de 6 jours	Degnan et al., 1994
		SCN de <i>Ec faecium</i> (2000 – 20000 AU/ml)			Baisse de 1,5 à 2,7 du log ufc/g au bout de 0,04 jours, suivie d'une augmentation de 0,5 à 1,6 du log ufc/g au bout de 6 jours	
		Sol. nisine (2000 – 20000 AU/ml)			Baisse de 1,5 à 2,7 du log ufc/g au bout de 0,04 jours, suivie d'une augmentation de 0,5 à 1,6 du log ufc/g au bout de 6 jours	
		Sol. d'acétate de sodium 4 M			Faible baisse (0,4 à 0,8 du log ufc/g)	
		Sol. de diacétate 0,5 or 1 M			Faible baisse de 0,4 à 0,8 du log ufc/g	
Sol. de diacétate 2 M			Baisse de 2,6 du log ufc/g au bout de 6 jours			
Sol. de TSP 0,25 M			Baisse de 1,7 du log ufc/g			
Sol. de TSP 1 M			Baisse de 4,6 du log ufc/g			
Eau déionisée			Aucune baisse et augmentation du nombre de bactérie après 6 jours			
Saumon fumé 4 °C	L m (10 <sup>2</sup> ufc/g)	Sol. BAMC <i>Lb curvatus</i>		Ind.	Diminution du nombre de cellules en dessous de 0,7 log ufc/g (limite de détection) durant la toute la durée de l'expérience (22 jours)	Ghalfi et al., 2006 <sub>a</sub>
		Control (non traité)			Augmentation de 2 log ufc/g à 3,23 log ufc/g au bout de 14 jours	

Sol. : Solution ; SCN : Surnageant de culture neutralisé ; BAMC : une poudre lyophilisée à activité bactéricide ; TSP : tri-sodium phosphate ; v/m : [Volume de la solution de préservation (ml) / masse de l'échantillon (g)] ; Tps : durée d'imprégnation de l'échantillon par la solution de préservation (ind. : Toute la durée de l'expérience, sec. : seconde) ; Lm : *Listeria monocytogenes* ; Activités bactéricides des solutions ou concentration des agents conservateurs: [a : (8.13 x 10<sup>24</sup> BU/ml) ; b : (6,54 x 10<sup>11</sup> BU/ml) ; c : (27.84 BU/ml) ; d : (2,32 x 10<sup>5</sup> BU/ml) ; e : (1+1) %] – Sol.: solution; SCN: neutralized culture supernatant; V/m (Volume of preservative solution /sample weight);tps: treatment time of the sample with the preservative solutions; ind: during all the storage time; sec.: seconds ; Activity of bactericidal preparations or chemical preservative concentration: [a : (8.13 x 10<sup>24</sup> BU/ml) ; b : (6,54 x 10<sup>11</sup> BU/ml) ; c : (27.84 BU/ml) ; d : (2,32 x 10<sup>5</sup> BU/ml) ; e : (1+1) %].

**Tableau 7** : Effets synergiques d'imprégnation (40 sec.) des œufs de saumon (*Oncorhynchus keta*) et d'esturgeon (*Acipenser transmontanus*) d'une solution de nisine (500 UI/ml) salée (3% NaCl) combinée avec un traitement thermique (radio-fréquence) à 65°C contre la souche de *Listeria innocua* ATCC5142 et la flore mésophile totale contaminant – *Synergistic effect of salmon and sturgeon caviar impregnation with nisin solution combined with heating (65°C) against growth of Listeria innocua and total mesophilic flora*]

Matrice et T (°C)	Bactéries cibles	Solution antibactérienne	V/m (ml/g)	DI (Sec.)	Durée traitement thermique à 65 °C	du Effets préservatifs à 65
Œuf de saumon Salmon (TIC)	<i>L. innocua</i> (8,01 log ufc/g) <i>FMT</i> (7,35 log ufc/g)	Sol. (Nisin + NaCl)	250/120	40	4D	inactivation totale de <i>L. innocua</i> et de la FMT
		Sol. (NaCl)	250/120	40	8D	Réduction de <i>L. innocua</i> de 3 log ufc/g et réduction de la FMT 2,63 log
		Sol. (Nisin + NaCl)	250/120	40	-	Réduction de <i>L. innocua</i> 1,5 log ufc/g et réduction de la FMT de 1,8 log ufc/g
Œuf de saumon esturgeon (TIC)	<i>L. innocua</i> (8,01 log ufc/g) <i>FMT</i> (7,35 log ufc/g)	Sol. (Nisin + NaCl)	250/120	40	4D	inactivation totale de <i>L. innocua</i> et de la FMT
		Sol. (NaCl)	250/120	40	8D	Réduction de <i>L. innocua</i> de 4,3 log ufc/g et réduction FMT de 5,12 log ufc/g

Sol. : Solution ; DI : durée de l'imprégnation des œufs dans la solution de nisine ou le control négatif ; FMT : flore mésophile totale ; D : Temps de réduction décimale de souches de *Listeria innocua* ATCC51742 préalablement évalué à (0,41± 0,07 min.) sur oeuf de saumon, et (0,37±0,02 min.) sur oeuf de esturgeon ; - : aucun traitement thermique ; TIC : (température intérieur de chambre) – Sol.: solution; FMT: total mesophilic flora; TIC: room temperature; DI: impregnation time of the caviar in the nisin or control solutions; D: decimal reduction time of *Listeria innocua* determined at (0,41± 0,07 min.) on salmon caviar, and (0,37±0,02 min.) on sturgeon ; -: not heated  
Source : Al-Holy et al., 2004

## 8. CONCLUSION: APPLICABILITE DES SOUCHES LACTIQUES BACTERICIDES COMME BIO-CONSERVATEURS DE POISSONS AU SENEGAL

Le poisson constitue une source de protéines sensiblement égale à celle de la viande. Il est aussi une denrée qui se dégrade rapidement sous l'action des enzymes d'autodestruction et des microorganismes dont certains produisent des amines biogéniques qui peuvent causer des maladies chez l'homme. La température constitue le principal facteur de contrôle de ces agents de dégradation. La conservation des produits frais entre -2 et 0°C permet de ralentir l'action des agents contaminants entraînant ainsi des augmentations de la durée de conservation des produits de la pêche. Les semi conserves de poisson contiennent typiquement du chlorure de sodium, des substances acides, des conservateurs tels que l'acide benzoïque, l'acide sorbique ou leurs sels, du nitrate. Les produits à base de poisson de courte durée de conservation sont préparés par une combinaison de paramètres tels que l'addition de faible quantité de chlorure de sodium, le fumage à froid, l'abaissement du pH, et sont conservés à des températures comprises entre 4 et 8°C. Dans ces produits, les bactériocines de

bactéries lactiques sont utilisées comme des agents antibactériens permettant d'améliorer la sécurité des produits où les ingrédients comme le sel, les conservateurs chimiques comme le sorbate et les acides qui servent d'habitude comme facteurs d'inhibition de la croissance des microorganismes sont incorporés en faible quantité.

Au Sénégal le conditionnement artisanal (températures ambiantes) des produits frais demeure encore répandu. Par conséquent, la contamination bactérienne est prépondérante dans les produits de la pêche. Les conservateurs chimiques utilisés pour contrôler la croissance des microorganismes dans les produits sont très peu diversifiés et essentiellement limités au chlorure de sodium. Les produits sont conservés par fermentation naturelle et/ou salage et séchage. Ces procédés de transformations, qui utilisent des équipements rudimentaires, ne sont pas standardisés. Il en résulte une qualité microbiologique et sanitaire des produits douteuse, difficile à évaluer, avec des taux d'incorporation de chlorure de sodium très importants (30–40%). L'utilisation des principes inhibiteurs des bactéries lactiques productrices de bactériocines comme barrière additionnelle au chlorure de sodium peut constituer un moyen d'améliorer la qualité microbiologique de ces produits.

Les bactéries lactiques productrices de bactériocines pourraient être utilisées comme ferment (avec ajout d'hydrates de carbone) au cours de la fermentation du poisson pour améliorer le contrôle de la flore indésirable (Entérobactéries, *Staphylococcus* sp et *Bacillus* sp) par la production *in situ* d'acides organiques et de bactériocines, en prélude au salage. Une seconde alternative d'application des souches lactiques productrices de bactériocines dans ces produits est l'utilisation de solutions bactéricides plus ou moins pures issues de cultures de ces souches bactériennes, comme barrière additionnelle contre le développement de la flore au cours de la conservation des produits.

## 9. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aasen IM., Markussen S., Moretro T., Katla T., Axellsson L. and Naterstad K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* **87**:35-43.
2. Adams MR. and Moss MO. (2000). Food Microbiology. *Roy. Soc. Chem.* 2nd ed., 448 p.
3. Al-Holy M., Ruiter J., Lin M., Kang DH. and Rasco B. (2004). Inactivation of *Listeria innocua* in nisin-treated Salmon (*Oncorhynchus keta*) and Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) caviar heated by Radiofrequency. *J. Food Prot.* **67** (9): 1848-1854.

4. Ashie INA., Smith JP. and Simpson BK. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish hand shell fish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**: 87-121.
5. Asita AO. and Campbell IA. (1990). Antimicrobial activity of smoke from different woods. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**: 93-95.
6. Atrih A., Rekhif N., Moir AJG., Lebrihi A. and Lefebvre G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int. J. Food Microbiol.* **68**: 93-104.
7. Baird-Parker TC. (2000). The production of microbiologically safe and stable foods. In B. M. Lund, T. C. Baird Parker and G. W. Gould (eds). The microbiological safety and quality of food. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc., p. 3-18.
8. Baross J and Liston J. (1970). Occurrence of *Vibrio parahemolyticus* and related haemolytic vibrios in marine environments of Washington State. *Appl. Microbiol.* **20**: 179-186.
9. Benkerroum N., Oubel H. and Lben M. (2002). Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *J. Food Prot.* **65**: 799-805.
10. Blight EG., Shaw SJ. and Woyewoda AD. (1988). Effects of drying and smoking on lipids of fish. In: JR. Burt (Ed.). , Fish smoking and drying. Elsevier Applied Science, p 41-52.
11. Blood RM. (1975). Lactic acid bacteria in beverages and foods. In: Proc. 4<sup>th</sup> Long Ashton Symposium (1973). London, Academic Press, 195 p.
12. Bourgeois CM. and Larpent JP. (1996). Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires. Paris: Lavoisier Technique & documentation, 2<sup>ème</sup> édition.
13. Boyd LC., Green DP. and Lepors L. A. (1992). Quality changes of pond raised hybrid striped bass during chillpack and refrigerated storage. *J. Food Sci.* **57**:59-62.
14. Brillet A., Pilet MF., 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.
15. Brillet A., Pilet MF., Prevost H., Cardinal M. and Leroi F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative stain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* **104** (3): 309-324.
16. Cavett JJ. (1968). The effects of newer forms of packaging on the microbiology and storage life of meats, poultry and fish. *Prog. Ind. Microbiol.* **7**: 77-123

17. Corsetti A., Gobetti M., Rossi J. and Damiani P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus Sanfrancisco* CB1. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.*** **50**: 253-256.
18. De Vuyst L. and Vandamme EJ. (1994.). Antimicrobial potential of Lactic acid bacteria. In L. De Vuyst and E. J. Vandamme (eds.). *Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and applications*. London: Blackie Academic and Professional, p. 91-142.
19. Degnan AJ., Kaspar CW., Otwell S., Tamplin ML. and Luchansky JB. (1994). Evaluation of lactic acid bacterium fermentation products and food grade chemicals to control *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. ***Appl. Environ. Microbiol.*** **60**: 3198-3203.
20. Deng J., Toledo RT. and Lillard DA. (1974). Effects of smoking temperatures on acceptability and storage stability of smoked Spanish mackerel. ***J. Food Sci.*** **39**: 596-601.
21. Diei-Ouadi Y. 2005. Minced sardinella fillets in fish-landing and marketing sites in Senegal. In FAO fisheries Circular No 999:FIU/C999(EN).
22. Doe P. and Olley J. (1990). Drying and dried fish products. In Z. E. Zikorski (eds.). *Seafood: Resources, Nutritional composition, and Preservation*. Boca Raton: CRC Press, Inc., p. 125-146.
23. DOPM (Direction des pêches maritimes). 2004. Résultats Généraux des pêches maritimes, Rapport 2004. Ministère de l'économie maritime & des transports maritimes internationaux, république du Sénégal.
24. Doyle MP., Beuchat LR. and Montville TJ. (Eds). (1997). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: ASM Press, 94 p.
25. Efiuwewewere BJO. and Ajiboye MO. (1996). Control of microbiological quality and shelflife of catfish (*Clarias gariepinus*) by chemical preservation smoking. ***J. Appl. bacteriol.*** **80**: 465-470.
26. Einarsson H. and Lauzon HL. (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. ***Appl. Environ. Microbiol.*** **61**: 669-676.
27. Ennahar S, Shashiara T., Sonomoto K. and Ishizaki A. (1999). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. ***FEMS Microbiol. Rev.*** **24**: 85-106.
28. European Parliament and The commission of the European communities. (1995). European Parliament and Commision Directive 95/2/EC. ***Off. J. Eur. Commun.*** **61**: 1-40.
29. FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation), Statistiques 2004 (<http://faostat.fao.org/>).

30. Fellows P. (1997). Traditionnal foods processing for Profits. In P. Fellow (eds.). Meat, Fish and dairy products Chap 6. London: Intermediate Technology Publication, p. 163-191.
31. Flynn S., Sinderen DV., Thornton G M., Holo H., Nes IF. and Collins JK. (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* UCC118. **Microbiology** 148: 973-984.
32. Gänzle MG., Hertel C. and Hammes WP. (1996). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing cultures in meat products: modelling of the effect of pH, NaCl, and Nitrite concentrations on the antimicrobial activity of sakacin P against *Listeria ivanovii* DSM20750. **Fleischwirtschaft** 76:409-412.
33. Garneau S., Martin NI. and Vederas JC. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria, **Biochimie**, 84, 577-592.
34. Gérard P. (1989). Méthode moderne de séchage du poisson. **Nouv. Sci. Technol.** 7 (2): 127-130.
35. Ghalfi H., Allaoui A., Destain J., Benkerroum N. and Thonart P. (2006<sub>a</sub>). Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in Cold-smoked salmon during 4°C storage. **J. Food Prot.** 59 (5): 1066-1071.
36. Ghalfi H., Kouakou P., Duroy M., Daoudi A., Benkerroum N. and Thonart P. (2006<sub>b</sub>). Antilisteria bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 as a Preservative culture in bacon meat and influence of fat and nitrite on bacteriocins production and activity. **Food Sci. Technol. Int.** 12 (4): 325–333
37. Gilbert J. and Knowles ME. (1975). The chemistry of smoked foods: a review. **J. Food Technol.** 10: 245-261.
38. Gram L and Huss HH. (2000). Fresh and processed fish and shellfish. In B. M. Lund, T. C. Baird Parker, G. W. Gould (eds). The Microbiological safety and quality of food. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc, Vol. 1, 488 p.
39. Gram L and Huss HH. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. **Int. J. Food Microbiol.** 33: 121–131.
40. Gram L. (1992). Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice at ambient temperature. In: E. H. Bligh (editor), Seafood Science and Technology. Fishing News Books, Blackwell, Oxford. Chap. 23 pp 225–233.
41. Gram L. and Dalgaard P. (2002). Fish spoilage bacteria-problems and solutions. **Curr. Opin. Biotechnol.** 13: 262-266.



42. GRET (Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques) et CTA (Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale). (1993). Paris : le Point Sur. 286 p.
43. Guiraud JP. (1998). Microbiologie alimentaire. Paris: Dunod.
44. Guiraud JP. (1993). Génétique microbienne ; Bases théoriques et introduction aux applications pratiques. Paris: Technique et Documentation - Lavoisier. 290 p.
45. Horner B. (1992). Fish smoking: ancient and modern. In Proc. *Food sci. Technol. Today* **6**: 166-171.
46. Horner WFA. (1997). Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). In: Hall GM. (Ed.). Fish Processing Technology. London: Blackie Academic & Professional, 2<sup>nd</sup> ed., 32 p.
47. Huss H. H., Reilly A. and Ben Embarek P. K. (2001). Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* **11**:149-56.
48. Huss HH. (1986). Fresh fish: quality and quality changes. A training Prog. on fish technology and quality control. FAO/DANOA/ Rome, 131 p.
49. Ingram M. (1973). The microbiological effects of nitrite. In Proc. International Symposium Nitrite Meat products. Zeist, 1973. Pudoc, Wageningen, p 63-67.
50. Jemmi T. and Keusch A. (1992). Behaviour of *Listeria monocytogenes* during processing and storage of experimentally contaminated hot-smoked trout. *Int. J. Food Microbiol.* **15**: 339-346.
51. Jouve JL. (1996). La qualité microbiologique des aliments, Maîtrise et critères. Paris: Polytechnica, 704 p.
52. Knøchel S. and Huss HH. (1984). Ripening and spoilage of sugar salted herring with and without nitrate. *J. Food Technol.* **19**: 215-224.
53. Kodo JL. (1990). L'ionisation des produits de la pêche. In Ifemer (France) 172p.
54. Korkeala H., Alanko T., Mäkelä P. and Lindroth S. (1989). Shelf-life of vacuum-Packed cooked ring sausage at different chill temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **9**: 237-247.
55. Kouakou P., Ghalfi H., Destain J., Dubois Dauphin R. Evrard P. and Thonart P. (2008). Enhancing the antilisterial effects of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 in pork Meat and Cocultures by limiting bacteriocin degradation. *Meat Sci.* doi: 10.1016/Jjmeatsci.2008.02.015.
56. Lasagno M., Beoletto V., Sesma F., Raya R., Font De Valdez G. and Eraso A. (2002). Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *Microbiologia* **25**: 37- 44.

57. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A. and Gobetti M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds by sourdough *Lactobacillus plantarum* 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4084-4090.
58. Leroi F., Joffraud JJ. and 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. *J. Food Prot.* **63**: 502-508.
59. Meah MN., Harrison N. and Davies A. (1994). Nitrate and Nitrite in foods and Diet. *Food Addit. Contam.* **11**: 519-532.
60. Mejlholm O. and Dalgaard P. (2002). Antimicrobial affect of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letts Microbiol.* **34**: 27-31.
61. Messens W. and De Vuyst L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **72**: 31-43.
62. Moll M. and Moll N. (1998). Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques, © Dunod, 2<sup>e</sup> édition.
63. Nissen-Meyer J. and Nes IF. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* **167**: 67-77.
64. Olsen SJ., Mackinnon LC., Goulding JS., Bean NH. and Slutsker L. (2000). Surveillance for foodborne-disease outbreaks- United States, 1993-1997. Morbidity Weekly report CDC *Surveill. Summ.* **49**: 1-62.
65. OSU (Oregon State University Extension Service). (1993). Fish pickling for home use PNW 183. <http://extension.oregonstate.edu> (visited October 20<sup>th</sup>, 2006).
66. O'Sullivan L., Ross RP. and Hill C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* **84**: 593-604.
67. Parente E. and Hill C. (1992). A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **73** : 290 -298.
68. Quittet C. and Nelis H. (1999). HACCP pour PME et artisans, secteur viande et poisson. Gembloux: Les Presses Agronomiques de Gembloux ASBL.
69. Rodríguez E., Gonzáles B., Gaya P., Nuñez M. and Medina M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by Lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* **10**: 7-15.
70. Salama NA. and Chalafalla GM. (1993). Chemical, bacteriological and sensory changes in Eel fish (*Anguilla vulgaris*) during smooking and storage. *Arch. Lebensmittelhyg.* **44**: 1-24

71. Sanz Y., Vila R., Toldrá F., Nieto P. and Flores J. (1997). Effect of nitrates and nitrites curing salts on Microbiological sensory quality of rapid ripened sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **37**: 225-229.
72. Schillinger U., Geisen R. and Holzapfel WH. (1996). Potential of antagonistic microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. technol.* **7**: 58-64.
73. Shelef LA. and Seiter JA. (1993). Indirect antimicrobials. In A. L. Branen, P. M. Davidson (eds.). Antimicrobials in food. New York: Marcel Dekker, p. 539-569.
74. Shewan JM. (1977). The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes induced by bacterial action. In: Handling processing and marketing of tropical fish. Tropical products Institute, London, p. 51-66.
75. Skovgaard N. (1992). Microbiological aspects and technological needs for nitrates and nitrites. *Food Add. Cont.* **9**: 391- 397.
76. Sofos JN., Busta FF. and Allen C.F. (1979). Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats: a review. *J. Food Prot.* **42**: 739-770.
77. Southcott BA. and Razzell WE. (1973). *Clostridium botulinum* control in cold-smoked salmon: a review. *J. Fish Res. Board Can.* **30**: 631-641.
78. Stansby M. (1962). Proximate composition of fish. In: Heen E, Kreuzer R, editors. Fish in nutrition. Fishing News (Books) Ltd.
79. Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. and Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematics. *Microbiol. Rev.* **60** (2): 407-438.
80. Wessels S. and Huss HH. (1996). Suitability of *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiol.* **13**: 323-332.
81. Woese CR. (1985). Evolution of prokaryotes: Why study evolutionary relationships among bacteria. Eds. K. H. Schleifer, E. Stackebrandt. London: Academic Press.
82. Yang R., Johnson M C. and Ray B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3355-3359.



## **CHAPITRE 2 : LES BACTERIOCINES DES BACTERIES LACTIQUES : MODE D'ACTION BACTERICIDE, CLASSIFICATION, ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE DANS LES ALIMENTS**

### **1. INTRODUCTION**

Les bactériocines sont des peptides (ou protéines complexes) antimicrobiens produits par des bactéries (au niveau des ribosomes), pour tuer d'autres bactéries, généralement proches phylogénétiquement (Flynn *et al.*, 2002). Elles présentent certains caractères décrits chez les peptides antimicrobiens synthétisés au niveau des ribosomes chez les cellules des eucaryotes (molécules cationiques, amphiphiliques et accroissant la perméabilité de la membrane cellulaire). Toutefois, elles apparaissent avoir une plus grande spécificité : l'activité antibactérienne contre les souches sensibles peut être détectée à des concentrations de l'ordre du pico ou nano molaire, bien que le spectre d'inhibition à de telles concentrations est souvent étroit (Nissen-Meyer et Nes, 1997). Presque chez toutes les espèces bactériennes répertoriées, il existe des souches productrices de bactériocines. Toutefois les bactériocines de bactéries lactiques ont été plus intensivement étudiées du fait sans doute de leurs potentialités comme bioconservateurs dans les produits alimentaires.

### **2. ACTION BACTERICIDE AU NIVEAU DES CELLULES CIBLES**

L'action antibactérienne des bactériocines se réalise au niveau de la membrane cellulaire des cellules cibles. Plusieurs études ont montré que le traitement de cellules sensibles aux bactériocines conduit à la dissipation de la force motrice protonique (FMP). Il en résulte un flux de plusieurs composés intracellulaires et la mort de la cellule (Abee *et al.*, 1995 ; Chikindas *et al.*, 2000).

La force motrice protonique est un gradient électrochimique composé d'un potentiel transmembranaire ( $\Delta\psi$ ) et d'un gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ). Ces gradients jouent un rôle de moniteur pour plusieurs processus cellulaires dépendant de l'énergie, permettant à la cellule de maintenir son intégrité (Montville *et al.*, 1995). Les souches productrices de bactériocines sont résistantes (immunité) à l'activité de leur propre bactériocine (De Jong *et al.*, 2006).

### **3. CLASSIFICATION DES BACTERIOCINES**

Cinq principales classes de plus de 200 bactériocines ont été répertoriées dans la littérature. Les bactériocines des bactéries lactiques se retrouvent dans les quatre premières

classes (Klaenhammer, 1993) (tableau 1). La classe V regroupant des bactériocines globulaires de taille variant entre 49 à 108 KDa qui sont rencontrées essentiellement chez des espèces telles que *Clostridium* ou chez les bactéries Gram-négatives.

**Tableau 1:** Vue d'ensemble des bactériocines des bactéries lactiques

Classes	Type	Caractéristiques	Taille (KDa)	charge	Motifs acides caractéristiques	(séquences aminés)	Exemples et producteur
IA	Lantibiotiques	Modifications post-transcription, molécules flexibles	<5		FNDLDENLVI SLCTPGC SXXXCPTTXXCXXXC		Nisin ( <i>Lc lactis</i> ) Lacticin ( <i>Lc Lactis</i> ) Cytolysin ( <i>Ec faecalis</i> ) Streptococcin A ( <i>St pyogenes</i> ) Carnocin U149 ( <i>Cb piscicola</i> ) Variacin 8 ( <i>Mc varians</i> )
IB	Lantibiotiques	Modifications post-transcription, molécules globulaires	<5		FNDLDENLVI FTCCS GXXXTOBX-C		Cinnamycin ( <i>St cinnamoneus</i> ) Ancovenin ( <i>Strep ssp</i> ) Duramycins ( <i>Strep. griseoluteus</i> )
Ila	Non-lantibiotiques	Thermostable, grande activité anti-listeria de type pediocin, un pont disulfure	<10	Fortement cationique	YGNGVXC LSXXELXXXIXGG Double GG		Pediocin PA-1 ( <i>Pc acidilactici</i> ) Leucocin ( <i>Ln gelidum</i> ) Sakacin A ( <i>Lb sake</i> ) Divercin ( <i>Cb divergens</i> ) Enterocin ( <i>Ec faecium</i> ) Bavaricin A ( <i>Lb bavaricus</i> ) Mundtacin ( <i>Ec mundtii</i> ) Carnobacteriocin ( <i>Cb piscicola</i> )
Ilb	Non-lantibiotiques (2 peptides)		<25-65	Faible	GXXXTOBX-C LSXXELXXXIXGG Double GG		Lactococcin G ( <i>Lc Lactis</i> )  Lactacin F ( <i>Lb johnsoni</i> ) Lactocin 705 ( <i>Lb casei</i> ) Acidocin ( <i>Lb acidophilus</i> ) Thermophilin 13 ( <i>St thermophilus</i> )
Iic			<30-65	Cationique			Gassericin A ( <i>Lb Gasseri</i> ) Bac 21 ( <i>Ec Faecalis</i> )
III	Grande taille, thermosensible	Haut poids moléculaire	>30				Helveticin J ( <i>Lb. helveticus</i> )
IV		Protéines complexes (moitié lipidique ou glucidique)	>10				Leuconocin S ( <i>Ln paramesenteroides</i> )

*St* : *Streptococcus* ; *Lc* : *Lactococcus* ; *Ec* : *Enterococcus* ; *Pc* : *Pediococcus* ; *Lb* : *Lactobacillus* ; *Cb* : *Carnobacterium* ; *Ln* : *Leuconostoc* ; *Mc* : *Micrococcus* ; *strep* : *Streptomyces*  
Source : adapté de (De Jong *et al.*, 2006 ; Garneau *et al.*, 2002 ; Ennahar *et al.*, 1999 ; Mc Auliffe *et al.*, 2000).

### **3.1 Les lantibiotiques**

Ce terme est utilisé pour désigner toutes les bactériocines renfermant des acides aminés non habituels (i. e. pas génétiquement codés) tels que la lanthionine (Lan) ou la methyllanthionine (MeLan) (Schnell *et al.*, 1988). Par ailleurs, les lantibiotiques peuvent aussi contenir d'autres résidus d'acides aminés insaturés tels que la 2,3-didéhydroalanine (Dha) et la 2,3-didéhydrobutyrine (Dhb) (Ingram, 1969). Ils ont été subdivisés en deux sous-classes (tableau 6) sur la base de leurs propriétés structurales et fonctionnelles (Jung, 1991). En général, les bactériocines du type I-A sont des peptides flexibles, cationiques, constitués d'une chaîne de plus de 30 résidus d'acides aminés et qui montrent beaucoup de similarité dans l'arrangement de leurs ponts de lanthionine. Elles agissent en perturbant l'intégrité de la membrane cellulaire des cellules cibles où elles forment des pores qui provoquent un efflux important de métabolites cellulaires (Moll *et al.*, 1996).

Les lantibiotiques I-B sont plutôt des peptides globulaires de plus de 19 résidus d'acides aminés ; ils agissent sur certaines fonctions enzymatiques notamment l'inhibition de la biosynthèse de la membrane cellulaire (Sahl *et al.*, 1995).

Les lantibiotiques sont produits au niveau des ribosomes sous forme de pré-peptide (précurseur). Ce dernier subit des modifications post-transcriptions qui aboutissent à la formation de la molécule biologiquement active ou « propeptide » (De vos *et al.*, 1995). Ces modifications consistent d'abord en une extension du pré-peptide au niveau de la partie N-terminale. Le pré-peptide subit d'autres modifications (e. g. formation des ponts thioether lanthionine, de Dha, Dhb) et un ultime clivage au niveau d'un site spécifique aboutissant à la libération du « propeptide » ou lantibiotique mature (Nissen-Meyer *et al.*, 1997). Les produits intermédiaires ont une durée de demi-vie courte, seuls des pré-peptides en différentes étapes de déshydratation ont pu être obtenus (Weil *et al.*, 1990). Plusieurs gènes organisés «en clusters» interviennent dans la biosynthèse des lantibiotiques. Tout près du gène structural (encodant le pré-peptide) d'autres gènes qui codent pour d'autres fonctions ont été mis en évidence, notamment des gènes codant pour une ou plusieurs protéines impliquées dans l'immunité de la souche productrice, un ABC transporteur, une sérine protéase qui est sensé jouer le rôle libérateur du peptide principal, une ou des protéines catalysant la déshydratation et la formation de la chaîne de lanthionine, des protéines régulatrices. Les séquences de ces dernières présentent des similarités avec celles des protéines régulatrices de la biosynthèse des bactériocines à deux peptides (Sahl *et al.*, 1995).

➤ **Exemple de la nisine**

– **Structures primaires et déterminants génétiques**

La nisine, produite par certaines souches de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, est sans doute la première bactériocine découverte chez les Streptococcaceae (Rogers et Whittier, 1928). Les gènes codant pour la nisine se trouvent dans des transposons de grandes tailles (70 kpb), où l'on trouve également le gène d'utilisation du sucrose (Klahenhammer, 1993 ; Rodriguez et Dodd, 1996). Le gène structural code pour un pré-peptide constitué de 57 résidus d'acides aminés. Les 23 situés du côté N-terminal forment la séquence principale qui est amputée au cours de la dernière étape de la biosynthèse générant le pro-peptide (bactériocine mature) formé par les 34 résidus d'acides aminés restants. La structure de la nisine (nisine A) a été élucidée par Gross et Morrel (1971): il s'agit d'un peptide penta-cyclique possédant un 1 Lan, 4 MeLan, 1 Dha et 2 Dhb. Une autre variante naturelle de nisine, la nizine Z, a été décrite par Mulders *et al.*, (1991). La nisine A et la nisine Z diffèrent au niveau d'un acide aminé à la position 27 du pro-peptide, conséquence d'une substitution de nucléotide au niveau du gène de structure : la nisine A contient de l'histidine tandis que la nisine Z possède de l'asparagine. En 2003, une troisième variante de la nisine (nisine Q) a été décrite (Zendo *et al.*, 2003). Les pré-peptides des nisine A et nisine Q, diffèrent au niveau de 6 résidus d'acides aminés dont 4 sont situés dans la zone correspondant au pro-peptide (figures 1A et 1B).

– **Activité biologique**

La nisine exerce une activité bactéricide contre une large variété de bactéries Gram-positives, incluant des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria* et *Mycobacterium*. Elle agit également contre les cellules végétatives et les spores d'une grande variété de souches de *Bacillus* et *Clostridium* (Gross *et al.*, 1971 ; Ray et Daeschel, 1992). Sous certaines conditions, notamment en combinaison avec des substances chimiques qui induisent des dommages au niveau de la paroi externe des bactéries Gram-négatives, la nisine peut aussi agir contre *Escherichia coli* et certaines espèces de *Salmonella* (Stevens *et al.*, 1991).

Par ailleurs, certains travaux ont rapporté que la nisine Z possède une activité inhibitrice antilisteria plus forte que celle de la nisine A (Melgrous, 1999 ; Mansour *et al.*, 1998) ; toutefois d'autres auteurs (Breukink et De Kruijff, 1999) ne font pas de différence entre les bactériocines.

Il a été démontré qu'*in vitro*, la nisine inhibait la biosynthèse de la membrane cellulaire (Resinger *et al.*, 1980). Toutefois, des expériences réalisées sur des cellules bactériennes intactes ont prouvé que le traitement par la nisine avait comme conséquence une perméabilité



très importante de petits composés cytoplasmiques (acides aminés, ions, ATP...) (Sahl H-G. *et al.*, 1987 ; Okereke *et al.*, 1992). Plusieurs travaux ont montré que la nisine a une longueur suffisante et un moment dipolaire suffisant pour réaliser les modèles courants de formation de pores voltage dépendant dans une bicouche lipidique (Freund *et al.*, 1991<sub>a et b</sub> ; Benz *et al.*, 1991 ; Vogel *et al.*, 1993).

Sur la base des données structurales, de tels modèles suggèrent que la nisine s'accumule initialement sur la membrane, adoptant une orientation transmembranaire seulement après qu'un potentiel membranaire suffisamment élevé est réalisé. Une fois insérée dans la bicouche, les molécules se regroupent avec leur partie hydrophobe contre la bicouche lipidique et leur partie hydrophile du côté central. Quand le nombre de peptides regroupés est suffisant, les forces électrostatiques entre les résidus de base dans la partie centrale du complexe (agrégat) peuvent être responsables de l'ouverture des pores (Sahl, 1991). Des travaux plus récents ont permis d'élucider les mécanismes de la fixation de la nisine à la membrane cytoplasmique et la formation des pores.

En effet, certains travaux ont montré que la nisine se fixe de préférence sur les membranes contenant des lipides anioniques (Lipides II). En général, les bactéries Gram-positives ont des concentrations plus élevées en lipides anioniques dans la membrane cytoplasmique (O' Leary *et al.*, 1988). Ceci peut en partie expliquer l'activité bactéricide plus élevée de la nisine contre ces bactéries (Breukink *et al.*, 1997).

Plusieurs travaux ont aussi montré un rôle essentiel de la partie C-Terminale de la nisine sur la fixation à la membrane : des changements dans la partie C-Terminale (au niveau de la position 32) rend la molécule incapable de se fixer sur une membrane contenant des lipides anioniques (Breukink *et al.*, 1997)<sup>3</sup>. La partie N-Terminale de la nisine montre peu d'affinité vis-à-vis de la membrane comparée à la partie C-Terminale : la perte d'une charge positive par le remplacement de la lysine-12 par un résidu de leucine n'influence pas l'interaction initiale de la nisine avec la membrane cellulaire (Giffard *et al.*, 1997)<sup>4</sup>.

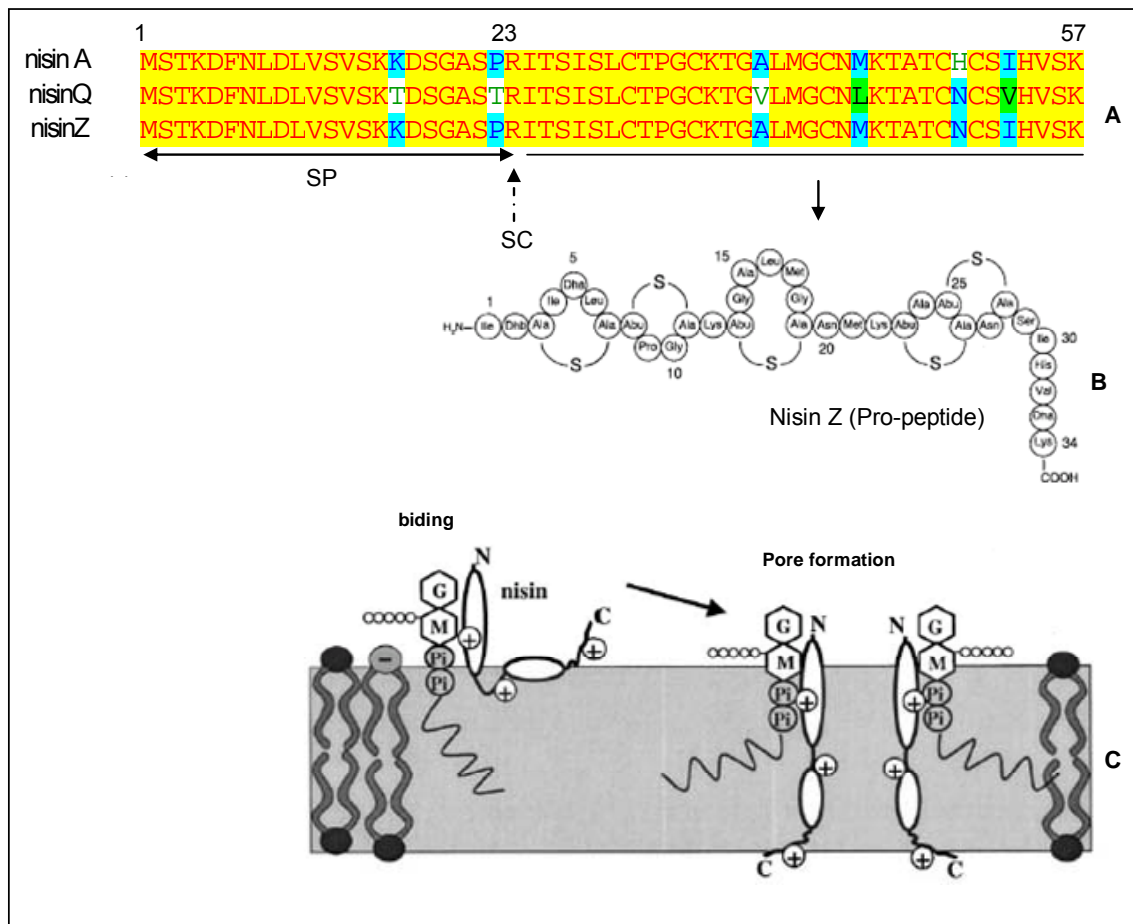
Ceci montre que la partie C-Terminale joue un rôle important dans la fixation de la nisine à la membrane grâce à une interaction électrostatique. L'augmentation de la charge positive de la partie C-Terminale permet d'augmenter l'affinité vis-à-vis la membrane mais pas une amélioration de l'activité de la nisine. En effet, le remplacement de la valine à la position 32 par la lysine n'augmente pas l'activité bactéricide de la nisine (Van Kraaij *et al.*, 1997).

---

<sup>3</sup> Breukink *et al.* 1997, cité par Ghalfi. 2006

<sup>4</sup> Giffard *et al.* 1997, cité par Ghalfi 2006

Il est généralement accepté que la nisine tue les cellules en agissant sur la membrane bactérienne par formation de pores (Figure 1C). La formation de pores produit un effondrement du gradient ionique et une dissipation concomitante de la force motrice protonique de la cellule cible, il s'en suit une perte massive de composés cytoplasmiques entraînant la mort de la cellule.



**Figure 1** : Structures (A et B) et schéma représentant le mode d'action de la nisine (C).

A : comparaison des structures des prépeptides de la nisine A, Z et Q (les zones correspondantes aux séquences principales et le site de clivage à la fin de la maturation de la bactériocine ont été indiqués) ; SP : (séquence principale) ; SC : site de clivage.

B : structure primaire du pro-peptide nisine Z ;

C : schéma de la fixation de la nisine à la membrane cellulaire et de la formation des pores membranaires.

La nisine se fixe sur la moitié hydrocarbonée des lipides II, orientée vers l'extérieure alors que la partie C-terminale s'insère à travers la membrane. La chaîne de lipide II : [G : N-Acetylglucosamine ; M : acide N-Acetylmuramique ; Pi : Phosphate inorganique ; les ronds : Alanine, acide glutamique, lysine, alanine-alanine] ; La nisine : [N : Partie N-terminale ; C : Partie C-Terminale].

Sources : adapté de [(A : Gross *et al.*, 1971 ; Zendo *et al.*, 2003 ; Mulders *et al.*, 1991) ; B : Demel *et al.*, 1996 ; C : Wiedemann *et al.*, 2001 ; Ghalfi, 2006)].

### **3.2 Les bactériocines non-modifiées de type-pédiocine**

Les premières bactériocines décrites appartenant à cette classe sont la pédiocine PA1 (Henderson *et al.*, 1992 ; Nieto Lozano *et al.*, 1992), la sakacin P (Tichaczek *et al.*, 1992), la leucocin A (Hastings *et al.*, 1991), la curvacin A (Holck *et al.*, 1992 ; Tichaczek *et al.*, 1992) et la mesentericin Y 105 (Hécharde *et al.*, 1992). D'autres bactériocines découvertes, Carnobacterium BM1 (Quadri *et al.*, 1994), Enterocin A (Aymerich *et al.*, 1996), Enterocin B (Causas *et al.*, 1997), peuvent aussi être placées dans ce groupe (tableau 1).

Ces bactériocines présentent 40 à 60 % de similarité dans leurs séquences (tableau 6) particulièrement dans la partie N-terminale de leurs molécules (Nissen Meyer *et al.*, 1997). La classe II comprend également plusieurs bactériocines non-modifiées et de type non-pédiocine telle que la lactococcin A un peptide cationique formé de 55 acides aminés qui accroît la perméabilité des cellules sensibles (Holo *et al.*, 1991) et les bactériocines constituées de deux peptides (tableau 6). Ces dernières bactériocines sont typiques par le fait qu'elles sont constituées de deux peptides cationiques différents formés de 25 à 40 résidus d'acides aminés. L'activité antibactérienne requiert la présence des deux peptides en quantités approximativement équivalentes. La lactococcin G fut la première bactériocine à deux peptides à être décrite (Nissen-Meyer *et al.*, 1992).

Alors que la production de bactériocine est généralement liée à la présence de plasmides, les gènes codant pour les bactériocines de la Sous-classe II-a ont été localisés dans des fragments d'ADN chromosomique. Néanmoins, qu'il soit plasmidique ou chromosomique, au moins quatre (cinq pour les bactériocines à deux peptides) gènes (généralement organisés en opéron) sont nécessaires pour la production des bactériocines non modifiées : le gène de structure (deux gènes pour les bactériocines à deux peptides) codant le pré-peptide, un gène d'immunité encodant la protéine qui protège la cellule productrice de sa propre bactériocine, un gène encodant un transporteur ABC transmembranaire qui transporte la bactériocine à travers la membrane et un gène encodant une protéine de régulation de la sécrétion de la bactériocine (Nes *et al.*, 1996).

Le pré-peptide de ces bactériocines contient une séquence N-Terminale principale avec 15 à 20 acides aminés et une séquence (consensus) qui est amputée au niveau d'un motif commun Gly-Gly (GG) (Klaenhammer, 1993).

#### **➤ Exemple de la pédiocine PA-1**

##### **– Structure primaire et déterminants génétiques**

La pédiocin PA-1 est produite par *P. acidilactici* PA. 1 (Chikindas *et al.*, 1993). Le gène structural est localisé sur un plasmide de 9 kpb et code pour un précurseur de 62 résidus

d'acides aminés (Marugg *et al.*, 1992). La bactériocine mature est un peptide très hydrophobe, chargé positivement et constitué de 44 résidus d'acides aminés, et contient deux ponts dissulfures (Henderson *et al.*, 1992).

– **Mode d'action : Fixation à la membrane cellulaire et formation de pores**

La pédiocine PA-1 agit au niveau de la membrane plasmique des cellules cibles en formant des pores voltage indépendant qui causent un efflux important de métabolites cellulaires.

En effet, plusieurs études ont montré qu'à l'opposé des lantibiotiques, qui dissipent totalement à la fois le potentiel transmembranaire ( $\Delta\psi$ ) et le gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) de la cellule cible, la pédiocine PA-1 (tout comme la majorité des bactériocines de la Classe IIa) provoque facilement une dissipation totale du gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) et seulement une faible dissipation du potentiel transmembranaire ( $\Delta\psi$ ) (Bhunia *et al.*, 1991 ; Bruno et Montville 1993 ; Chen et Montville, 1995 ; Kaiser *et al.*, 1996 ; Maftah *et al.*, 1993).

Bhunia *et al.* (1988) ont montré que la pédiocine ACh se lie d'une manière efficace à la surface de la membrane cellulaire sur un site non spécifique. Toutefois, d'autres travaux ont montré que les molécules de pédiocine se lient à la surface de la membrane de manière non spécifique dans un premier temps, puis, dans un second temps, à un récepteur membranaire spécifique.

Les molécules peuvent alors s'insérer dans la membrane cellulaire et s'accumuler formant des structures oligomériques. Ces dernières forment des pores hydrophiliques qui permettent la perte d'ions et de petites molécules par la cellule, cela aboutit finalement à la mort de la cellule, qui peut se produire par éclatement ou non (Chikindas *et al.*, 1993). D'autres études ont montré que la pédiocine PA-1 peut exercer un effet bactériolytique sur certaines souches bactériennes qui lui sont sensibles (Bhunia *et al.*, 1991).

Le type d'activité (bactéricide ou bactériolytique) de la bactériocine dans les différents systèmes testés dépend fortement de la concentration utilisée. Des résultats similaires ont été publiés pour la lactococcin A (Van Belkum *et al.*, 1991), la lactococcin B (Venema *et al.*, 1993), et la pédiocine JD (Christensen *et al.*, 1992). La concentration en pédiocine déterminerait aussi la taille des pores d'exclusion, la libération de molécules de grande taille dans certains systèmes membranaires (liposomes) ne se produisant qu'à des concentrations élevées en bactériocines.

Toutefois lors de ces essais sur les liposomes, il a été noté que quelle que soit sa concentration, la nisine ne permettait pas une libération de grosses molécules (Chikindas *et al.*, 1993).

### **3.3 Les bactériocines de la Classe III**

Ces bactériocines sont thermosensibles et ont été principalement isolées chez le genre *Lactobacillus*. L'acidophilucine A, la caseicine, l'helvéticine J, et la lactacine A ou B sont respectivement produites par des souches de *Lb acidophilus*, *Lb casei* B40, *Lb helveticus* 481, *Lb delbrueckii*.

Les bactériocines regroupées dans cette classe ne sont pas nombreuses, principalement du fait de manque de données suffisantes sur ces larges bactériocines.

### **3.4 Les bactériocines de la classe IV**

Cette classe contient des bactériocines formées de protéines complexes qui possèdent une moitié glucidique ou lipidique indispensable à son activité. A titre d'exemples, la Leuconocine S et la lactocine 27 produites respectivement par *Ln paramesenteroides* (Lewus *et al.*, 1991) et *Lb helveticus* LP 27 (Upreti et Hinsdill, 1975) sont des glycoprotéines.

L'existence de cette classe n'est pas généralement admise. En effet, il pourrait s'agir de simples bactériocines qui n'ont pas été suffisamment purifiées. Les données relatives à ces bactériocines sont très limitées.

## **4. CONCLUSION: EVALUATION DE L'ACTIVITE DES BACTERIOCINES DANS LES ALIMENTS**

A ce jour, de nombreuses bactériocines de bactéries lactiques ont été isolées et caractérisées. Beaucoup de ces bactériocines ont généralement fait l'objet de tests comme bio-conservateurs dans les denrées alimentaires pour inhiber la croissance de certains microorganismes indésirables dans les aliments ou prolonger la durée de conservation des aliments.

La stratégie la plus simple d'utilisation des bactériocines dans les produits alimentaires est l'inoculation des aliments avec la culture vivante de la souche productrice de bactériocine dans des conditions permettant la production *in situ* de bactériocines. Elle est économiquement la moins contraignante (moins coûteuse).

Des préparations de bactériocines obtenues à partir de culture de la souche productrice de bactériocine dans un fermenteur peuvent également être ajoutées dans les aliments (Schillinger *et al.*, 1996). Beaucoup d'études préliminaires sur l'activité des bactériocines dans les systèmes alimentaires sont réalisées en utilisant des préparations de bactériocines plus ou moins purifiées issues des cultures sur milieux liquides. Dans de nombreux cas, la concentration des bactériocines dans les préparations est faible, ce qui peut limiter l'efficacité de tels tests. L'utilisation de préparations de bactériocine pures constitue une stratégie

économiquement lourde. A l'heure actuelle, la nisine est la seule bactériocine purifiée approuvée à l'utilisation alimentaire dans de nombreux pays (E234).

Les produits alimentaires fermentés de façon artisanale constituent des niches écologiques de choix pour le criblage de souches bactériennes lactiques naturelles productrices de bactériocine. Au Sénégal les aliments fermentés naturellement (fermentation spontanée) présentent une grande diversité. Ils peuvent permettre de disposer de nouvelles souches bactériennes lactiques productrices de bactériocine et adaptées aux conditions écologiques dans les différents types de produits.

## 5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abee T. (1995). Pore forming bacteriocins of Gram positive bacteria and self protection mechanism producer organism. *FEMS Microbiol. Letters* **129**: 1-10.
2. Aymerich T., Holo H., Håvarstein LS., Hugas M. and Nes IF. (1996). Biochemical and genetic characterization of Enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the prdiocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1676-1682.
3. Benz R., Jung G. and Sahl H.-G. (1991). In G. Jung, H.-G. Sahl, (eds). Nisin and novel lantibiotics, Leiden: ESCOM, p. 359-372.
4. Bhunia AK., Johnson MC. and Ray B. (1988). Purification, Characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 261-268.
5. Bhunia AK., Johnson MC., Ray B. and Kalchayanand N. (1991). Mode of action of Pediocin Ach from *Pediococcus acidilactici* H on Sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 25-33.
6. Breukink E. and De Kruijff B. (1999). The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**: 223-234.
7. Breukink E., Van Kraaij C., Demel RA., Siezen RJ., Kuipers OP. and De Kruijff B. (1997). The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochem.* **36**: 6968-6976.
8. Bruno MEC. and Montville TJ. (1993). Common mechanistic action of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3003-3010.
9. Causas P., Nilsen T., Cintas LM., NES IF., Hernandez PE. and Holo H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 with can act synergistically with Enterocin A. *Microbiology* **143**: 2287-2294.

10. Chen Y. and Montville TJ. (1995). Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* scott A. **J. Appl. Bacteriol.** **79**: 684-690.
11. Chikindas ML., Garcia-Garcera MJ., Driessen AJM., Ledebroer AM., Nissen-Meyer J., Nes IF., Abee T., Konings WN. and Venema G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. **Appl. Environ. Microbiol.** **59**: 3577-3584.
12. Chikindas ML., Novak J., Driessen AJ., Konings WN., Schilling KM. and Caufield PM. (2000). Mutacin II, a bactericidal antibiotic from *Streptococcus mutans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** **39** (12):2656-2660.
13. Chistensen DP. and Hutkins RW. (1992). Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **Appl. Environ. Microbiol.** **58**: 3312-3315.
14. De Jong A., Van Hijum SAFT., Bijlsma JJE., Kok J. and Kuipers PO. (2006). Bagel: a web-based bacteriocin genome mining tool, **Nucl. Acid Res.** **34**: web server issue, W273 – W 279.
15. De Vos WM., Kuipers OP., Van Der Meer, JR. and Siezen RJ. (1995). Maturation Pathway of nisin and other lantibiotics: Post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram positive bacteria. **Molec. Microbiol.** **17**: 427-437.
16. Demel RA., Peelen A., SIEZEN RJ., De Kruijff B. and Kuipers OP. (1996). Nizin Z, mutant nizin Z and Lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity a monolayer study. **Eur. J. Biochem.** **235**: 267-274.
17. Flynn S., Sinderen DV., Thornton G M., Holo H., Nes IF. and Collins JK. (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* UCC118. **Microbiology** **148**: 973-984.
18. Freund S., Jung G., Gutbrod O. Folkers G. and Gibbons WA. (1991<sub>b</sub>). Nisin and novel lantibiotics. In G. Jung, H.-G. Sahl, (eds.). Leiden: ESCOM, p. 91-102.
19. Freund S., Jung G., Gutbrod O., Folkers G., Gibbons WA., Allgaier H. and Werner R. (1991<sub>a</sub>). **Biopolymers** **31**: 803-811.
20. Ghalfi H. (2006). Sélection et utilisation de bactéries lactiques productrices de bactériocines antilisteria comme bio-conservateur et caractérisation de trois bactériocines produites par *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28. Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique.330p.

21. Giffard CJ., Dodd HM., Horn N., Lahdha S., Mackie AR., Parr A., Gasson MJ. and Sander D. (1997). Structure-fonction relations of variant and fragment nisins studied with model membrane systems. *Biochem.* **36**: 3802-3810.
22. Gross E. and Morell JL. (1971). The structure of Nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **93**:4634-4635.
23. Hastings JW., Sailer M., Johnson K., Roy KL., Vederas JC. and Stiles ME. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* **173**: 7491-7500.
24. Héchard Y., Derijard DB., Lettelier F. and Cenantiempo Y. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y 105, an anti-Listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2725-2731.
25. Henderson JT., Chopko AL. and Van Wassenarr PD. (1992). Purification and primary structure of Pediocin PA-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**: 5-12.
26. Holck A., Axelsson L., Birkeland SE., Aukrust T. and Blom H. (1992). Purification and aminoacid sequence of Sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB706. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2715-2720.
27. Holo H., Nilssen Ø. and Nes IF. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**: 3879-3887.
28. Ingram LC. (1969). *Biochem. Biophys. Acta* **184**: 216-219.
29. Jung G. (1991). Lantibiotics: a survey. Nisin and Novel Lantibiotics. In G. Jung, H.-G. Sahl. Leiden : Escom, p. 1-34.
30. Kaiser AL. and Montville TJ. (1996). Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scoot A cells and lipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4529-4535.
31. Klaenhammer TR. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39-86.
32. Lewus CB., Kaiser A. and Montville TJ. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1683-1688.
33. Maftah A., Renault D., Vignoles C., Héchard Y., Bressolier P., Ratinaud MH., Cenantiempo Y. and Julien R. (1993). Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y 105. *J. Bacteriol.* **175**: 3232-3235.



34. Mansour M., Linder M., Millière JB. and Lefebvre G. (1998). Effets combinés de la nisine, de l'acide lactique et du sorbate de potassium sur les spores de *Bacillus Licheniformis* dans le lait. **Le lait** **78**: 117-128.
35. Marrug JD., Gonzales CF., Kunka BS., Ledebouer AM., Pucci MJ., Toonen MY., Walker SA., Zoetmulder LCM. and Vanderbergh PA. (1992). Cloning, expression and nucleotide sequence of gene involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 **Appl. Environ. Microbiol.** **58**: 2360-2367.
36. Melghrous J., Lacroix C. and Simard RE. (1999). Effect on vegetative cells and spore of tree bacteriocins from lactic acid bacteria. **Food Microbiol.** **16**: 105-114
37. Moll GN., Roberts GCK., Konings WN. and Driessen AJM. (1996). Mechanism of lantibiotic induced pore formation. **Antonie Van Leeuwenhoek** **69**: 185-191.
38. Montville TJ., Winkowski K. and Ludescher RD. (1995). Model and mechanisms for bacteriocin action and application. **Int. Dairy Journal** **5**: 797-814.
39. Mulders JWM., Boerrigter IJ., Rollema HS. and De VOS WM. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic Nisin Z, a natural variant. **Eur. J. Biochem.** **201**:581-584.
40. Nes IF., Diep DB., Håvarstein LS., Brurberg MB., Eijinsk V. and Holo H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **Int. J. Gen. Mol. Microbiol.** **70**: 113-128.
41. Nieto Lozano JC., Nissen-Meyer J., Sletten K., Peláz C. and Nes IF. (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **J. Gen. Microbiol.** **138**: 1985-1990.
42. Nissen-Meyer J., Holo H., Håvarstein LS., Sletten K. and Nes IF. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. **J. Bacteriol.** **174**: 5686-5692.
43. Nissen-Meyer J. and Nes IF. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. **Arch. Microbiol.** **167**: 67-77.
44. O'Leary WM. and Wilkinson SG. (1988). Gram-positive bacteria. In C. Ratledge, S. G. Wilkinson (eds.). *Microbial lipids*, Vol. 1. New York: Academic Press, p 117-201.
45. Okereke A. and Montville TJ. (1992). Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA3679. **Appl. Environ. Microbiol.** **58**: 2463-2467.

46. Quadri LEN., Sailer M., Roy KL., Vederes JC. and Stiles ME. (1994). Chemical and genetic characterization of Bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. **J. Biochemistry** **269**: 12204-12211.
47. Ray B. and Daeschel M. (Eds). (1992). Food biopreservatives of microbial origin. Boca Raton: CRC Press.
48. Resinger P., Seidel H., Tschesche H. and Hammes W P. (1980). The effect of nisin on murein synthesis. **Arch. Microbiol.** **127**: 187-193.
49. Rodriguez JM. and Dodd HM. (1996). Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. **Microbiol. Sem.** **12**: 61-74.
50. Rogers LA. and Whittier EO. (1928). **J. Bacteriol.** **16**: 211-219.
51. Sahl HG. (1991). Nisin and novel lantibiotics. In G. Jung, H.-G. Sahl (eds.). Leiden: ESCOM, p. 347-358.
52. Sahl HG., Jack RW. and Bierbaum G. (1995). Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translation modification. **Eur. J. Biochem.** **230**: 872-853.
53. Sahl HG., Kordel M. and Benz R. (1987). Voltage-dependant depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. **Arch. Microbiol.** **149**: 120-124.
54. Schillinger U., Geisen R. and Holzapfel WH. (1996). Potential of antagonistic microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. technol.** **7**: 58-64.
55. Schnell N., Entian KD., Schneider U., Götz F., Zähler H., Kellner R. and Jung G. (1988). Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesised antibiotic with four sulphide rings. **Nature** **333**: 276-278.
56. Stevens KA., Sheldon BW., Lapes NA. and Klaenhammer TR. (1991). **Appl. Environ. Microbiol.** **57**: 3613-3615.
57. Tichakzek PS., Nissen-Meyer J., Nes IF., Vogel RF. and Hammes WP. (1992). Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin from *L. sake* LTH673. **Sys. Appl. Microbiol.** **15**: 460-468.
58. Upreti GC. and Hinsdill RD. (1975). Production and mode of action of Lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative Lactobacillus. **Antimicrob. Agents Chemother.** **7**: 139-145
59. Van Belkum MJ., Kok J., Venema G., Holo H., Nes IF., Konings WN., and Abee T. (1991). The bacteriocin Lactococcin A. specifically increases permeability of Lactococcal

- cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.* **173**: 7934-7941.
60. Van Kraaij C., Breukink E., Romella HS., Siezen RJ., Demel RA., De Kruijff B. and Kuipers OP. (1997). Influence of charge differences in the C-terminal part of nisin on the antimicrobial activity and signaling capacity. *Eur. J. Biochem.* **247**: 114-120.
61. Venema K., Abee T., Haandrikman AJ., Leenhouts KJ., Kok J., Konings WN. and Venema G. (1993). Mode of action of Lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1041-1048.
62. Vogel H., Nilsson L., Rigler R., Meder S., Boheim G., Beck W., Kurth HH. and Jung G. (1993). *Eur. J. Biochem.* **212**: 305-313.
63. Weil HP., Beck-Sickinger AG., Metzger J., Stevanovic S., Jung G., Josten M. and Sahl HG. (1990). Biosynthesis of the lantibiotic Pep5. Isolation and characterization of prepeptide containing dehydroamino acids. *Eur. J. Biochem.* **194**: 217-223.
64. Wiedemann I., Breukink E., Van Kraaij C., Kuipers O., Bierbaum G., De Kruijff B. and Sahl HG. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pores formation and the inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* **276**: 1772-1779.
65. Zendo T., Fukao M., Ueda K., Higuchi T., Nakayama J. and Sonomoto K. (2003). Identification of the Lantibiotic Nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Bio Biotechnol. Biochem.* **67**:1616-1619.



**PREAMBULE A LA PARTIE SELECTION DE SOUCHES PRODUCTRICES DE BACTERIOCINES A PARTIR DE PRODUITS ALIMENTAIRES TRADITIONNELS D'ORIGINE SENEGALAISE.**

Cette partie a été subdivisée en deux chapitres : chapitre 3 et chapitre 4.

Le premier chapitre (Chapitre 3) décrit la détection, et la caractérisation taxonomique des souches bactériennes lactiques à activité inhibitrice de type bactériocine isolées des produits alimentaires d'origine sénégalaise : douze souches ont été détectées et proviennent de 4 échantillons de produits alimentaires différents. Les souches productrices de bactériocines sont toutes des souches de *Lactococcus lactis subsp lactis*, exceptée une souche d'*Enterococcus faecium*.

Le deuxième (chapitre 4) traite de la caractérisation génétique des bactériocines qui a été entreprise sur 4 souches provenant des 4 échantillons différents. Elle a permis de détecter le gène codant pour l'Entéroisine B chez la souche d'*Enterococcus faecium* (CWBI-B1411), et les bactériocines produites par les *Lc lactis subsp. lactis*. Certaines de ces souches portent le gène codant pour la nisine Z (CWBI-B1426 et CWBI-B1427) alors que la souche CWBI-B1410 porte le gène codant pour la nisine A.

La souche d'entérocoque a été abandonnée car bien souvent considérée comme pathogène. Une caractérisation plus précise de la bactériocine produite par la souche de *Lc lactis* CWBI-B1410, qui a démontré une activité inhibitrice importante, a été réalisée.

L'expression du gène codant pour la nisine a été mise en évidence à partir d'une culture de CWBI-B1410 par RT-PCR suivi de PCR utilisant les amorces spécifiques NisineR/Nisine F.

La préparation de bactériocine brute de cette souche a montré beaucoup de similarités avec une solution de nisine commerciale : les spectres d'inhibition contre différentes souches indicatrices, les profils de sensibilité aux enzymes protéolytiques, les temps de rétention des substances inhibitrices par séparation HPLC-RP sur colonne C<sub>18</sub> sont identiques. Par ailleurs, l'analyse du spectre de masse de la fraction active semi-purifiée obtenue à partir de la préparation brute bactéricide de CWBI-B1410 par séparation HPLC-RP montre trois molécules principales dont une substance de masse moléculaire de 3348 Da similaire à celle de la nisine.



### **CHAPITRE 3: BACTERIOCIN PRODUCERS FROM TRADITIONAL FOOD PRODUCTS**

**Michel Bakar DIOP, Robin DUBOIS-DAUPHIN, Emmanuel TINE, Abib NGOM,  
Jacqueline DESTAIN and Philippe THONART.**

*Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2007 **11** (4), 275-281.

## Abstract

A total of 220 strains of LAB isolated from 32 samples of traditional fermented food from Senegal were screened for bacteriocin production. Two bacteriocin producers, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Enterococcus faecium*, were identified from 12 bacteriocin-producing isolates on the basis of phenotypic analyses and 16S rDNA sequence. Both bacteriocins produced by new isolates show antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* and *Bacillus coagulans* whereas only that produced by *Lactococcus lactis* has an activity against *Bacillus cereus*. Bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains were found in a variety of traditional foods indicating a high potential of growth of this strain in variable ecological complex environment. Partial 16S rDNA of the two bacteriocin producers obtained in this study has been registered to Genbank databases under the accession number **AY971748** for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (named CWBI-B1410) and **AY971749** for *Enterococcus faecium* (named CWBI-B1411). The new bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain has been selected for identification and application of the bacteriocin to food preservation.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Bacteriocin, food preservation

## Résumé

**Sélection de bactéries lactiques productrices de bactériocine à partir d'aliments fermentés traditionnels d'origine sénégalaise.** Un total de 220 souches de bactéries lactiques isolées de produits fermentés traditionnels d'origine sénégalaise a été testé pour détecter une production de bactériocine. Deux espèces bactériennes, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Enterococcus faecium*, ont été identifiées parmi 12 colonies bactériocinogènes, sur la base d'analyses phénotypiques et du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Les bactériocines produites par les deux souches développent une activité bactéricide contre *Listeria monocytogenes* et *Bacillus coagulans* tandis que seule la souche *Lactococcus lactis* est active contre *Bacillus cereus*. Les souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bactériocinogènes ont été détectées dans différents types de produits alimentaires indiquant un potentiel de croissance élevé de cette souche dans divers environnements microbiologiques. Les séquences partielles du gène codant pour l'ARNr 16S des deux souches ont été enregistrées dans la base de données internationale "Genbank" sous les numéros **AY971748** pour *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CWBI-B1410) et **AY971749** pour *Enterococcus faecium* (named CWBI-B1411). La souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a été sélectionnée pour l'identification et l'application de la bactériocine à la conservation des denrées alimentaires.

**Mots - clés:** Bactéries lactiques, bactériocine, conservation des aliments



## 1. INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) are the biological basis for the production of a great multitude of fermented foods (Lasagno *et al.*, 2002). The most important contribution of these bacteria to fermented products is to preserve the nutritive qualities of the raw material and inhibit the growth of spoilage and pathogenic bacteria (Matilla-Sandholm *et al.*, 1999). This inhibition may be due to the production of many metabolites such as organic acids (lactic and acetic acid), hydrogen peroxide, diacetyl and bacteriocins (Ennahar *et al.*, 2000; Lasagno *et al.*, 2002). Some bacteriocins kill only bacteria belonging to the same species as producer whereas other bacteriocins kill a broad range of Gram positive bacteria (Conventry *et al.*, 1997; Ennahar *et al.*, 2000; MC Auliffe *et al.*, 2001; Garneau *et al.*, 2002). The incorporation of these compounds as biopreservative ingredient into model food has been shown to be effective in the control of pathogenic and spoilage micro-organisms (O'Sullivan *et al.*, 2002). They have attracted considerable interest in recent years and several works have focused on the isolation and development of new strains of bacteriocin-producing bacteria. The detection rate of bac<sup>+</sup> strains from LAB isolates can be as low as 0.2% and therefore needs a large number of isolates from food sources (Conventry *et al.*, 1997).

The preservation of foods by lactic fermentation has a long history of use in Africa. The multitude of products can be an appropriate ecological habitat for holding wild strains of LAB capable of producing bacteriocin. The aim of the current study was to select bacteriocin-producing LAB from such products in order to use these proteinaceous inhibitors to improve the microbial quality and safety of foods.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Culture and media

MRS1 agar (MRS with 0.1% glucose, and 50 µg/ml of cycloheximide) and M17m agar (0.5% glucose and 50 µg/ml cycloheximide) were utilised for isolation of bacteria from food sources. Different food-borne pathogens and Gram + bacteria including *Escherichia coli*, *Salmonella infantis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus curvatus* from CWBI collection were used as sensitive. Strains of *Lactobacillus curvatus* are found to be the most suitable indicator for the quantification of antimicrobial effects of all bacteriocins investigated in both agar and broth system (Conventry *et al.*, 1997).

### 2.2 Food sources

Strains were isolated from a total of 32 samples of traditional foods from Senegal (**Table 1**).

### 2.3 Detection of antimicrobial activity

Lactic acid bacteria were isolated from samples, by direct plating on MRS1 or M17m. A 10% (w/v) food sample in diluent [0.1% (w/v) peptone] was homogenized and 10-fold serially diluted. Plates of serial dilution in MRS1 and M17m media were incubated anaerobically (BD, BBL Campypak microaerophilic systems Envelopes, Sparks, USA) for 48 h at 30°C. Plates providing a total of 300 colonies were overlaid with a set of 6 indicators and incubated at 37°C for 12 h.

**Table 1:** Level of prevalence of LAB in food products and distribution of bacteriocin-producing isolates - *Niveau de prévalence des bactéries lactiques dans les produits alimentaires et répartition des souches productrices de bactériocines*

Nature of food	Samples	Prevalence of LAB	Bacteriocin-producing isolates
Fermented seafood	6	10 <sup>3</sup> cfu/g	0
Fresh fish fillet	10	10 <sup>3</sup> cfu/g	3
Cereal (millet)	8	10 <sup>9</sup> cfu/g	7
Dairy	8	10 <sup>9</sup> cfu/g	2
<b>Total</b>	<b>32</b>		<b>12</b>

Colonies producing zones of growth inhibition in the indicator lawn were isolated from within the agar, inoculated into broth media (MRS1 or M17m) and incubated for 24 h at 30°C. Culture supernatant was prepared as follows: an overnight culture of each isolate was centrifuged at 8,000 r.p.m. The resulting supernatant was neutralized (pH 6.5) with NaOH 5N, sterilized by filtering with acrodisc (pore size 0.22 µm) and assayed for the presence of an inhibitor in the broth following the Agar well diffusion assay (WDA) technique (Barefoot *et al.*, 1983) as follows. Molten agar was first seeded with indicator organism (110 µl of overnight culture per 20 ml of agar) in sterile Petri dishes, and after solidification, dried for 15 min. under flow hood. Wells of uniform diameter (6 mm) were bored in the agar. Aliquots (60 µl) of the cell-free supernatant (CFS) were dispensed in wells, and plates were incubated overnight at 37°C. Inhibition of growth was determined by an area of inhibition surrounding each agar well.

### 2.4 Bacteriocin assay

To confirm the bacteriocin effect, catalase (65 UI/ml) was added to CFS and the technique was repeated. The effect of various enzymes and heat treatment of CFS activity were also investigated.

Units and MIC (Minimum inhibitory concentration): The activity present in the neutralized (pH 6.5) cell-free supernatant of producing cultures was determined by twofold serial dilution of the supernatant in sterile phosphate buffer pH 6 (Barefoot *et al.*, 1983). Activity units per milliliter (AU/ml) were determined as the inverse of the last dilution at which growth inhibition was still detectable following the agar WDA. To determine the effects of enzymatic treatments, samples (180 µl of twice the minimum inhibitory concentration corresponding to the supernatant from the cell-free culture) were incubated with 20 µl portion of following enzyme solutions, P3911 (16.6 UI/ml), type XIV (7.9 UI/ml), type XVIII (0.66 UI/ml), proteinase K (59.2 UI/ml), chymotrypsin (700 UI/ml) at 37°C for 1 h 30 min. (Jack *et al.*, 1996) and the residual activity was measured following the WDA. Positive controls were incubated with 20 µl of 50 mM phosphate buffer (pH 6.5). To determine the effect of temperature and pH on the stability of the inhibitor sample corresponding to a dilution of ¼ of neutralized cell-free supernatant (pH 6.5) in 50 mM phosphate buffer at pH 5, 7 and 9, and aliquots of

each were subsequently heated to 60, 70, 80, 90, 100, 110 and 121°C for 10 min. (Ryan *et al.*, 1996). The remaining activity was assayed and compared to activity at each pH prior to heat treatment.

## 2.5 Bacterial identification

Selected isolates were examined microscopically for cellular morphology and Gram stain phenotype. Catalase activity was tested by spotting colonies with 3% hydrogen peroxide. Fermentation of different sugars was determined by API 50 CHL (Biomérieux). PCR was used to amplify the 16S rRNA gene of bacteriocin-producing strains. The 16S rDNA sequence was determined by direct sequencing. Total DNA was isolated by using Wizard<sup>®</sup> genomic DNA purification kit (Promega, Madison, USA). Primers used for PCR and DNA sequencing are presented in **Table 2**. The PCR amplification was performed with the primer pair SPO/SP6 targeted against regions of 16S rDNA (Ventura *et al.* 2001). Amplification of DNA was performed in a Mastercycler personal thermal cycler (Eppendorf). PCR conditions included a hot start at 96°C (5 min.), 25 cycles consisting of hybridation at 50°C (1 min.), polymerisation at 72°C (2 min.), denaturation at 96°C (1 min.) and a final extension at 72 °C (10 min.). PCR products were resolved by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gel and visualized by ethidium bromide (1µl/10ml) staining. 16S rDNA PCR amplicons were purified following the microcon YM-100 kit (Bedford, MA, USA) and sequenced using the Big Dye Terminator V3.0 kit as specified by the supplier with primers described in table 1 while automated sequencing of both strands of the PCR products was done on an ABI 3100 automated gene sequencer (ABI, Forster, USA). The sequences obtained (350–500 bp) were then assembled in silico (Vector NTI) using overlapping zones between the various sequences to form the contiguous sequence. Phylogenetic analysis was realised by an alignment of sequence consensus of the 16S rDNA genes collected in an international database (Genbank). The results were then expressed in percentage of homology between the submitted sequence and the sequences resulting from the database.

**Table 2:** Primers used for PCR and sequencing of 16S rDNA of bacteriocin producers - *Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S des souches productrices de bactériocines*

Technique	Primers	Sequence	Sense	Source
PCR	16SPO	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Forward	Ventura <i>et al.</i> (2001)
	16SP6	5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'	Reverse	Ventura <i>et al.</i> (2001)
Sequencing*	F1	5'-CTGGCTCAGGAYGAACG-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
	F2	5'-GAGGCAGCAGTRGGGAAT-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
	F3	5'-ACACCARTGGCGAAGGC-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
	F4	5'-GCACAAGCGGYGGAGCAT-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
	R1	5'-CTGCTGGCACGTAGTTAG-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)
	R2	5'-AATCCTGTTYGCTMCCCA-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)
	R3	5'-CCAACATCTCACGACACG-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)
	R4	5'-TGTGTAGCCCWGGTCRTAAG-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)

\* Synthetic primers used for sequencing were deduced from alignment of 16S rDNA genes collected from EMBL (European Molecular Biology Laboratory) databases and have been supplied by Sigma-Proligo - *\*Les amorces utilisées pour le séquençage ont été déterminées à partir de comparaison de séquences de 16S rDNA codant pour l'ARN ribosomal 16S de bactéries, collectées de la banque de données de l'EMBL (Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire) accessible via le service 'SRS' du site BEN (Belgian EMBnet Node, <http://www.be.embnet.org>); et ont été fournis par Sigma-Proligo.*

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

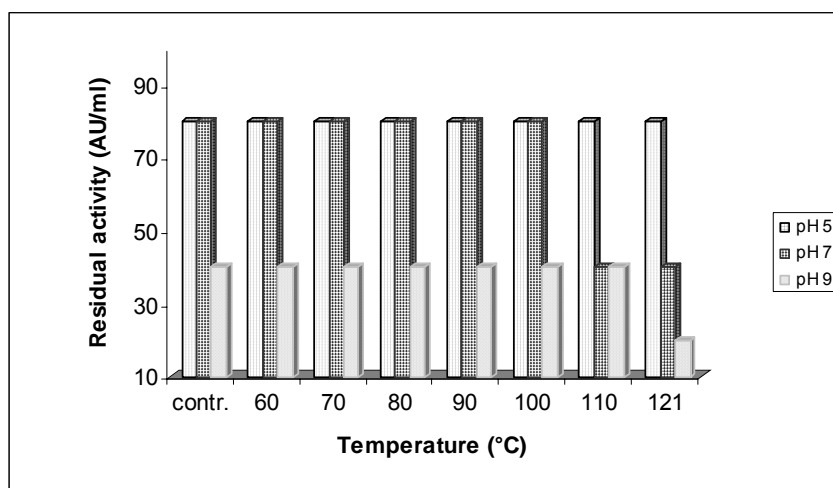
#### 3.1 Detection of antimicrobial activity and bacteriocin assay

A total of about 70000 colonies isolated from food samples were examined for detection of antibacterial activity against a set of 6 indicators. A total of 340 (0.6% detection rate) colonies producing a growth inhibition area in the indicator lawn were recorded. *Staphylococcus aureus* demonstrated the highest detection rate among indicator bacteria. 220 colonies which displayed antibacterial activity against the indicator lawn were randomly isolated and purified. 20 of these strains produced antibacterial activity in the neutralized cell-free supernatant, whereas only 12 confirmed the activity when the CFS was treated with catalase (65 UI/ml). The activity was either completely or partially inactivated by proteolytic enzymes (**Figure 1**) but was resistant to heat (**Figure 2**). These results demonstrated that antimicrobial compounds produced by our 12 isolates were heat stable protein or peptide indicating bacteriocin-like substances. Four food samples (12.5% incidence rate) yielded bacteriocin-producing strains. The distribution of bacteriocin producers in food samples is presented in **Table 2**. Our observations could be correlated with similar studies reported these last years. Garver *et al.* (1993) have reported 13% of products yielding bacteriocin-producers by direct plating and 21% by enrichment while Coventry *et al.* (1997) obtained 43% by direct plating and 46% by enrichment. Lasagno *et al.* (2002) identified two bacteriocin-producers among 206 isolates selected on the basis of the inhibition of *Lactobacillus plantarum* by the CFS using the WDA. Four of the twelve bacteriocin-producing isolates obtained (designated CWBI-B1410, CWBI-B1411, CWBI-B1427 and CWBI-B1428) were selected for further study on the basis of their food source, indicator used for detection, activity against seven indicators and stability of activity upon repeated subcultures.



**Fig. 1:** Effect of catalase and proteolytic enzymes on the antimicrobial activity of neutralized cell-free culture of CWBI-B1410 strain against *Pediococcus Pentosaseus* - *Effet de la catalase et des enzymes protéolytiques sur l'activité antibactérienne du surnageant de culture neutralisé de la souche CWBI-B1410 contre Pediococcus pentosaseus*

**1:** + control, **2:** catalase, **3:** P3910, **4:** chymotrypsin, **5:** PXIV **6:** P XVIII, **7:** pepsin, **8:** proteinase K.



**Fig. 2:** Effect of heating at 60 to 121 °C treatment on the stability of inhibitor in the cell-free supernatant at pH 5, 7 and 9 - *Effet du traitement thermique à température comprise entre 60 et 121 °C sur la stabilité de la substance inhibitrice détectée dans le surnageant de culture de la souche CWBI-B1410 à pH 5, 7 et 9.*

### 3.2 Inhibitory spectra

The sensitivity of 33 bacterial strains from different genera to the bacteriocin-like substances produced by the four selected isolates are presented in table 3. Neutralised cell-free supernatant from CWBI-B1410, CWBI-B1427 and CWBI-B1428 isolates demonstrated similar spectra of activity broader than the one produced by the CWBI-1411 isolate. This one showed a reasonably diverse spectrum. All bacteriocins produced by the four isolates showed antimicrobial activity against *Bacillus coagulans* involved in food spoilage, and the food-poisoning bacterium *Listeria monocytogenes*, whereas only bacteriocins produced by CWBI-B1410, CWBI-B1427 and CWBI-B1428 isolates inhibited *Bacillus cereus*.

### 3.3 Bacteriocin activity

Activity units per ml (AU/ml) of bacteriocins was determined following WDA assay and presented in **Table 4**. *Bacillus coagulans* showed the more sensitivity to bacteriocins. The level of activity against this strain, ( $10^4$  to  $10^5$  AU/ml), can be correlated with similar studies reported these last years. Flynn *et al.* (2002) have reported  $10^6$  AU/ml, using a bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*, whereas Garcia *et al.* (2003) reported  $10^5$  AU/ml with enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis EJ97*. Bacteriocins produced by CWBI-B1410, CWBI-B1427 and CWBI-B1428 isolates also demonstrated an activity of  $10^3$  AU/ml against *Pediococcus pentosaseus* whereas that produced by CWBI-B1411 is more active against *Listeria monocytogenes* (data not shown). CWBI-B1410 showed the highest production of bacteriocin.

**Table 3:** Antimicrobial spectrum of activity of produced bacteriocins - *Spectres d'activité des bactériocines produites par les souches*

N°	indicator bacteria*	Neutralized Cell-free Supernatant			
		A	B	C	D
1.	<i>CWBI-B1410</i>	-	-	-	+
2.	<i>CWBI-B1411</i>	±	+	±	-
3.	<i>CWBI-B1427</i>	-	-	-	+
4.	<i>CWBI-B1428</i>	-	-	-	+
5.	<i>Bacillus cereus</i> BS12	+	+	+	-
6.	<i>Bacillus coagulans</i> LMG 6326	+	+	+	+
7.	<i>Bacillus subtilis</i>	±	+	+	-
8.	<i>Bacillus subtilis</i> 5499 GR1	-	-	-	-
9.	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-
10.	<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-
11.	<i>Enterococcus faecium</i>	±	±	+	+
12.	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-	-	-	-
13.	<i>Erwinia uedovora</i>	-	-	-	-
14.	<i>Lactobacillus brevis</i> 7761	+	+	+	-
15.	<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+	+	+
16.	<i>Lactobacillus doederlein</i> THT	+	+	+	-
17.	<i>Lactobacillus fermentum</i> MU1	+	+	+	-
18.	<i>Lactobacillus helveticus</i> LMG 6413T	+	+	+	-
19.	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LMG 9192	-	-	-	-
20.	<i>Lactobacillus plantarum</i> π	+	+	+	-
21.	<i>Lactobacillus plantarum</i> gobetti	+	+	+	+
22.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	+	+	-
23.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> mbanick Senegal	+	+	+	-
24.	<i>Leuconostoc</i> ezal 2	-	-	-	-
25.	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	+
26.	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	-	-	+
27.	<i>Pediococcus pentosaseus</i>	+	+	+	-
28.	<i>Salmonella infantis</i>	-	-	-	-
29.	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-
30.	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
31.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-
32.	<i>Staphylococcus carnosus</i>	+	+	+	-
33.	<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	+	+	+

A: CWBI-B1428; B: CWBI-B1410; C: CWBI-B1427; C: CWBI-B1411

\* All indicators were tested for inhibition of growth as determined by a zone of growth inhibition in the indicator lawn culture. 60 µl of **Cell-free Supernatant** was inoculated into well; a zone of growth inhibition ≥ 8mm was expressed as positive (+) reaction, lack of inhibition as negative (-) inhibition and a weak area of inhibition < 8 mm (±) - *Toutes les souches indicatrices ont été testées pour détecter l'inhibition de leur croissance se manifestant par la présence d'une zone d'inhibition (halo). 60 µl de surnageant de culture neutralisé ont été inoculés dans chaque puits. Une zone d'inhibition de diamètre ≥ 8mm (y compris le diamètre du puits) a été considérée comme positive; (-) : aucune zone d'inhibition ; (±) : présence d'une faible zone d'inhibition de diamètre < 8 mm.*

**Table 4:** Activity of produced bacteriocins - *Activité des bactériocines produites par les souches*

Indicators	Activity ( x 10 <sup>2</sup> AU/ml)							
	A		B		C		D	
	CFS	CCB	CFS	CCB	CFS	CCB	CFS	CCB
<i>Lactobacillus curvatus</i>	0.8	1.6	<b>3.2</b>	<b>6.4</b>	0.2	1.6	<b>0.2</b>	<b>1.6</b>
<i>Bacillus coagulans</i> LMG 6326	51.2	4010	<b>102</b>	<b>4010</b>	25.6	102	<b>51.2</b>	<b>4010</b>
<i>Pediococcus pentosaseus</i>	3.2	12.8	<b>6.4</b>	<b>25.6</b>	0.8	6.4	-	-

A: CWBI-B1428; B: CWBI-B1410; C: CWBI-B1427; C: CWBI-B1411

CCB: crud concentrated bacteriocin (not still purified); CFS: cell-free supernatant; -: no inhibition - *CCB: concentré brut de bactériocine obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium (40%) ; CFS: Surnageant de culture sans cellule neutralisé; -: absence d'inhibition*

### 3.4 Identification of bacteriocin-producers

Bacteriocin-producing isolates were catalase negative, and Gram positif cocci (CWBI-B1410, CWBI-B1427 and CWBI-B1428) or ovoid (CWBI-B1411). Fermentation of different carbohydrates was performed using the API 50 CHL system (API Biomerieux). 22 reactions (sugar fermentation) were determined and 6 of them provided a mean of discriminating them (**Table 5**). Identification made by the API database correlation indicated that all the four strains were *Lactococcus lactis subsp. lactis*. However, a low percentage of similarity (91%) was obtained for CWBI-B1411 (**Table 6**).

Nucleotide sequences of 16S rDNA of the four bacteriocin-producing isolates were carried out to confirm or infirm biochemical species identification. The determined 16S rDNA sequences of isolates were compared directly with the Genbank database. A high level of similarity of 16S ribosomal DNA nucleotide sequences (99% of matches) of CWBI-B1410, CWBI-B1427 and CWBI-B1428 strains was observed with the sequences of *Lactococcus lactis subsp. lactis* strains whereas the sequence of CWBI-B1411 strain matched best with that of *Enterococcus faecium* strains (**Table 6**). The closest matches for CWBI-B1411 strain and *Enterococcus faecium* were different from the identification determined by API method (**Table 6**). However, we prioritized genetic identification because of it accordance with morphology analysis, and the low percentage of similarity obtained by biochemical analysis which could be due to the inadequacy of API CHL 50 for well identification of *Enterococcus strains*. Partial 16S rDNA of the two bacteriocin-producing isolates *Lactococcus lactis subsp. lactis* (CWBI-B1410) and *Enterococcus faecium* (CWBI-B1411) have been registered to Genbank databases respectively under the accession numbers **AY971748** and **AY971749**. Due to the high amount of bacteriocin produced in the culture supernatant, the *Lactococcus lactis subsp. lactis* strain (named CWBI-B1410) was selected for further investigations.

**Table 5:** Distinguishing carbohydrate fermentations for characterization of bacteriocin-producing strains - *Principaux hydrates de carbone permettant de différencier les profils fermentaires des souches productrices de bactériocines*

Carbohydrates*	bacteriocin-producing strains			
	A	B	C	D
L-arabinose	-	+	+	+
D-xylose	+	+	-	-
D-saccharose	+	+	+	-
D-trehalose	+	+	+	-
D-melibiose	-	-	-	+
D-tagatose	-	-	-	+

A: CWBI-B1428; B: CWBI-B1410; C: CWBI-B1427; D: CWBI-B1411

\*Reaction for each carbohydrate were obtained from API CHL 50 and positive (+) and negative (-) reactions are indicated.

\*Les réactions pour chaque hydrate de carbone ont été obtenues en utilisant une galerie API 50 CHL; (+): fermentation du sucre ; (-): pas de fermentation

**Table 6:** Comparison between API and 16S rDNA identifications of the bacteriocin-producing bacteria - *Comparaison des résultats de l'identification des bactéries productrices de bactériocine par test API et par séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S.*

isolate	API CHL identification	% of identity	Identification by 16S rDNA sequence alignment			
			Sequence length (pb)	Similar sequences	Sequence number access	% of match
1*	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1	95.7%	1524	<i>Lactococcus lactis</i> ribosomal RNA	GI44070	99%
	<i>Lactobacillus brevis</i>	3.9%		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	GI12725338	99%
				<i>Lactococcus lactis</i> strain SL3	GI53766276	99%
2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	91.6%	1495	<i>Enterococcus faecium</i>	GI27368101	99%
	<i>Lactobacillus brevis</i>	5.5%		<i>Enterococcus faecium</i>	GI16508144	99%
				<i>Enterococcus faecium</i> strain SF	GI53766369	99%

1: CWBI-B1410; 2: CWBI-B1411

\* Similar results were observed for CWBI-B1427 and CWBI-B1428 - *Des résultats similaires ont été observés pour les souches CWBI-B1427 et CWBI-B1428*

#### 4. CONCLUSION

Traditional fermented foods from Senegal provide an appropriate ecological habitat for wild bacteriocin-producing LAB. Bacteriocin producers mainly belong to *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* group. Bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains were found in a variety of fermented products indicating a high potential of growth of this strain in different ecological complex environment. The produced bacteriocins showed a broad spectrum of activity including spoilage microorganisms and pathogens associated with food such as *Bacillus coagulans*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. These results show the potential usefulness of these bacteriocins justifying a more in depth investigation for their identification and application as food biopreservatives.

#### Acknowledgments

We are grateful to Belgian University Development Centre (CUD) who financially supported this research which was realized in both the Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI)/Agricultural University of Gembloux/Belgium, and the Ecole Polytechnique Supérieure (ESP)/University of Dakar/ Senegal.



## 5. REFERENCES

1. Barefoot SF., Klaenhammer TR. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **45** (6) p. 1808-1815.
2. Coventry MJ., Gordon JB., Wilcock A., Harmark K., Davidson BE., Hickey MW., Hillier AJ., Wan J. (1997). Detection of bacteriocin of LAB isolated from food and comparison with pediocin and nisin. *J. Appl. Microbiol.* **83** p. 248-258.
3. Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24** p. 85-106.
4. Flynn S., Sideren DV., Thornton GM., Holo H., Nes IF., Collins JK. (2002). Characterisation of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius subsp. Salivarius UCC 118*. *Microbiology* **148** p. 973-984.
5. Garcia MT., Ben Omar N., Lucas R., Pérez-Pulido R., Castro A., Grande MJ., Martínez-Cañamero M., Gálvez A. (2003). Antimicrobial activity of Enterocin EJ.97 on *B. coagulans CECT12*. *Food Microbiol.* **20** p. 533-536.
6. Garneau S., Martin NI., Vederas JC. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* **84** p. 577-592.
7. Garver KI., Muriana PM. (1993). Detection, Identification and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from retail food products. *Int. J. of food Microbiol.* **19** p. 241-258
8. Jack RW., Wan J., Gordon J., Harmark K., Davidson BE., Hillier AJ., Wettenhall, REH., Hickey MW., Coventry MJ. (1996). Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola JG 126*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **62** (8) p. 2897-2903.
9. Lasagno M., Beoletto V., Sesma F., Raya R., Font De Valdez G., Eraso A. (2002). Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *Microbiologia* **25** p. 37- 44.
10. Matilla-Sandholm T., Mättö J., Saarela M. (1999). LAB with health claim- interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. dairy J.* **9** p. 25-35.
11. McAuliffe O., Ross RP., Hill C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25** p. 285-308.

12. O'Sullivan L., Ross RP., Hill C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84 p. 593-604.
13. Ryan MP., Rea MC., Hill C., Ross RP. (1996). An application in Cheddar Cheese Manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a Novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. and Environ. Microbiol.* **62** (2) p. 612-619.
14. Ventura M., Elli M., Reniero R., Zink R. (2001). Molecular microbial analysis of bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecol.* **36** p. 113-121.

**CHAPITRE 4: *IN VITRO* DETECTION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN-LIKE  
INHIBITORY ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) ISOLATED FROM SENEGALESE LOCAL  
FOOD PRODUCTS**

**Michel Bakar DIOP<sup>1, 2</sup>, Carine DORTU<sup>1</sup>, Robin DUBOIS-DAUPHIN<sup>1</sup>, Jacqueline  
DESTAIN<sup>1</sup>, Emmanuel TINE<sup>2</sup> and Philippe THONART<sup>1</sup>**

Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI)/ Gembloux Agricultural University  
(FUSAGx), 2, Passage des Déportés, B 5030 Gembloux, Belgium,

Laboratoire de Microbiologie et Génie industrielle, Université Cheikh Anta DIOP, Ecole  
Supérieure Polytechnique, BP 5085 Dakar, Sénégal

**(Submitted to African Journal of Microbiological Research)**

## Abstract

Prevalence of lactic acid bacteria was determined at  $10^9$  CFU/g in millet flour and milk products, and  $10^3$  CFU/g in seafood products, generally preserved by spontaneous (without addition of starters) fermentation in Senegal. Twelve bacteriocin-like substances producers (bac+) were detected of 220 lactic acid bacteria strains randomly selected from such products. The eleven were characterized (API 50CH method and 16S rDNA sequence) as *Lactococcus lactis subsp. lactis* strains and the remaining one as an *Enterococcus faecium* strain. Nisin and enterocin B encoding genes were respectively screened of the bac+ Lactococcal strains and the Enterococcus. Bac+ *Lactococcus lactis* strains were isolated from different products indicating a high potential of growth by these strains in variable ecological environments. The expression of nisin gene was carried out from culture of the main screened strain named *Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410 which showed the highest in vitro antibacterial activity. CWBI-B1410 antibacterial preparation showed many similarities with classic nisin solution (inhibitory effects, heat resistance, and protease sensitivity profile as well as retention time of the antibacterial substances on C<sub>18</sub> column) suggesting a production of nisin-like substance. This strain has been selected for application as additional barriers to supplement sodium chloride for improving bacterial quality of fish commodities in Senegal.

Keywords: *Lactococcus lactis*; Antimicrobial; Bacteriocins; Nisin-like substance

## 1. INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) occur naturally in several raw materials (e. g. Milk, meat, flour, etc.) used to produce foods (Rodriguez *et al.* 2000). They are the biological basis for the production of fermented foods in which they perform both acidification, flavour-compound production, as well as protection of the foods from spoilage and pathogenic microorganisms due to the production of lactic and acetic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, fatty acids, phenyllactic, and/or bacteriocins (Corsetti *et al.* 1998).

Bacteriocins are ribosomally synthesized, extracellularly released bioactive peptides or peptide complexes that have a bactericidal or bacteriostatic effect on other (usually closely related) species (Flynn *et al.* 2002). Many bacteriocins produced by lactic acid bacteria like nisin and lactacin 3147 produced by some *Lactococcus lactis* strains, have broad spectrum of inhibition and are found to be effective to prevent microbial food spoilage and to inhibit growth of pathogens in certain food systems (Abee *et al.* 1995; Einarsson and Lauzon 1995; Ryan *et al.* 1996). Therefore, these proteinaceous inhibitors have become the focus of considerable interest these last decades in the field of foods preservation. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria originally isolated from a food are best candidates for improving the microbiological safety of these foods because they are well adapted to the conditions in the foods and should therefore be more competitive than other lactic acid bacteria from other sources. However the detection rate of bacteriocin-producing strains from lactic acid bacteria isolated from foods can be as low as 0.2% (Conventry *et al.* 1997; Garver and Muriana 1993).

Food fermentation by using LAB as natural starters is a widespread preservation strategy in Senegal. The resulting food commodities can be appropriate ecological habitats for holding wild strains of lactic acid bacteria capable of producing bacteriocins. The aim of the current study was to identify bacteriocin-producing strains from Senegalese traditional foods lactic

acid bacteria, and to characterize their *in vitro* bactericidal activity in the perspective of their use as biopreservatives during fish products storage in Senegal.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Bacterial strains and media**

Modified MRS (MRSm) and M17 (M17m) [e. g. with 0.1% (wt/vol.) of glucose content, and supplemented with 50 µg/ml of cycloheximide (Sigma, St Louis, USA) and 100 UI/ml of polymixin B (Sigma, St Louis, USA) (Davidson and Cronin 1973)] were used for isolation of lactic acid bacteria from foods. The glucose quantity was reduced to lower the production of lactic and acetic acids by isolates (Conventry *et al.* 1997). *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella infantis*, *Salmonella typhimurium*, *Pediococcus pentosaseus*, and *Lactobacillus curvatus*, used as indicators strains for detection of antimicrobial and bactericin-like inhibitory activity, were obtained from the culture collection of the Unity of Bio-Industries (Gembloux Agricultural University, Belgium).

### **2.2 Source and nature of food samples**

Thirty two local food samples were used for the isolation of lactic acid bacteria. They were purchased from traditional marketing sites in Dakar and Thies (Senegal) and include fermented and raw seafood, fermented milk, and fermented millet flour products. These foods are generally stored at ambient temperatures (around 30°C) in the marketing sites.

### **2.3 Isolation of foods lactic acid bacteria and selection of isolates for bacteriocin assays**

Lactic acid bacteria were isolated from foods by direct plating. A 10% (wt/vol.) food sample in peptone (0.1%) water was homogenized and 10-fold serially diluted. One hundred microliters of each dilution was spread on MRSm or M17m. Plates were incubated anaerobically (BD, BBL Campypak microaerophilic systems envelopes, Sparks, USA) for 48

h at 30°C. Those providing about 400 colonies were overlaid with 3 ml of soft (0.75%) agar medium inoculated with 30 µl of culture of the indicators strains described above. Plates were incubated overnight at 37°C and colonies producing zone of growth inhibition (clearing zone around the colony) in the indicator lawn were randomly selected and purified for bacteriocin assays.

#### ***2.4 Detection of bacteriocine-like inhibitory substances production by selected isolates***

The detection of bacteriocin-like inhibitory substances in the neutralized cell-free culture supernatant (NCFS) of the selected isolates was performed by agar well diffusion (WDA) technique described by Barefoot and Klaenhammer (1983). In order to eliminate the inhibitory effect of lactic acid and/or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the supernatants were adjusted to pH 6.5 with NaOH 5N and treated with catalase at final concentration of 65 (UI/ml), following by filtration through a 0.22 µm pore size filter (Type Minisart NML; Sartorius GmbH, Göttingen, Germany). The antibacterial activity of the NCFS of the positive (bac+) strains was evaluated by the critical dilution assays (Barefoot and Klaenhammer 1983). The minimal inhibitory concentration (MIC) of each NCFS was defined as the reciprocal of the highest dilution showing halo of inhibition. It was expressed in arbitrary units per milliliter (AU/ml). To assess the sensitivity of the antimicrobial agent in the NCFS to proteolytic enzymes, 180 µl of diluted NCFS of 160 AU/ml were incubated with 20 µl portion of the following enzyme solutions [P 3911 protease (16.6 UI/ml), P XIV protease (7.9 UI/ml), P XVIII protease (0.66 UI/ml), proteinase K (59.2 UI/ml), chymotrypsin (70 UI/ml), and pepsin (80 UI/ml) and trypsin (75 UI/ml), for 1 h 30 min. at 37°C. Positive controls were incubated with 20 µl portion of 50 mM phosphate buffer (pH 6.5). The residual activity was measured following the WDA. The stability of the inhibitor in the NCFS of new isolates to heat was assessed at different pH by diluting to 1/4 the NCFS in 50 mM phosphate buffers adjusted at pH 5, 7 and

9, respectively. Samples were placed in water bath at 60, 70, 80, 90, 100, 110 and 121°C for 10 min. The antibacterial activity of the heated samples was assessed by critical dilution as described above, and compared to those of the not heated samples.

### ***2.5 Phenotypic characterization of the bacteriocin producers***

Bacteriocin-producing strains were examined microscopically for cellular morphology, and Gram stain phenotype was determined by KOH method (Buck 1982). Catalase activity was tested by the 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> method. Fermentation patterns and biochemical strains identification were performed by using API 50 CH (Biomérieux, Benelux); results were obtained by calling the computerized database service provided by the manufacturer.

### ***2.6 Characterization of the bacteriocin producer strains by 16Sr DNA***

Total DNA was isolated from liquid culture of bacteria by using the Wizard<sup>®</sup> genomic DNA purification kit (Promega, Madison, USA), and used as a template for the amplification of the 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction (PCR). This was performed with the primer pair SPO and SP6 (table 1) targeted against regions of 16S rDNA. PCR products were resolved by electrophoresis in 1% (wt/vol.) agarose gel, visualized by ethidium bromide staining, and purified following the microcon YM-100 kit (Bedford, MA, USA). They were sequenced by using a set of 8 universal primers (table 1) and the Big Dye Terminator V3.0 kit as specified by the supplier. Analysis of the nucleotide sequences was performed by using the Vector NTI (Version 8) program package (BD Biosciences, San Jose, USA).



**Table 1:** Universal and specific primers used for PCR and sequencing of bac<sup>+</sup> strains 16S rDNA and bacteriocin genes.

Targeted genes	Technique	Primers	Sequence	Sense	Source
	PCR	16SPO	5'-AAGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'	Forward	(Ventura <i>et al.</i> 2001)
		16SP6	5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'	Reverse	(Ventura <i>et al.</i> 2001)
16S rDNA	Sequencing*	F1	5'-CTGGCTCAGGAYGAACG-3'	Forward	
		F2	5'-GAGGCAGCAGTRGGGAAT-3'	Forward	
		F3	5'-ACACCARTGGCGAAGGC-3'	Forward	
		F4	5'-GCACAAGCGGYGGAGCAT-3'	Forward	
		R1	5'-CTGCTGGCACGTAGTTAG-3'	Reverse	
		R2	5'-AATCCTGTTYGCTMCCA-3'	Reverse	
		R3	5'-CCAACATCTCACGACACG-3'	Reverse	
		R4	5'-TGTGTAGCCCWGGTCRТАAG-3'	Reverse	
Bacteriocin genes	PCR* and sequencing*	NisinF	5'-TTATTTGCTTACGTGAATAC-3'	Forward	(Gross <i>et al.</i> 1971;
		Nisin R	5'-AGATTTAACTTGGATTTC-3'	Reverse	Mulders <i>et al.</i> 1991)
		Enterocin A F	5'-AAATATTATGGAGTGTAT-3'	Forward	(Fouquié <i>et al.</i> 2003;
		Enterocin A R	5'-GCACTTCCCTGGAATTGCTC-3'	Reverse	Park <i>et al.</i> 2003)
		Enterocin B F	5'-AAAATGTAAAAGAATTAAGTACG-3'	Forward	Fouquié <i>et al.</i> 2003
		Enterocin B R	5'-AGAGTATACATTTGCTAACCC-3'	Reverse	
		Enterocin L50A F	5'-ATGGGAGCAATCGCAAATTA-3'	Forward	Fouquié <i>et al.</i> 2003
		Enterocin L50AR	5'-TTTGTTAATTGCCATCCTTC-3'	Reverse	

\* The primers were deduced from alignment of 16S rDNA or nisin and enterocin genes collected from EMBL (European Molecular Biology Laboratory) and Genbank databases, and have been supplied by Sigma-Prologo.

## 2.7 Genetic characterization of nisin and enterocin B structural genes

A screening of presence of bacteriocin genes was performed by PCR and sequencing as described above, by using the specific primers presented in table 1. Sequences were treated by using the Vector NTI (Version 8) program package, translated to proteins, and the deduced amino acid sequences were aligned to those of bacteriocin precursors collected from the Fasta or Genbank database.

## 2.8 Determination of transcription of nisin structural gene to mRNA in the main screened bac<sup>+</sup> strain (CWBI-B1410)

The transcription of nisin structural gene to mRNA required for biosynthesis of nisin was carried out in the main screened bac<sup>+</sup> strain by PCR, in using the specific primers pair Nisin F/Nisin R (table 1), and the cDNA obtained by RT-PCR performed on total RNA isolated of cultures of the new isolate, as template. Total RNA of the isolate was purified by using the RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The synthesis of the first strand cDNA was

performed in using the reverted first strand cDNA synthesis kit (Fermentas Life Sciences, Germany) as specified by the supplier.

### **2.9 Comparison of the bacteriocin-like inhibitory substance of CWBI-B1410 with nisin**

High potency commercial nisin powder (Fluka, Buchs, Deutschland) was used for preparation of nisin filter sterilized antimicrobial stock solution at concentration of 2 mg/ml in deionized distilled water (ddH<sub>2</sub>O), whereas the main screened bac<sup>+</sup> strain was grown at 30°C on 1.5 l of modified MRS broth consisting to minimize the quantity of peptone, meat extract and yeast extract [each at concentration of 0.1% (wt/vol.)] to limit the proportion of protein and peptide compounds from the medium in the bacteriocin-like inhibitory culture supernatant. Concentrated crude antimicrobial preparation was prepared from culture supernatant of the bac<sup>+</sup> strain by precipitation with solid (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at final concentration of 242 g/l at 4°C with stirring. The precipitate was collected by centrifugation at 17 000 x g for 20 min. at 4°C, suspended in 50 ml of purified (Milli-Q) water, and filter sterilized (pore size 0.45 µm; Type Minisart NML; Sartorius GmbH, Göttingen, Germany). The activity of this solution activity was determined by critical dilution. The concentrated crude antimicrobial preparation was desalted as follows: 25 ml of the preparation were passed through a 60 ml C<sub>18</sub> solid phase extraction cartridge (Applied Separation, Allentown, USA) in a vacuum. The Column was washed with 400 ml of purified (Milli-Q) water until discoloration. The antimicrobial substances were eluted from the cartridge by using 90 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 6.5) containing 40% isopropanol. The liquid phase (water and isopropanol) were evaporated to dryness in a speed-vac (Savant sc, 110 A). The residue was dissolved in 7.5 ml of purified (Milli-Q) water to have an antibacterial preparation of the new bac<sup>+</sup> isolate with activity similar to that of a ten fold dilution of the nisin solution stock. The inhibitory effects against a diversity of indicators strains, heat and protease sensitivities as well as reverse-phase high

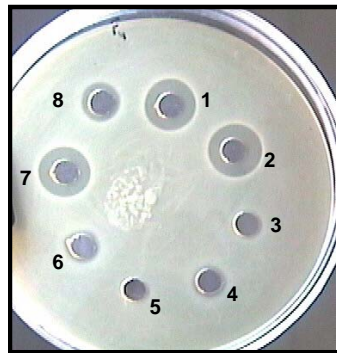
performance liquid chromatography (RP-HPLC) separation of the two solutions, were compared. The C<sub>18</sub> reverse-phase high performance liquid chromatography separation was performed on a analytical column (Chromospher, 4.6 x 250 mm, 5 µm, Varian) by using a cycle similar to that defined by Meghrouts *et al.* 1997. The eluates from the column were collected into different fractions according to its UV (214 nm) absorbance. Peak fractions were evaporated to dryness as described above, and the residue was suspended in 500 µl of purified (Milli-Q) water, pasteurized (10 min., 80°C), and assayed for antibacterial activity following the AWD technique. The active fraction has been analyzed by mass spectrum which was carried out on a 4700 proteomic Analyzer (Applied Biosystems) for determination of molecular mass of the main constituents.

### **3. RESULTS**

#### ***3.1 Detection, and biochemical characterization of the bacteriocin-producers and bactericidal activity***

The prevalence of lactic acid bacteria were determined at of 10<sup>9</sup> CFU/g in traditionally fermented cereal and milk products, and 10<sup>3</sup> CFU/g in seafood. Two hundred twenty lactic acid bacteria strains from these different food products have been randomly selected, purified, and assayed for bacteriocin-like inhibitory substances production. Twenty of these strains displayed antibacterial activity in the NCFS. Twelve of the 20 strains confirmed their activity when the NCFS was treated with catalase (65 UI/ml). The activity of NCFS of the 12 strains was either completely or partially inactivated by proteolytic enzymes (Figure 1), but was persistent after heat treatment particularly at acid and neutralized pH (Figures 2A and 2B), indicating of presence of bacteriocin-like inhibitory substances (bac<sup>+</sup>) in these solutions.

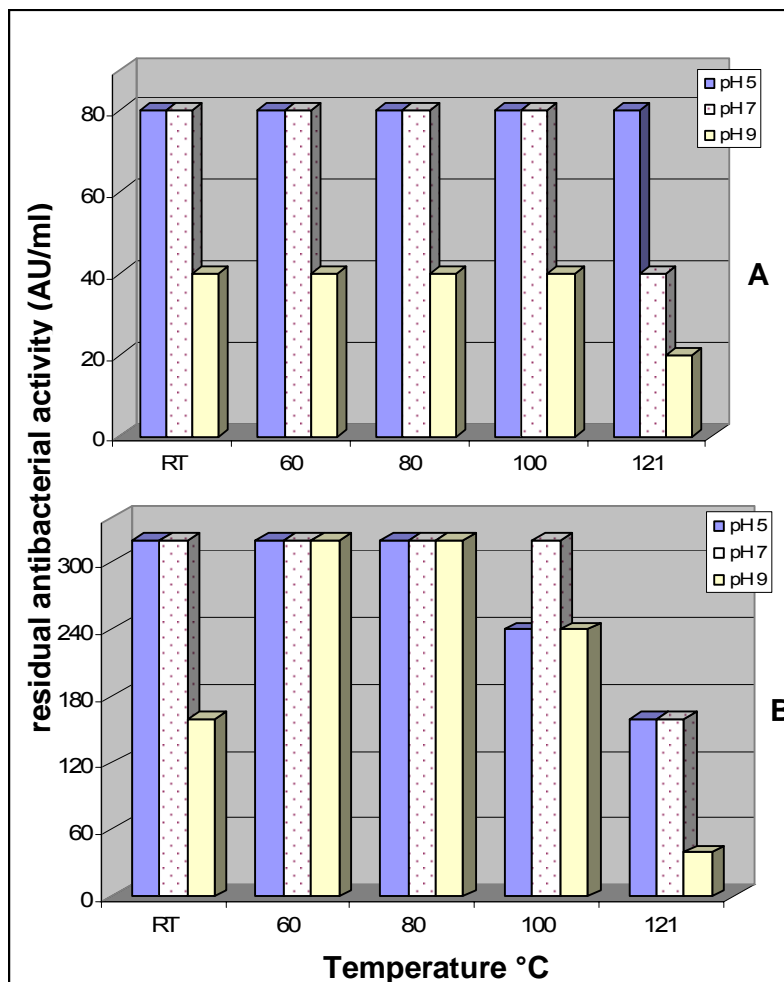
**Figure 1:** Effects of catalase and proteolytic enzymes on the antimicrobial activity of *CWBI-B1410* neutralized culture supernatant against *P. pentosaseus*



1: not treated, 2: catalase, 3: P3910, 4: &-chymotrypsin, 5: P XIV protease, 6: P XVIII protease, 7: pepsin, 8: proteinase K.

Similar results were obtained for culture supernatants of *CWBI-B1426*, *CWBI-B1427*, and *CWBI-B1411* strains.

**Figure 2:** Effect of heating at 60 to 121°C for 10 min. on the stability of the inhibitor in *CWBI-B1410* (A) and *CWBI-B1411* (B) neutralized culture supernatants at pH 5, 7 and 9.



RT (Room temperature)

The residual activity was determined by critical dilution method in using *P. pentosaseus* and *Listeria monocytogenes* as indicator strains for *CWBI-B1410* and *CWBI-B1411* strains, respectively.

The heat sensitivities of *CWBI-B1426* and *CWBI-B1427* culture supernatants were similar to that of *CWBI-B1410*.

The twelve bac<sup>+</sup> strains were catalase negative, and Gram positive cocci (data not shown). Their profiles of carbohydrates fermentations (API 50 CH system) showed high similarity, and identifications made by the API database correlation indicated the isolates were *Lactococcus lactis subsp. lactis* for the twelve strains with percentage of identity of 95.7, 94, 93, and 91.6% as shown in table 3. Therefore, two strains named CWBI-B1410 and CWBI-B1426 were randomly selected of the 7 and the 3 strains respectively isolated from the fermented cereal and the seafood samples, and were added to the two other strains named CWBI-B1427 and CWBI-B1411 isolated from two different samples of fermented milk products, for further investigations, as indicated in table 2.

**Table 2:** Repartition and API 50 CH characterization of the bacteriocin-like substances producing strains screened of Senegalese local foods lactic acid bacteria

Nature of foods	Samples numbers	Prevalence of LAB (cfu/g)	LAB RSBA	NCSI LAB	Bac <sup>+</sup> LAB	API 50 CHL Identification	FSY Bac <sup>+</sup> LAB	Selected Bac <sup>+</sup> LAB
Seafood	16	10 <sup>3</sup>	60	5	3	<i>Lactococcus lactis</i> (93 %)	1	CWBI-B1426
Millet flour	8	10 <sup>9</sup>	63	10	7	<i>Lactococcus lactis</i> (95 %)	1	CWBI-B1410
Dairy	8	10 <sup>9</sup>	97	5	2	<i>Lactococcus lactis</i> (94 %)	2	CWBI-B1427
						<i>Lactococcus lactis</i> (91%)		CWBI-B1411
<b>Total</b>	32		220	20	12	<i>Lactococcus lactis</i> strains	4	4

LAB-RSBA: lactic acid bacteria randomly selected from food samples for bacteriocin-like inhibitory assays

NCSI-LAB: lactic acid bacteria strains that displayed antibacterial activity by neutralized culture supernatant

Bac<sup>+</sup> LAB: lactic acid bacteria strains that showed bacteriocin-like inhibitory activity

FSY Bac<sup>+</sup> LAB: number of Food samples that yielded bac<sup>+</sup> isolates.

The sensitivity of 35 bacterial strains from different genera to antibacterial activity of NCFS from cultures of the four strains is presented in table 3. NCFS of CWBI-B1410, CWBI-B1427, and CWBI-B1426 strains have similar spectra of inhibition, which are broader than that of CWBI-B1411 strain NCFS. All NCFS showed bactericidal activity against *B. coagulans* involved in food spoilage (Garcia *et al.* 2003) and against the food borne pathogen *L. monocytogenes*, whereas only those of CWBI-B1410, CWBI-B1426, and CWBI-B1427 NCFS displayed bactericidal activity against *B. cereus*.

Activity of the NCFS and crude concentrated bacteriocin preparations of the four strains were determined by using a set of 10 indicator strains including the new screened strains (table 4). Certain indicator strains such as *B. coagulans* showed high sensitivity (from  $10^4$  to  $10^5$  AU/ml) to the antibacterial solutions contrarily to *L. curvatus* and *B. cereus* strains. The level of sensitivity of *P. pentosaseus* and *B. fusiformis* strains to CWBI-B1410, CWBI-B1426, and CWBI-B1427 antimicrobial solutions is between those of these two groups. *L. monocytogenes* is more sensitive to CWBI-B1411 antimicrobial solutions than to those of the three other isolates.

**Table 3:** Inhibitory spectrum of neutralized supernatants from CWBI-B1410, CWBI-B1411, CWBI-B1426 and CWBI-B1427 cultures

N°	Indicator bacteria*	Neutralized culture supernatants			
		A10	A11	A26	A27
1.	<i>A10</i>	-	+	-	-
2.	<i>A11</i>	+	-	±	±
3.	<i>A26</i>	+	+	-	-
4.	<i>A27</i>	-	+	-	-
5.	<i>Bacillus cereus</i> BS12	+	+	+	+
6.	<i>Bacillus coagulans</i> LMG 6326	+	+	+	+
7.	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	±	+
8.	<i>Bacillus subtilis</i> 5499 GR1	-	-	-	-
9.	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-
10.	<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-
11.	<i>Enterococcus faecium</i>	±	+	±	+
12.	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-	-	-	-
13.	<i>Erwinia uedovora</i>	-	-	-	-
14.	<i>Lactobacillus brevis</i> 7761	+	-	+	+
15.	<i>Lactobacillus curvatus</i> CWBI B28	+	+	+	+
16.	<i>Lactobacillus curvatus</i> LMG21688	+	+	+	+
17.	<i>Lactobacillus doderlein</i> THT	+	-	+	+
18.	<i>Lactobacillus fermentum</i> MU1	+	-	+	+
19.	<i>Lactobacillus helveticus</i> LMG 6413T	+	-	+	+
20.	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> LMG 9192	-	-	-	-
21.	<i>Lactobacillus plantarum</i> π	+	-	+	+
22.	<i>Lactobacillus plantarum</i> gobetti	+	+	+	+
23.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	-	+	+
24.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> mbanick Senegal	+	-	+	+
25.	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LMG6890	+	+	+	+
26.	<i>Leuconostoc ezal</i> 2	-	-	-	-
27.	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	+
28.	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	+	-	-
29.	<i>Pediococcus pentosaseus</i>	+	-	+	+
30.	<i>Salmonella infantis</i>	-	-	-	-
31.	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-
32.	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
33.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-
34.	<i>Staphylococcus carnosus</i>	+	-	+	+
35.	<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	+	+	+

\* All indicators were tested for inhibition of growth that was determined by an area of inhibition surrounding each well cut in an agar medium inoculated with 110 µl of the culture of the indicators. 60 µl of filter sterilized neutralized (pH 6.5) cell-free supernatant were inoculated into each well. A zone of growth inhibition ≥ 8mm was expressed as positive reaction (+), lack of inhibition as negative inhibition (-); and a weak area of inhibition < 8 mm (±).

A: CWBI-B14

**Table 4:** Antibacterial activity of neutralized culture supernatants and crud concentrated bacteriocin-like inhibitory preparations of CWBI-B1410, CWBI-B1411, CWBI-B1426, and CWBI-B1427 strains

Indicators strains	Bacteriocin-like inhibitory Activity (x 10 <sup>2</sup> AU/ml)							
	A26		A10		A27		A11	
	CFS	CCB	CFS	CCB	CFS	CCB	CFS	CCB
1. <i>Bacillus cereus</i>	0.20	0.40	<b>0.4</b>	<b>0.8</b>	0.20	0.40	-	-
2. <i>Bacillus coagulans</i> LMG 6326	51.2	4010	<b>102</b>	<b>4010</b>	25.6	102	51.2	4010
3. <i>Bacillus fusiformis</i>	3.20	12.80	<b>6.4</b>	<b>25.6</b>	6.4	12.80	-	-
4. CWBI-B1410	-	-	-	-	-	-	0.8	3.2
5. CWBI-B1411	0.2	0.8	<b>1.6</b>	<b>6.4</b>	0.2	0.8	-	-
6. CWBI-B1426	-	-	<b>0.8</b>	<b>3.2</b>	-	-	0.8	3.2
7. CWBI-B1427	-	-	-	-	-	-	0.8	3.2
8. <i>Lactobacillus curvatus</i>	0.80	1.6	<b>3.2</b>	<b>6.4</b>	0.2	1.6	0.2	1.6
9. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 6890	0.2	0.8	<b>1.6</b>	<b>6.4</b>	0.2	0.8	0.8	3.2
10. <i>Listeria monocytogenes</i>	0.80	1.60	<b>1.60</b>	<b>3.20</b>	0.80	1.60	6.40	51.20
11. <i>Pediococcus pentosaseus</i>	3.20	12.8	<b>6.4</b>	<b>25.6</b>	0.8	6.4	-	-

A: CWBI-B14; CCB: crude concentrated bacteriocin-like substances solutions, CFS: cell-free supernatant, -: no inhibition

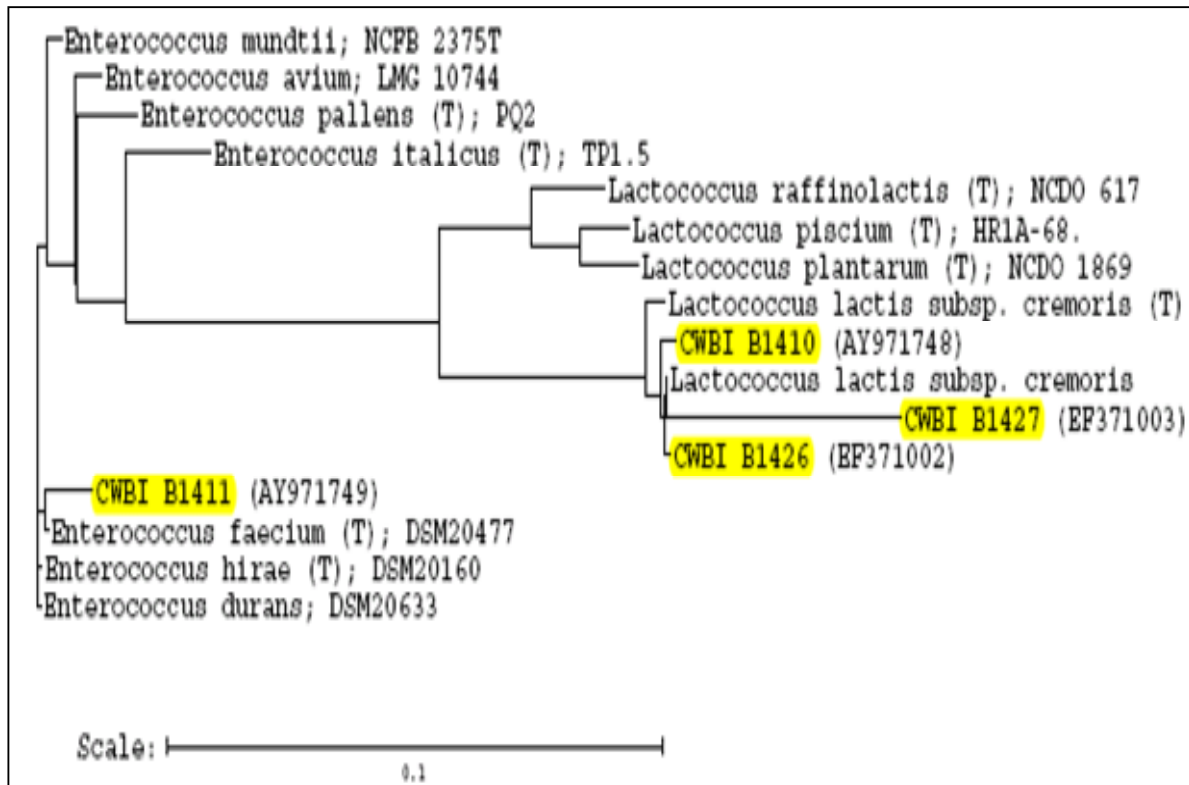
CCB were prepared from the culture supernatant by precipitation with solid (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at final concentration of 246 g/liter. The precipitate collected by centrifugation was suspended in 200 ml of purified (Milli-Q) water.

### 3.2 Genetic characterization of the strains and the bacteriocins

Identifications by 16Sr DNA sequence confirmed biochemical identification (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains) of CWBI-B1410, CWBI-B1426 and CWBI-B1427 strains, whereas CWBI-B1411 16Sr DNA sequence matched best with those of *Enterococcus faecium* strains (Figure 3). The closest matches for CWBI-B1411 strain and *Enterococcus faecium* were different from the identification determined by API method (table 2). However, we prioritized the genetic identification because of the high percentage of similarity (99%) obtained with this technique, against 91% by API 50 CH. The low percentage of identity obtained with this later can be due to the inadequacy of API 50 CH for accurate unequivocal identification of *Enterococcus* strains. The 16S rDNA of the four bacteriocin-producing strains have been registered to Genbank databases under the accession numbers AY971748 (CWBI-B1410), AY971749 (CWBI-B1411), EF371002 (CWBI-B1426), and EF371003 (CWBI-B1427).



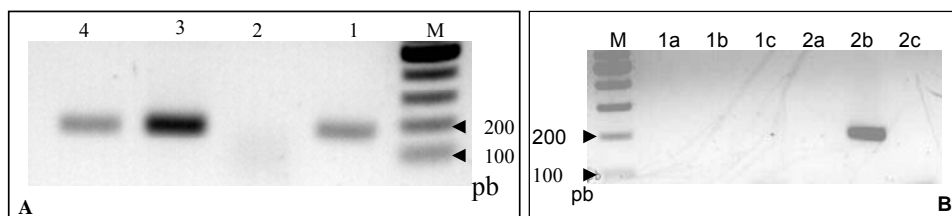
**Figure 3:** Dendogramme based on similarities of 16S rDNA sequences of the bac<sup>+</sup> isolates with those of type strains from Genbank database



Genbank accession numbers of the new bacteriocin-producing isolates are indicated in the brackets.

The results of bacteriocin genes screening from bac<sup>+</sup> isolates DNA are presented in figure 4. Structural gene encoding Nisin A prepeptide (Gross and Morell 1971) was screened of CWBI-B1410 DNA, against structural gene encoding nisin Z prepeptide (Mulders *et al.* 1991) of CWBI-B1426 and CWBI-B1427 DNA, and structural gene encoding enterocin B prepeptide (Causas *et al.* 1997) of CWBI-B1411 DNA.

**Figure 4:** Agarose gel electrophoresis of PCR products generated from total DNA of bacteriocin-producing strains.



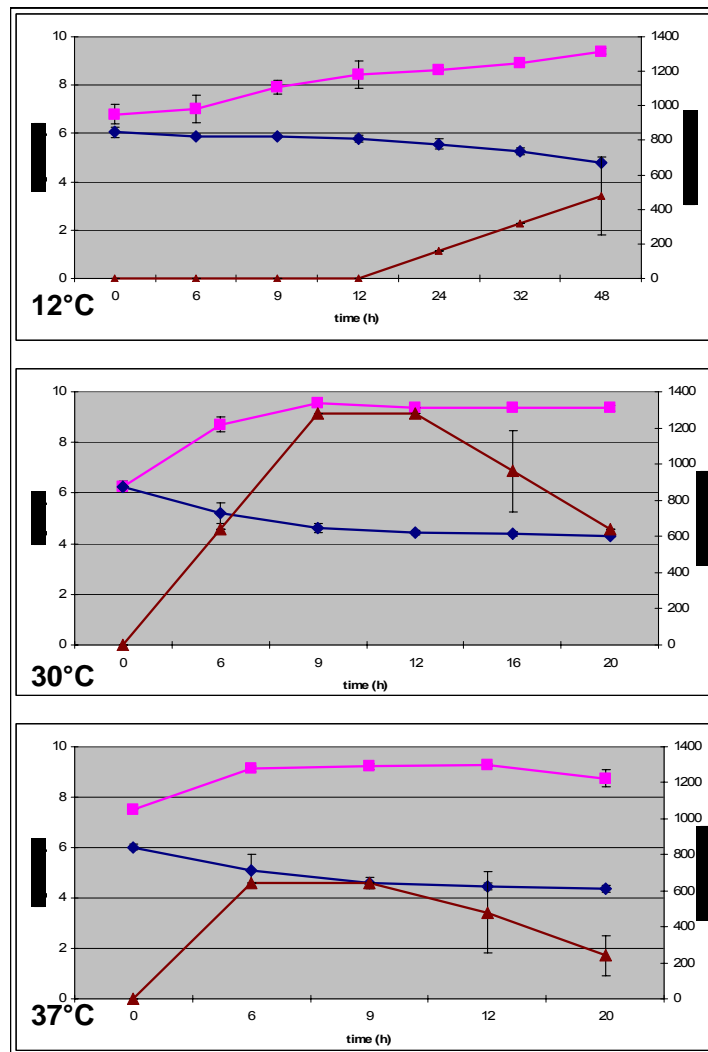
*A* (use of *nisinF/nisinR* primers pair): 1: CWBI-B1410; 2: CWBI-B1411; 3: CWBI-B1426; 4: CWBI-B1427  
*B* [use of (a: *enterocin AF/enterocin AR*; b: *enterocin BF/enterocin BR*; c: *enterocin L50AF/enterocin L50AR*) primers pairs]: 1: CWBI-B1410; 2: CWBI-B1411.  
*M*: marker (smart Ladder 100 pb)

The nucleotide sequences of these genes and their resulting prepeptide amino acid sequences have been registered to Genbank database under the accession numbers (EF371000, and ABN45880), (EU128491, and ABV64388), (EU 128485, and ABV64387), and (EF371004, and ABN45881) for CWBI-B1410, CWBI-B1426, CWBI-B1427, and CWBI-B1411 strains, respectively. Because of its high antibacterial activity by culture supernatant, CWBI-B1410 strain was selected for more characterization of its bacteriocin-like inhibitory substance as well as its *in vitro* production.

### **3.3 Similarities of the bacteriocin-like inhibitory substance of *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 with nisin**

The structural gene for nisin is needed to encode for the requisite transcription products (mRNA) for nisin synthesis. Fig. 5 shows the relationships between *Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410 growth and its bacteriocin-like inhibitory substance activity on MRS broth at 12, 30, and 37°C. As can be seen from this figure, the production of the bacteriocin-like inhibitory substance started at the exponential phase and reached its highest point during the stationary phase. The bacteriocin-like inhibitory activity remained constant for up to 9 h, and decreased as CWBI-B1410 strain entered late stationary phase (12-13 h). The production of antibacterial agent is more important at 30°C.

**Figure 5:** Influence of *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 to growth, to decrease pH, and to produce bacteriocin on MRS broth at 12, 30, and 37°C.



*Bacterial counts on MRS (■); Culture pH (◆); Bacteriocin-like inhibitory activity in the culture supernatant (▲)*  
*The bacteriocin-like inhibitory activity was assessed by critical dilution method in using *P. pentosaseus* as indicator strain.*

A screening of nisin gene from mRNA isolated of CWBI-B1410 was undertaken. cDNA was first synthesized by RT-PCR of the total RNA isolated of CWBI-B1410 culture at end exponential phase (culture of 10 h at 30°C on MRS broth), and used as template with the primers pairs nisin F/nisin R described in table 1 for PCR reactions. A DNA fragment similar to the nisin structural gene screened of CWBI-B1410 total DNA (Genbank number EF371000) was detected in the PCR products, whereas any PCR products were observed by using directly CWBI-B1410 total RNA as well as cDNA synthesized of RNA isolated from CWBI-B1411 culture (negative control), as templates. In contrast 16S rDNA PCR products

were detected for both strains (CWBI-B1410 and CWBI-B1411) by using the universal SPO/SP6 primers pair and their respective cDNA as templates (data not presented). These results indicate that the nisin structural gene screened in CWBI-B1410 strain was transcribed to mRNA as required for biosynthesis of nisin-like inhibitory substance, during the growth of this strain.

Similarities of inhibitory effects against different indicator strains, protease profile sensitivity, and heat stability as well as retention time on C<sub>18</sub> column of CWBI-B1410 bacteriocin-like bioactive agent with nisin were investigated. As shown in table 5, all the indicator strains sensitive to CWBI-B1410 bacteriocin-like inhibitory substance are also sensitive to inhibitory activity of nisin except *Staphylococcus epidermis*. *Lactococcus lactis CWBI-B1410* was inhibited by nisin but resistant to its own bacteriocin-like substance because of immunity principle of bacteriocin producers (De Jong *et al.* 2006). The two bioactive agents showed identical profile of protease sensitivity, and retention time on C<sub>18</sub> column (31.5 min.) as well as similar heat stability (figure 6 and table 5).

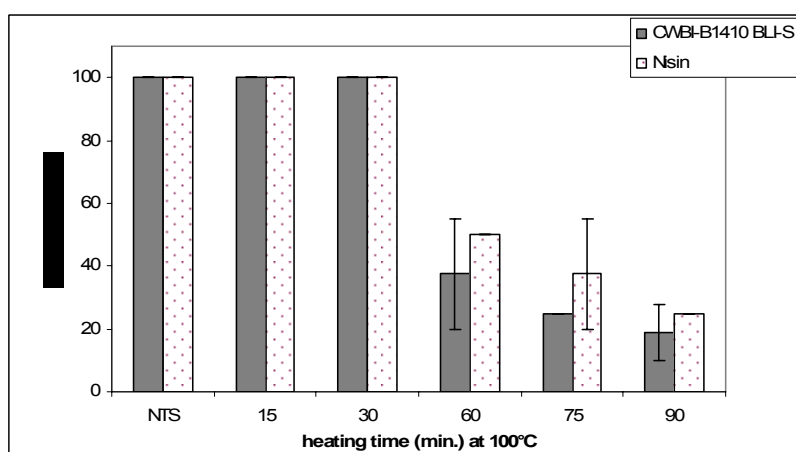
**Table 5:** Comparison of the inhibitory effects, sensitivity to proteolytic enzymes and retention time on C<sub>18</sub> column of nisin and CWBI-B1410 bacteriocin-like inhibitory substance

indicator strains	nisin					CWBI-B1410 BLIS						
	NTS	1	2	3	4	5	NTS	1	2	3	4	5
<i>B. coagulans</i> LMG 6326	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Enterococcus faecium</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<b><i>Lc lactis</i> CWBI 1410</b>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>WDA</b> <i>Lc lactis</i> LMG6890	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Pediococcus pentosaseus</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>S. epidermis</i> CWBI-B1433	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Weissella confusa</i> CWBI-B1438	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<b>C<sub>18</sub> RP-HPLC time retention</b>	31.5 min.					31.5 min.						

*CWBI-B1410* bacteriocin solution was prepared from the culture supernatant and has an activity similar to that of the commercial nisin solution, estimated at 1280 AU/ml by well diffusion assay (WDA) in using *P. pentosaseus* as indicator. All indicator strains (except *CWBI-B1410* itself) were previously found to be sensitive to *CWBI-B1410* neutralized culture supernatant activity as shown in table 3.

NTS: not treated samples; enzymatic treatments: (1: protease P XIV; 2: Protease P XVIII; 3: &-chymotrypsin; 4: trypsin; 5: proteinase-K).

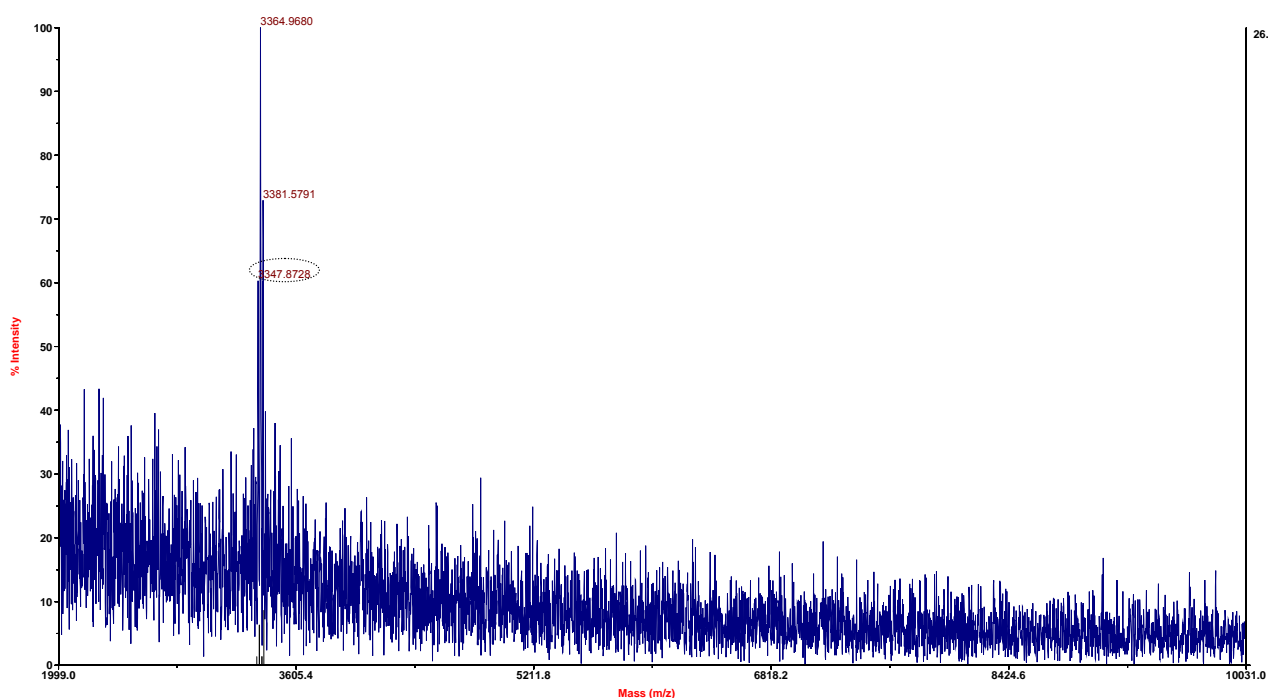
**Figure 6:** Comparison of heat stability of nisin and CWBI-B1410 bacteriocin-like inhibitory substance.



The residual antibacterial activity determined by critical dilution method in using *P. Pentosaseus* as indicator strain, was expressed in percentage of the activity of the non heated sample (NTS) considered as 100%.

Only trypsin has not an ability to inactivate the two bioactive agents which were not affected by heat treatment for 30 min. at 100°C. The analysis of the mass spectrum of the active fraction isolated of CWBI-B1410 crude antibacterial solution, by RP-HPLC separation, revealed the presence of three major compounds with molecular mass of 3364.96, 3381.58 and 3347.87 Da (Fig. 7).

**Figure 7:** Mass spectrum of the positive fraction isolated of crude CWBI-B1410 bacteriocin-like inhibitory solution by RP-HPLC separation on C<sub>18</sub> column.



Compound having a molecular mass identical to nisin formula ( $C_{143}H_{228}N_{42}O_{37}S_7$ ) weight (Handary Bio-engineering BV, Oosterhout, Netherlands) among the three substances detected is encircled.

#### 4. DISCUSSION

The aim of the current investigation was to isolate and identify bacteriocin-producing LAB from foods that could be used locally for improving food preservation (biopreservation) and biosafety in Senegal.

Seven isolates from fermented millet flour (the main cereal products in Sub-Saharan Africa) sample, 3 isolates from raw sumpat grunt fish fillet, and two isolates from two different fermented milk samples, representing 5.45% of the tested strains, produced antibacterial compounds which were resistant to catalase and heat, inactivated by proteolytic enzymes, indicating them to be bacteriocin-like substances according to Tagg *et al.* (1976) and Jack *et al.* (1995). Our detection rate was higher to those reported by Ennahar *et al.* (1996) and Lasagno *et al.* (2002) in similar studies. Four of the 32 tested food samples yielded lactic acid bacteria strains producing BLIS (12.5% incidence rate). Graver and Muriana (1993) obtained similar incidence rate in the isolation of bac+ LAB strains from foods by direct plating.

Because the seven bac+ isolates from fermented millet flour sample as the three isolates from raw sumpat grunt sample showed in each case many similarities [morphology, spectrum of inhibition against a set of ten indicator strains, identical profiles of carbohydrate fermentation (API 50CH)], they could be considered in the two cases being the same strain. Based on their food sources, four bac+ strains from 4 different food samples have been examined in depth. CWBI-B1410; CWBI-B1426, and CWBI-B1427 strains isolated respectively from fermented millet flour, sumpat grunt fish, and fermented milk were identified as *Lc lactis subsp. lactis* strains and the remaining strain, CWBI-B1411, isolated from fermented milk, as an *Ec faecium*, by 16S rDNA sequence. As nisin encoding genes and Enterocin B encoding gene were respectively screened of the three lactococcal strains and the *Ec faecium*, their bacteriocin-like substances could preliminary regarded as compounds

belonging to respectively the first groups and the second groups, as proposed by Klaenhammer (1993).

*Ec faecium* CWBI-B1411 showed a narrow spectrum of inhibition in comparison to those of the lactococcal strains. Moreover, enterococci are a frequent cause of a variety of infections in humans (Jett et al. 1994). Therefore CWBI-B1411 strain was discarded for use as food biopreservative. The spectra of inhibition of the three bac<sup>+</sup> lactococcal strains (CWBI-B1410, CWBI-B26 and CWBI-B27) include different food spoilage and pathogenic bacteria such as *B. coagulans*, *L. monocytogenes*, and *B. cereus*. The antibacterial activity of crude bactericidal preparations of the new isolates against *B. coagulans* is similar to those reported for *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*, by Flynn et al. (2002). The high prevalence of bacteriocin-producing *Lc lactis subsp. lactis* strains and their detection in different food products indicates a high potential by these strains to grow and dominate the microbial population in the ecological environments of the foods. This predominance could be explained in part by the conditions of local food products processing and storage. Raw food materials are processed (natural fermentation) and stored at ambient temperatures around 30-35°C that are similar to optimal growth and bacteriocin production temperatures of these strains, as demonstrated for the main screened strain (*Lc lactis* CWBI-B1410). Nisin gene expression was carried out from CWBI-B1410 culture. CWBI-B1410 crude bactericidal solution also showed many similarities with classic nisin solution (identical inhibitory activity, profile of sensitivity to proteolytic enzymes, heat sensitivity as well as time retention on C<sub>18</sub> column). Moreover three main compounds with molecular mass below 3400 Da have been screened in the active fraction isolated by RF-HPLC separation of CWBI-B1410 crude bacteriocin-like inhibitory solution. One of these compounds showed a molecular mass of 3347.87 Da similar to nisin formula (C<sub>143</sub>H<sub>228</sub>N<sub>42</sub>O<sub>37</sub>S<sub>7</sub>) weight (Handary Bio-engineering BV, Oosterhout, Netherlands) as well as nisin molecular mass (3346.39 Da) described by

Megrhous *et al.* (1997). These data suggest that CWBI-B1410 strain is a nisin-like inhibitory substance producer.

Nisin producing *Lc lactis* strains are generally considered as GRAS (generally recognized as safe) and used as starters or protective culture in a diversity of foods products like milk and cheese (Hirsch *et al.* 1951), lightly preserved fish products (Wessels and Huss, 1996), and vegetable products (Cai *et al.* 1997). The ability of CWBI-B1410 to inhibit wide range of food spoilage and pathogenic bacteria is special interest for food safety, especially in Senegalese environment with perennial problems of poor food hygiene. The use of such strain as biopreservative could be suitable mean of enhancing the quality and safety of the local food products.

## **5. CONCLUSION**

Senegalese local food products provide an appropriate ecological habitat for harboring wild bacteriocin producing lactic acid bacteria. A high prevalence of bac<sup>+</sup> producing *Lactococcus lactis* strains was observed, indicating a high potential of growth of these strains in the ecological environments of the local foods. The nisin encoding gene and its expression were screened from culture of the main screened *Lactococcus lactis* strain named CWBI-B1410. These data suggest that *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 strain is a nisin-like inhibitory substance producer. *Lactococcus lactis subsp lactis* CWBI-B1410 has been selected for application to improve fish preservation in Senegal.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Belgian University Development Centre (CUD) who financially supported this research which was realized in both, Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI)/Agricultural University of Gembloux/Belgium, and Ecole Supérieure Polytechnique/Cheikh A. DIOP University/ Dakar/ Senegal.



## 6. REFERENCES

1. Abee T, Kröckel L, Hill C (1995). Bacteriocin, mode of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 169-185.
2. Arihara K, Cassen RG, Luchansky JB (1993). Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. of Food Microbiol.* 19: 123-134.
3. Barefoot SF, Klaenhammer TR (1983). Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (6): 1808-1815.
4. Buck JD (1982). Non-staining (KOH) methods for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (4):992-993.
5. Cai Y, Ng L-K, Farber JM (1997). Isolation and characterization of nizin-producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* from bean sprouts. *J. Appl. Microbiol.* 83: 499-507.
6. Causas P, Nilsen T, Cintas LM, NES IF, Hernandez PE, Holo H (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 with can act synergistically with Enterocin A. *Microbiol.* 143: 2287-2294.
7. Coventry MJ, Gordon JB, Wilcock A, Harmark K, Davidson BE, Hickey MW, Hillier AJ, Wan J (1997). Detection of bacteriocin of LAB isolated from food and comparison with pediocin and nisin. *J. Appl. Microbiol.* 83: 248-258.
8. Corsetti, A, Gobetti M, Rossi J, Damiani P (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus Sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 253-256.
9. Davidson CM, Cronin F (1973). Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Appl. Microbiol.* 26:339-440.

10. De Jong A, Van Hijum SAFT, Bijlsma JJE, Kok J, Kuipers PO (2006). Bagel: a web-based bacteriocin genome mining tool, *Nucleic Acid Research* 34: web server issue, W273 – W 279
11. Einarsson H, Lauzon HL (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 669-676.
12. Ennahar S, Aoude-Werner D, Sorokine O, van Dorsselaer A, Bringel F, Hubert J C, Hasselmann C. (1996). Production of pediocin Ach by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4381-4387.
13. Flynn S, Sinderen DVG, Thornton M, Holo H, Nes IF, Collins JK (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* UCC118. *Microbiology.* 148: 973-984.
14. Foulquié M, Callewaert R, Devreese B, Van Beeumen J, De Vuyst L (2003). Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl Microbiol.* 94 (2):214-229.
15. García MT, Ben Omar N, Lucas R, Pérez-Pulido R, Castro A, Grande MJ, Martínez-Cañamero M, Gálvez A (2003). Antimicrobial activity of Enterocin EJ.97 on *B. coagulans* CECT12. *Food Microbiol.* 20: 533-536.
16. Garver KI, Muriana PM (1993). Detection, Identification and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from retail food products. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 241-258.
17. Gross E, Morell JL (1971). The structure of Nisin. *J. Am. Chem. Soc.* 93:4634-4635.
18. Hirsch A, Grinsted E, Chapman HR, Mattick ATR (1951). A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type Cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dairy Res.* 18: 205-206.

19. Jack RW, Tagg JR, Ray B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Rev.* 59: 171-200.
20. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS (1994). Virulence of enterococci. *Clin. Microbial. Rev.* 7: 462-478.
21. Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbial. Rev.* 12: 39-86.
22. Lasagno M, Beoletto V, Sesma F, Raya R, Font De Valdez G, Eraso A (2002). Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *Microbiologia* 25:37-44.
23. Meghrouts J, Lacroix C, Bouksaïm M, Lapointe G, Simard RE (1997). Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* UL 719. *J. Appl. Microbiol.* 83: 133-138.
24. Mulders JWM, Boerrigter IJ, Rollema HS, De Vos W M (1991). Identification and Characterization of the Lantibiotic Nisin Z, a natural variant. *Eur. J. Biochem.* 201:581-584.
25. Park S, Itoh K, Fujisawa T (2003). Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804<sup>T</sup>. *J. Appl. Microbiol.* 95 (2): 294-300.
26. Rodríguez E, Gonzáles B, Gaya P, Nuñez M, Medina M (2000). Diversity of bacteriocins produced by Lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 10: 7-15.
27. Ryan MP, Rea MC, Hill C, Ross RP (1996). An application in Cheddar Cheese Manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a Novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (2): 612-619.
28. Sulzer G, Busse M (1991). Growth inhibition of *Listeria ssp.* on camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *Int. J. Food Microbiol.* 14: 287-296.

29. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1975). Bacteriocin of a group B Streptococcus: partial purification and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:764-772.
30. Ventura M, Elli M, Reniero R, Zink R (2001). Molecular microbial analysis of Bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:113-121.
31. Wessels S, Huss HH (1996). Suitability of *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiol.* 13: 323-332.

## **PREAMBULE A LA PARTIE MISE EN ŒUVRE DES SOUCHES SELECTIONNEES (CWBI-B1410 ET CWBI-B28) SUR POISSONS**

Trois espèces de poissons (*Podamasys jubelini*, *Polydactylis quadrifilis* et *Arius heudeloti*) ont été utilisées pour les essais d'activité inhibitrice des souches lactiques et de leur combinaison avec le chlorure de sodium comme barrière pour contrôler l'évolution de la flore bactérienne contaminante. Ces poissons font partie des espèces les plus importantes (en terme de volume ou valeur commerciale) dans les débarquements de pêche artisanale au Sénégal (voir figure 7, chapitre 1). De plus ils diffèrent entre autres facteurs par leur teneur en lipides estimée à 2,8% pour (*P. jubelini*), 3.2% pour *P. quadrifilis* et 17,7 % pour *A. heudeloti*. Ce facteur a été pris en compte du fait de son importance dans les processus de salage.

Par ailleurs, deux stratégies de mise en œuvre des souches ont été testées : l'utilisation de cultures vivantes de la souche *Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410 comme starter ( $10^7$  UFC/g) pour améliorer le contrôle de la flore entérique endogène au cours de la fermentation du poisson au Sénégal (30°C), et l'utilisation de surnageants de culture neutralisés en combinaison avec du sel (NaCl) comme agent antimicrobien sur les poissons.

La première stratégie fait l'objet du **chapitre 5**. Les essais ont été réalisés sur *Podamasys jubelini*, *Polydactylis quadrifilis* qui subissent ce type de transformation contrairement à *Arius heudeloti* qui est plutôt salé et fumé. Pour favoriser la production *in situ* d'acides organiques et de bactériocines, les poissons ont été supplémentés de glucose (1%). La teneur en glucide des poissons étant généralement faible (< 0,5%). Par ailleurs, le salage a été réalisé à la fin de fermentation, la souche CWBI-B1410 ne pouvant pas croître sur milieu de teneur en NaCl > 2%. Le niveau de la contamination bactérienne par les entérobactéries dans les poissons ainsi traités, a été comparé à celui des poissons fermentés naturellement (sans traitement préalable) comme dans le cas de la fermentation traditionnelle du poisson.

La deuxième stratégie de mise en oeuvre des souches sur les trois poissons fait l'objet de deux chapitres : **chapitre 6** et **chapitre 7**.

Le chapitre 6 présente les résultats des tests d'activités antibactériennes d'eau salée (NaCl de 0,05 à 0,14 g/ml) et de solutions à base de SCN de souches bactériennes lactiques bac<sup>+</sup> et bac<sup>-</sup> salés (NaCl 0,14 g/ml) sur les différents poissons conservés à 10°C. L'évolution de la flore totale des filets traités avec du SCN de CWBI-B1410 salé, a été comparée à celle de filets traités avec du SCN de LMG6890 (bac<sup>-</sup>) salé, utilisé comme contrôle. Un niveau de flore mésophile totale (température optimale de croissance de 30°C) de 10<sup>6</sup> UFC/g a été considéré comme la limite d'acceptabilité (fin de la conservation).

De plus, l'effet antibactérien de ces solutions sur les différents poissons a été comparée à celui d'eau salée (NaCl, 0,14 g/ml) additionnée de benzoate de sodium et de sorbate potassium chacun à une concentration de 0,5 mg/ml (m/v), similaires aux niveaux de concentrations autorisées dans les semi-conserves de poissons.

Le chapitre 7 présente les résultats des estimations des différents groupes bactériens dans les filets de poissons crus de production artisanale au Sénégal, en utilisant différents milieux de culture sélectifs. Les poissons ont été ensuite traités comme décrit précédemment en utilisant des surnageants de cultures neutralisés des deux souches productrices de bactériocines CWBI-B28 et CWBI-B1410, salés (NaCl 0,14 g/ml) afin d'évaluer leurs effets antibactériens contre la flore de contamination (la flore totale, la flore entérique et la flore lactique), au cours de la conservation à 10°C. Les filets traités avec des SCN non bactéricides issus de *Lactococcus lactis* LMG6890 et *Lactobacillus curvatus* LMG21688 non productrice de bactériocines, salés (NaCl 0,14 g/ml) ont été utilisés comme contrôles (évolution de la flore totale).

**CHAPITRE 5: ANTIBACTERIAL EFFECTS BY LACTOCOCCUS LACTIS CWBI-B1410 STRAIN  
WITH GLUCOSE SUPPLEMENTATION TO CONTROL ENTERIC SPOILAGE BACTERIA GROWTH ON  
TWO FISHES INCUBATED AT 30°C FOR FERMENTATION IN SENEGAL**

**Michel Bakar DIOP<sup>1,2</sup>, Robin DUBOIS-DAUPHIN<sup>1</sup>, Jacqueline DESTAIN<sup>1</sup>, Emmanuel  
TINE<sup>2</sup>, Philippe THONART<sup>1</sup>**

Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI)/ Gembloux Agricultural University  
(FUSAGx), 2, Passage des Déportés, B 5030 Gembloux, Belgium,

Laboratoire de Microbiologie et Génie industrielle, Université Cheikh Anta DIOP, Ecole  
Supérieure Polytechnique, BP 5085 Dakar, Sénégal

**(Submitted to Journal des Sciences Pour l'Ingénieur)**

## Abstract

Samples of sumpat grunt (*Pomadasys jubelini*) and giant African threadfin (*Polydactylus quadrifilis*) fishes were purchased from a local market, filleted, supplemented with glucose (1%), and inoculated with  $10^7$  CFU/g CWBI-B1410 living culture before to be incubated for 23 h at 30°C for fermentation in Senegal. Bacterial contaminations assessed by counts on selective media [Hektoen (Enterobacteriaceae strains) and Rose Gal Bcig (*Escherichia coli* strains)] and pH of these fillets were monitored at regular intervals, and compared to those of fillets processed traditionally (not treatment) as well as fillets inoculated with CWBI-B1410 without glucose supplementation. Hektoen and Rose Gal Bcig bacterial counts were estimated at  $10^4$  and  $10^{1-2}$  CFU/g in raw fillets. They reached  $10^{9-10}$  and  $10^{3-4}$  CFU/g, respectively, in both traditionally processed fillets and those inoculated with CWBI-B1410 without glucose supplementation. Predominance of enteric strains like *Proteus sp* was noted. Depression of pH (4.5) and bacteriocin-like inhibitory activity by CWBI-B1410 were observed in glucose supplemented fillets, resulting in a reduction of the enteric strains bacterial spoilage of 4 log CFU/g on *P. jubelini* and 2 log CFU/g on *P. quadrifili*. This new fish fermentation strategy combined with salt addition can be suitable technologies of lowering spoilage of fermented fish products in Senegal.



## 1. INTRODUCTION

Spontaneous fermentation, e. g. without addition of selected bacteria is a widespread strategy of food (flour, milk, fish, etc.) preservation in Sub-Saharan Africa. In Senegal this strategy is used for production of “Guedj” a naturally fermented, salted and sun dried fish product. For that, the raw fish materials [generally the remaining (not sold) fish samples in the local markets) are incubated for 24 h at ambient temperatures for fermentation before to be salted and dried under sun for 2 to five days for extending their storage time [Groupe de Recherche et d’Echanges Technologiques (GRET) and Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA) 1993]. These fish commodities are very popular in Western Africa particularly for their flavors. They are produced with different fishes as sumpat grunt (*Pomadasys jubelini*) and giant African threadfin (*Polydactylus quadrifilis*) fishes which are among the five main widespread fish products in artisanal fishery landings. Artisanal fishery accounts for more than 85% of the total landings estimated to about 403 911 t this last decade. The production of “Guedj” estimated about 3 546 t in 1999 has enhanced of 19% in 2003 (DOPM, 2004). Senegalese fermented-salted and sun-dried fish products enter both local marketing sites and international markets particularly in Western and Central Africa where they are important animal protein sources for populations living far from coasts (Fellow 1997, GRET and CTA, 1993), justifying to improve the traditional process of production of these fish commodities.

Contrary to traditional methods of fish fermentation in South-East Asia (Ostergaard *et al.* 1998), there is no addition of fermentable carbohydrate during spontaneous fermentation of fish in Senegal. It is known that most fishes contain only very little carbohydrate (< 0.5 %) in the muscle tissue and only small amounts of lactic acid are produced post mortem. This can have important consequences for the microbiology of fish as amongst other factors, it allows

the sensitive pH spoilage bacteria like Enterobacteriaceae and *Shewanella putrefaciens* strains to grow (Gram 1992; Gram and Huss 1996) in the products.

Lactic acid bacteria are used as selected starters to improve traditional food fermentations. They perform in fermented foods both acidification, due to the production of lactic and acetic acids, flavor compounds production, as well as protection of the food against spoilage and pathogenic microorganisms by producing antimicrobial substances like organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, fatty acids, phenyllactic acid, and or bacteriocins (antimicrobial peptides) (Corsetti *et al.* 1998; Ghalfi *et al.* 2006; Klaenhammer 1993; Messens and De Vuyst 2002; Rodríguez *et al.* 2000).

In the course of screening bacteriocin producing strains of Senegalese traditional foods lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 was isolated from fermented millet flour. It contains nisin gene and showed a broad bacteriocin inhibitory spectrum as well as high *in vitro* antibacterial activity against different potential (Diop *et al.* 2007<sub>a, b</sub>) food microbial spoilage like *Weissella confusa*, *Bacillus coagulans*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. This strain has been selected for use as starter to enhance storage of traditional food products in Senegal including traditional fermented fish products.

This study describes an assessment of the level of microbial spoilage of spontaneous fermentation of sumpat grunt and giant African threadfin fishes from a traditional local market in Senegal as well as a use of *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 strain as barrier to enhance the control of Gram-negative spoilage bacteria during fermentation of the fishes. Depression of pH, bacteriocin inhibitory activity and antimicrobial effects by CWBI-B1410 strain in fish fillets supplemented with glucose (Bourgeois and Larpent 1996) and in those not supplemented with glucose were evaluated. Moreover fermented fish products have been added salt (7% wt/wt) for reinforcing the antimicrobial effects performed by CWBI-B1410 strain in products.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Bacterial strains**

*Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410 able of producing bacteriocin was isolated from Senegalese fermented millet flour (Diop *et al.* 2007<sub>a, b</sub>). *Pediococcus pentosaseus* obtained from CWBI (Agricultural University of Gembloux, Belgique) culture collection, was used as indicator strain for evaluation of the residual bacteriocin inhibitory activity in supernatant of exude from fish fillets inoculated with CWBI-B1410 strain as starter. This strain was used as indicator for assessment of the in vitro bacteriocin activity during the course of screening CWBI-B1410 strain. Then it could permit to compare the bacteriocin productivity by this strain on MRS broth and on fish. The two strains were maintained on glass beads at - 80°C.

### **2.2 Fish source and filleting conditions**

Sumpat grunt (*Pomadasys jubelini*) and giant African threadfin (*Polydactylus quadrifilis*) fish samples around 40 to 50 cm of length and 700 to 900 g of weight were purchased from a traditional market (Soumbédioune/Dakar) at landing moment. The fishes were scaled, and eviscerated on site by “women cleaners” under the conditions of fish preparation prevailing in the traditional marketing sites: fish samples purchased by consumers are generally gutted by some fish operators (women activity). This activity is paid, and involves possible risk of cross-contamination (Diei-Ouadi 2005). Gutted fish samples were brought to laboratory within 15 min in plastic bag purchased on site, and were cleaned by using potable water. Filleting was done in sterile conditions. Two fish fillets (with skin) portions of 150 g of weight and 0.6 cm of thickness were prepared from each fish for use for fermentation.

### **2.3 Raw fillets treatments and fish fermentation conditions**

Fish fillets were subdivided in three groups for each fish commodity. In the first group any treatment was performed in raw fish fillets; in the second groups fillets were inoculated with  $10^7$  CFU/g of CWBI-B1410, whereas in the third group fillets were both supplemented glucose (1%; wt/wt) and inoculated with  $10^7$  CFU/g of CWBI-B1410. All fillets were incubated for 23 h at 30°C (similar to ambient temperatures in tropical area) used for fish fermentation (GRET and CTA 1993).

The inoculum was prepared by removing the strain from storage at - 80°C and incubating on MRS agar at 30°C for 48 h. It was sub-cultured in MRS agar before to be propagated on 30 ml of MRS broth at 30°C for 16 h before use. Cultures were centrifuged (Sigma 2-4, Germany) at 4000 rpm for 20 min. The pellet was twice washed with 5 ml of physiologic water (NaCl 0.85%) before to be suspended in 20 ml of physiologic water. This bacterial suspension was used for fish inoculation.

### **2.4 Analysis of samples**

The sampling was conducted at the beginning and at regular intervals during incubation of fillets for fermentation. Ten (10) g of fish flesh were suspended in 90 ml of sterile saline water (NaCl, 8 g/l) in a sterile sealed plastic bag (BA 6141/CLR, Seward, UK) and crushed using a stomacher (Blender 80, Seward Laboratory, London UK) for 2 min. The resulting homogenized solution was serially diluted (1/10) in saline water (NaCl, 8 g/l) for bacterial counts. One hundred microliters of the different solutions were smeared on MRS agar supplemented with cycloheximide (Sigma, St Louis, USA) at 50 mg/l, and polymyxin b (Sigma, St Louis, USA) at 100 UI/ml (MRS<sub>c+p</sub>) (Davidson and Cronin, 1973) for evaluation of lactic acid bacteria counts, on Hektoen enteric agar (Scharlau Chemie, Spain) for count of Enterobacteriaceae and H<sub>2</sub>S-producing strains considered as the main spoilage organisms of fish stored at tropical ambient temperatures (Gram and Huss 1996), and on Rose Gal Beig

(Biokar Diagnostics, France) for *Escherichia coli* strains (purple colonies) counts. Moreover, the not diluted solution was also used for measuring the pH of fishes (Eutech instrument, 219208, Singapur).

Thirsty strains of the dominant colonies detected on Hektoen agar, and isolated from spoiling sumpat grunt fish fillets (with putrescent rejection and levels of  $10^{8-9}$  cfu/g of spoilage bacteria after 23 h of incubation) have been randomly selected and purified for characterization of the dominant spoilage strains in naturally fermented fishes. Strains were examined microscopically for cellular morphology and Gram stain phenotype was determined by KOH method (Buck 1982) whereas catalase activity was tested by the 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> method. Gram negative strains were identified by API 20E (Biomérieux, France) method. A characterization in depth of the main screened putrefactive enteric strain detected has been performed by 16S rDNA sequence as described by Diop *et al.* (2007b).

### **2.5 Determination of bacteriocin-like activity by CWBI-B1410 on fishes**

Bacteriocin-like substances productivity by CWBI-B1410 strain in glucose and without glucose supplemented fillets was evaluated by measuring residual activity in the supernatant of fish exude in using the critical dilution technique (Barefoot and Klaenhammer 1983). Five hundred microliters of fish exude were sampled at regular intervals and were centrifuged at 11 000 rpm for 15 min. (Eppendorf AG 22331, Hamburg, Germany). The supernatant was pasteurized for 10 min. at 80°C and serially diluted (1/2) in phosphate buffer (50 mM, pH 6.3). Fifty microliters of aliquots of the various dilutions were loaded into separate wells cut in the agar medium inoculated with 110 µl of cultures of the indicator strain (*P. pentosaseus*). Plates were incubated overnight at 37°C. Inhibition was scored positive in presence of a detectable clearing zone around the well. The activity of the fish juice was defined as the

reciprocal of the highest dilution showing definite inhibition of growth of the indicator strain and was expressed as Arbitrary Units per milliliter (AU/ml).

### **2.6 Post-fermentation salting of fillets**

Fermented fillets have been impregnated with 20 ml of NaCl solution (0.33g/ml) in sterile glass jars which were stored at 10°C for 11 h for reinforcing the antimicrobial effects performed by the starter in fermented products fish.

For each fish, trials were repeated twice, and each determination was performed in triplicate. The data reported in this study are average values of the different assays.

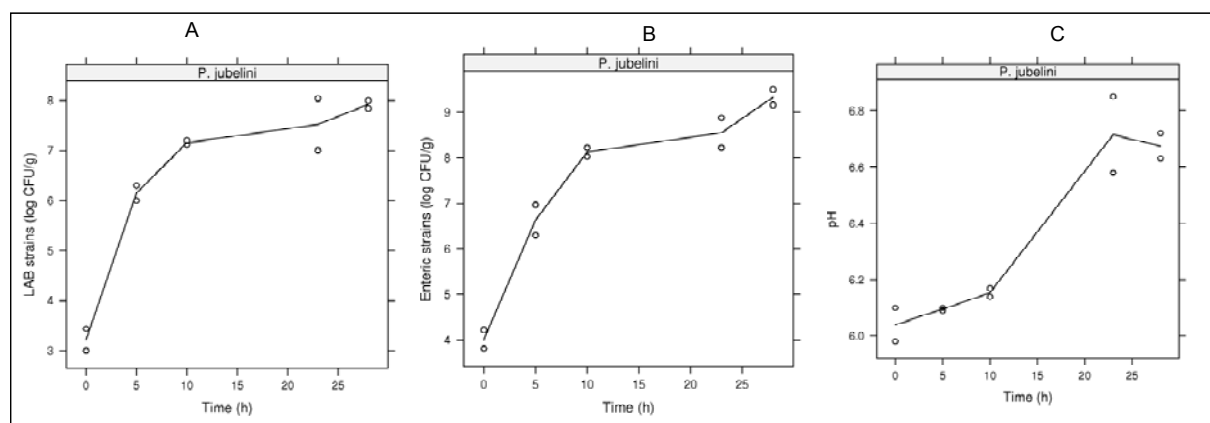
## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

Fermented-salted and sun-dried fish products are important animal protein sources for populations living far from coasts in Western and Central Africa. A monitoring of bacterial and biochemical changes occurring in two tropical fish products fermented naturally (a widespread strategy in Western Africa) and by using a *Lactococcus lactis* strains with glucose supplementation as barrier to control the growth of pathogenic bacteria in the products (new strategy) was undertaken in this study.

The total aerobic and mesophilic microflora counts of sumpat grunt fish fillets reached 5.7 log CFU/g. Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae and *Escherichia coli* strains were determined at  $10^3$ ,  $10^4$ , and  $10^{1-2}$  CFU/g. These levels were similar to those reported by Diei-Ouadi (2005) and indicate that sanitary conditions of fish handling in local marketing sites were not well adapted.

Enterobacteriaceae and lactic acid bacteria strains of fillets incubated at 30°C for fermentation as in traditional processing increased rapidly and reached  $10^{9-10}$  and  $10^8$ , respectively, after 23 h of incubation (Figures 1A and 1B). *Escherichia coli* strains were determined at  $10^{3-4}$  CFU/g after 23 h of incubation at 30°C. Any depression of fish pH was noted in such processed fillets as shown in figure 1C.

**Figure 1:** Evolution of bacterial contamination and pH profiles of sumpat grunt fish fillets incubated at 30°C for fermentation as in traditional processing.



(A): lactic acid bacteria (LAB) strains; B: Enteric strains; C: pH  
Similar results were obtained for giant African threadfin.

Putrescent odors were developing from fish fillets after 5-6 h of incubation. Twenty five Gram-negative and 5 Gram-positive strains were screened from a total of 30 strains randomly selected of spoilage bacteria isolated (Hektoen) from the spoiled fillets incubated for 23 h at 30°C (table 1). Apparent H<sub>2</sub>S producing strains were estimated at 3x 10<sup>6</sup>- 3x 10<sup>7</sup> CFU/g after 23 h of incubation. *Proteus sp* (*Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*) strains were the main putrefactive enteric bacteria strains detected in spoiled fillets as shown in table 1.

**Table 1:** Main enteric bacteria strains screened from degraded *P. jubelini* fish fillets (traditional process 23 h at 30°C).

Number of isolates strains	Gram + strains	Gram - strains	Enteric bacteria strains screened by API 20E
30	5	25	<i>Proteus Sp</i> (9), <i>Shewanella putrefaciens</i> (4), <i>Aeromonas hydrophila</i> (3), <i>Xanthomonas sp*</i> (3), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2), <i>Salmonella choleraesuis</i> (1), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2), <i>Morganella morganii</i> (1).

The gram positive bacteria strains were presumed to be *Bacillus sp* because of their morphology and catalase activity). Numbers in parenthesis for the different species indicates number of strains detected.

\*Non-fermenter ssp strains characterized by 16S rDNA.

The main screened *Proteus mirabilis* strain named CWBI-B1425 has been characterized more in depth by 16Sr DNA sequences. The sequences have been registered in Genbank Database under the accession number EF371001 (Diop *et al.* 2007<sub>c</sub>). Four of the 5 Gram

positive were presumed to be *Bacillus sp* based on phenotypic tests [morphology (rod), and catalase (positive) activity].

The predominance of enteric strains in spoiled naturally fermented fishes can be explained by the low-acid pH of flesh of fresh fish and its content of free amino acids resulting from chemical changes that occur in dead fish caused by autolytic enzymes (Aoki *et al.* 2000; Ladrat *et al.* 2003) that make these catabolites readily available to support growth of these strains. In contrast, the carbohydrate content of fish flesh is negligible (< 0.5 %) (Stansby, 1962), limiting the pH depression associated with the production of lactic acid (Gram and Huss 1996; Hardcover 2005). The release of ammonia resulting from bacterial deamination of amino acids contributes to the increase of pH in fish products and explained the presence of enteric bacteria in the fish products.

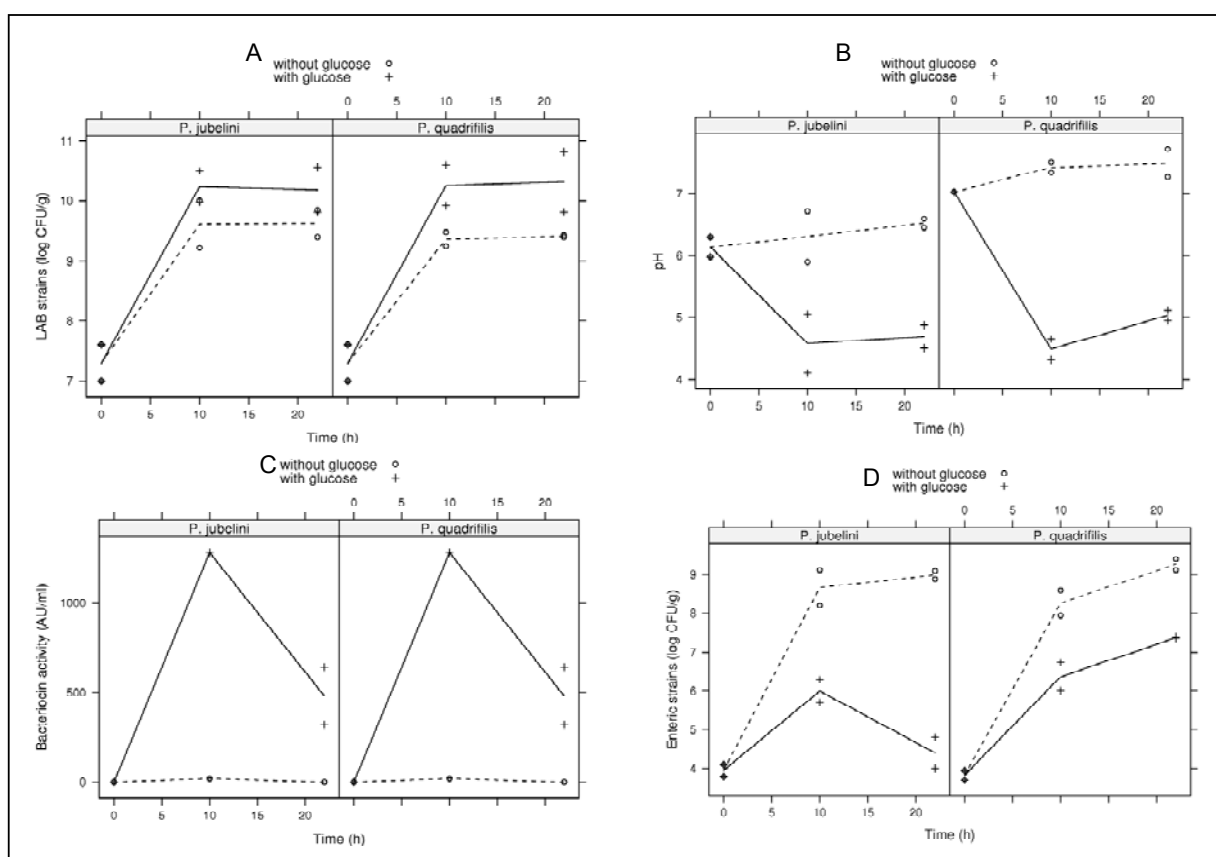
An improvement of growth and production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria in fillets to control the growth of the enteric spoilage bacteria in fishes was undertaken by fish inoculation with *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 as acidifying cultures with external supply of carbon source by addition of glucose (1% wt/wt) in fillets.

A higher growth rate of lactic acid bacteria in glucose supplemented fishes were noted (Figures 2A). Any pH depression and residual antibacterial activity in juice of fishes were detected in fillets without glucose supplementation. A decrease of the pH to acid value (4.5), and a residual antibacterial activity of 1280 AU/ml were noted in fillets inoculated with CWBI-B1410 strain and supplemented with glucose (Figures 2B and 2C). The residual antibacterial activity detected in exudes of fishes declined at about 480 AU/ml at the end of the fermentation of the fishes (Fig 2C). Hektoen bacterial counts were of 4 (in sumpat grunt) and 2 (in giant African threadfin) log CFU/g fold lowest to those of without glucose supplemented fillets (Figure 2D). *Escherichia coli* strains were not detectable by bacterial counts in glucose supplemented sumpat grunt and determined at  $10^1$  CFU/g in giant African



threadfin supplemented with glucose, at the end of the fermentation of fishes, whereas their number in fillets not supplemented with glucose were similar to those in fillets processed traditionally (table 2). Putrescent odors were not very perceptible in fillets supplemented with glucose meaning the inhibition of enteric bacteria strains in these fishes. Moreover, the antimicrobial effects noted with CWBI-B1410 strain in fish products, was enhanced by addition of salt (6.5%, wt/wt) which decreased the level of enteric strains as well as the *Escherichia coli* strains of 1 log CFU/g.

**Figure 2 :** Influence of *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 strain to growth (A), decrease pH (B), produce bacteriocin-like inhibitory substances (C), and inhibit growth of enteric strains (D) in sumpat grunt, and in giant African threadfin supplemented with and without glucose and incubated at 30°C for fermentation.



The bacteriocin-like antibacterial activity was assessed in the supernatants of fish fillets exudes by well diffusion technique in using *P. pentosaseus* as indicator strain.

**Table 2:** Evolution of *Escherichia coli* strains contaminations of treated fish fillets

Fish	Treatments of raw fillets with:	<i>Escherichia coli</i> levels (CFU/g) in fish fillets			
		0 h	10 h	22 h	33 h*
<i>P. jubelini</i>	CWBI-B1410	10 <sup>1-2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3-4</sup>	-
	CWBI-B1410 + glucose	10 <sup>1-2</sup>	ND	ND	ND
<i>P. quadrifilis</i>	CWBI-B1410	10 <sup>1-2</sup>	10 <sup>2-3</sup>	10 <sup>3-4</sup>	-
	CWBI-B1410 + glucose	10 <sup>1-2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	ND

*Treated fillets were incubated at 30°C for 23 h before to be salted (6%, wt/wt) at 10°C*

*Escherichia coli* strains are purple colored on Rose Gal Bcig agar

ND: not detectable by bacterial counts

- Not determined (degraded fillets)

\*: Bacterial counts of fermented and salted fillets

The homofermentive degradation of the glucose by the starter involves of release of organic acids resulting in a decrease of pH to acid values (4.5) and inhibition of the growth of enteric and *Escherichia coli* strains in fishes. The antibacterial effects of CWBI-B1410 strain with glucose supplementation were higher in sumpat grunt than in giant African threadfin. In the last fish, after a decrease of the pH from 7 to 4.5 within 10 h of incubation, an increase of the pH was noted, limiting the control of the growth of enteric strains in the fish. As CWBI-B1410 was found to produce bacteriocin in the previous study, the residual antibacterial activity detected in fish juice could be due to the in situ production of bacteriocins by this stain. The bacteriocin inhibitory activity by CWBI-B1410 in juice was similar to that measured in neutralized supernatant from CWBI-B1410 culture on MRS broth (Diop *et al.* 2007<sub>a</sub>) and could enhance the control of susceptible Gram-positive spoilage bacteria strains less sensitive to low pH value in fishes. The decrease of the bacteriocin activity at the end of the fermentation can result from the degradation of the bacteriocins by proteolytic enzymes naturally present in food products (Goff *et al.* 1996; Kouakou 2008). Our results suggest that the use of CWBI-B1410 with glucose supplementation as protective culture during fish fermentation, followed by incorporation of sodium chloride can be a suitable strategy of enhancing the bacterial quality of traditional fermented fish products called “Guedj” in Senegal.

#### 4. CONCLUSION

The results of this study indicate that traditional process of fish fermentation in Senegal resulted in propagation of enteric bacteria and H<sub>2</sub>S-producing strains in the products. The use of *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 as starters with fish supplementation of carbohydrates as carbon source enhanced the depression of pH and the bacteriocin-like inhibitory activity by CWBI-B1410, resulting in a reduction of enteric strains of 4 log CFU/g on *P. jubelini* and 2 log CFU/g on *P. quadrifilis*. Moreover, the addition of salt enhanced the reduction of the microbial spoilage in the fish products. These data suggest that this new strategy of fermentation combined with salt addition can be suitable technologies of enhancing storage of tropical fish commodities. Millet flour from which *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 has been isolated could be used as carbohydrates source during starter culture fermentation of fishes.

#### Acknowledgment

We are grateful to Belgian University Development Centre (CUD) who financially supported this research which was realized in the Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI)/Agricultural University of Gembloux/Belgium, and the Ecole Supérieure Polytechnique (ESP)/University of Dakar/ Senegal.

#### 5. REFERENCES

1. Aoki Takaiko, Yamashita T. and Ueno R. 2000. Distribution of cathepsins in red and white muscles among fish species. *Fish. Sci.* 66: 776-782.
2. Barefoot, S. F., and T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1808-1815.

3. Bourgeois, C. M., and J. P. Larpent. 1996. Microbiologie alimentaire aliments fermentés et fermentations alimentaires. Lavoisier Technique & documentation, 2<sup>nd</sup> edition, Paris.
4. Buck, J. D. 1982. Non-staining (KOH) methods for determination of gram reactions of marine bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 44(4):992-993.
5. Corsetti, A., M. Gobetti, J. Rossi and P. Damiani 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus Sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 253-256.
6. Davidson, C. M., and F. Cronin. 1973. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Appl. Microbiol.* 26:339-440.
7. De Vuyst L, Vandamme EJ. (1994.). Antimicrobial potential of Lactic acid bacteria. In L. De Vuyst, E. J. Vandamme (eds.). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and applications. London: Blackie Academic and Professional, p. 91-142.
8. Diei-Ouadi Y. 2005. Minced Sardinella fillets in fish-landing and marketing sites in Senegal. In FAO fisheries Circular No 999: FIIU/C999 (EN).
9. Diop, M.B., E. Tine, R. Dubois-Dauphin, E. H. A. NGom, and P. Thonart. 2007a. Description of plasmidic gene encoding nisin A, a bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410 isolated from Senegalese traditional fermented millet flour. EMBL/Genbank/DDBJ/Databases ([www.ncbi.com](http://www.ncbi.com)). Accession numbers EF371000 et ABN45880.
10. Diop, M.B., E. Tine, R. Dubois-Dauphin, E. H. A. NGom, and P. Thonart. 2007b. Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 11 (4): 275-281.
11. Diop, M.B., R. Dubois-Dauphin, E. Tine, and P. Thonart. 2007c. Identification of spoilage bacteria isolated from filleted sumpat grunt (*Podamassys jubelini*) fish,

- purchased at Gueule tapee local Market in Senegal. EMBL/Genbank/DDBJ/Databases ([www.ncbi.com](http://www.ncbi.com)). Accession numbers EU128486 and EU128488;
12. Direction des pêches maritimes (DOPM). 2004. Résultats Généraux des pêches maritimes, Rapport 2004. Ministère de l'Economie Maritime & des Transports Maritimes Internationaux, république du Sénégal.
  13. Fellows P. 1997. Traditional foods processing for profits. p. 163-191. In P. Fellow (ed.) Meat, Fish and dairy products Chap 6. Intermediate Technology Publication, London, UK.
  14. Ghalfi, H., A. Allaoui, J. Destain, N. Benkerroum, and P. Thonart. 2006. Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. *J. Food Prot.* 59 (5): 1066-1071.
  15. Goff, J. H., A. K. Bhunia, and M. G. Johnson. 1996. Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with pediocin AcH bound to heat-killed *Pedococcus acidilactici* cells. *J. Food Prot.* 59:1187-1192.
  16. Gram L, Huss HH. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 121–131.
  17. Gram L. (1992). Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice at ambient temperature. In: E. H. Bligh (editor), *Seafood Science and Technology*. Chap. 23 pp 225–233. Fishing News Books, Blackwell, Oxford.
  18. Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques (GRET), et Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA). 1993. Conserver et transformer le poisson. p. 41-43. In Gret & CTA (ed.), *Responsables de lourdes pertes: des problèmes techniques et sanitaires*. Le Point Sur, Paris, FR.
  19. Hardcover (ed.) 2005. International Commission on Microbiological specifications of Foods (ICMSF). *Microorganisms in foods 6: Microbial ecology of foods commodities*.

- p. 174-249. Fish and fish products. Kluwer Academic Publishers, 2<sup>nd</sup> ed., New York, USA.
20. Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 1993; 12: 39-86.
  21. Kouakou P., Ghalfi H., Destain J., Dubois-Dauphin R., Evard P., and P. Thonart. 2008. Enhancing the antilisterial effect of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 in pork meat and cocultures by limiting bacteriocin degradation. *Meat Sci.* doi: 10.1016/J.meatsci.2008.02.015 (accepted manuscript).
  22. Ladrat C., Verrez-Bagnis, Noël J. and Fleurence J. 2003. In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effect of cathepsins B., D and L. *Food che.* 81: 517-525.
  23. Messens W. and L. De Vuyst. 2002. Inhibitory substances produced by Lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. – a review. *Int J Food Microbiol.* 72:31-43.
  24. Ostergaard A., Ben Embark PK, Yamprayoon J, Wedell-Neergaard C., Huss H. H., and Gram L. 1998 *Trop. Sci.* 38: 105-112.
  25. Rodríguez E., B. Gonzáles, P. Gaya, M. Nuñez, and M. Medina. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 10: 7-15.
  26. Stansby M. 1962. Proximate composition of fish. In: Heen E, Kreuzer R, editors. *Fish in nutrition.* Fishing News (Books), Ltd.

**CHAPITRE 6 : EFFETS ANTIBACTERIENS DU SURNAGEANT DE CULTURE NEUTRALISE D'UNE SOUCHE LACTIQUE PRODUCTRICE DE BACTERIOCINE, ADDITIONNE DE SEL (NaCl), SUR DIFFERENTS POISSONS CONSERVES A 10°C AU SENEGAL**

**Michel Bakar DIOP<sup>1, 2\*</sup>, Robin DUBOIS-DAUPHIN<sup>1</sup>, Kheifate NDIAYE<sup>2</sup>, Jacqueline DESTAIN<sup>1</sup>, Emmanuel TINE<sup>2</sup>, El Hadj A. NGOM<sup>2</sup>, et Philippe THONART<sup>1</sup>**

**1 :** Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI)/ Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx), 2, Passage des Déportés, B 5030 Gembloux, Belgique

**2 :** Université Cheikh Anta DIOP (UCAD), Ecole Supérieure Polytechnique Laboratoire L-MAGI, BP 5085 Dakar, Sénégal ; Tél : (221) 33 824 25 06 ; Fax : (221) 33 825 55 94

Sakho et Crouzet (Eds.). AUF, 2008, pp. 39-44

## Résumé

L'évolution de la flore contaminante de filets (100 g) de différents poissons [maigres (*P. jubelini*), moyennement gras (*P. quadrifilis*), et gras (*A. heudeloti*)] conservés à 10°C dans 100 ml de surnageant de culture (SCN) de la souche *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 productrice de bactériocine salé (NaCl, 0,14 g/ml) a été comparée à celle de 100 g de filets traités en utilisant 100 ml de SCN de la souche *Lactococcus lactis* LMG 6890 non productrice de bactériocine salé ou 100 ml d'une solution de NaCl (0,14 g/ml) additionnée de benzoate de sodium et de sorbate de potassium (B+S), chacun en concentration de 0,5 mg/ml. Un niveau de flore contaminante de 10<sup>6</sup> ufc/g a été considéré comme la fin de la durée de conservation. Le niveau de la contamination microbienne dans les filets crus atteignait 5,7 log ufc/g. L'addition d'une solution saline ou du SCN de LMG 6890 salé entraîne une réduction de la flore contaminante des filets de 1,5 log ufc/g et sa stabilisation pendant 4 à 7,5 jours correspondant respectivement aux durées de conservation du poisson gras et du poisson maigre à 10°C. L'utilisation du SCN de CWBI-B1410 salé et de la solution salée additionnée de (B+S), comme agents antimicrobiens retarde l'augmentation du nombre de microorganismes dans les filets, entraînant une augmentation de la durée de conservation respectivement de 12 et 13 jours pour *P. jubelini*, de 7 et 3 jours pour *P. quadrifilis* et de 8 et 2,5 jours pour *A. heudeloti*. Ces résultats suggèrent que cette technologie simple peut constituer une stratégie convenable d'amélioration de la conservation des produits de la pêche artisanale au Sénégal.

Mot clés : **Sel ; Bactériocine ; Conservation ; Poissons filetés, Sénégal**



## 1. INTRODUCTION

En terme de qualité, le poisson constitue une source de protéine similaire à celle de la viande d'animaux à sang chaud, mais il est aussi un produit de base particulièrement périssable et doit être conservé (aussitôt après sa mort) à des températures comprises entre  $-2$  et  $0^{\circ}\text{C}$  [1], pour ralentir une dégradation le rendant impropre à la consommation humaine. Au Sénégal, la pêche est un secteur vital de l'économie nationale. Le poisson constitue la principale source de protéine d'origine animale pour les populations. La moyenne nationale de la consommation de poisson par habitant est estimée à  $28,1$  kg/an, loin devant la viande ( $17,1$  kg/an) (FAO, 2004). La production annuelle moyenne de poissons maritimes est estimée à  $403\,991$  tonnes au cours de cette dernière décennie. La pêche artisanale représente près de  $85\%$  des débarquements [2]. Le marché du poisson frais est très important. Le conditionnement des produits de pêche utilise de faible quantité de glace et les températures ambiantes qui avoisinent  $30^{\circ}\text{C}$ , de plus la préparation du poisson est mal réalisée, dans des environnements généralement mal adaptés du point de vue sanitaire [3]. Les produits se dégradent vite et les pertes post-récoltes sont aussi élevées ; elles représentent environ  $25\%$  des captures totales [4].

La bio-conservation peut constituer une stratégie permettant d'améliorer la conservation et la salubrité de ces produits. Les bactéries lactiques sont généralement considérées sûres et utilisées comme starters (culture de départ) pour améliorer la conservation des denrées alimentaires fermentées. Ces bactéries réalisent dans les aliments crus une acidification, une production d'arômes, en plus de l'inhibition des bactéries indésirables et pathogènes par la production d'une variété de substances antimicrobiennes tels que des acides organiques (acétique et lactique), du peroxyde d'hydrogène, du diacétyl, d'acides gras antifongiques, de l'acide phényl-lactique, et/ou de bactériocines [5]. Les bactériocines de bactéries lactiques font partie de la gamme de conservateurs naturels utilisés pour améliorer la conservation et la

sécurité des denrées alimentaires [6]. Ce sont des composés synthétisés au niveau des ribosomes et produits par certaines bactéries pour inhiber la croissance d'autres bactéries, généralement phylogénétiquement proches parlant [7].

Au cours d'une sélection de souches lactiques productrices de bactériocines à partir d'aliments traditionnels d'origine sénégalaise, une souche de *Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410, a montré une activité antimicrobienne *in vitro* de type bactéricide élevée dans le surnageant de culture neutralisé (pH 6) contre plusieurs souches contaminant potentiels dans les aliments [8]. Cette souche porte le gène codant pour la nisine A [9], une bactériocine autorisée comme additifs alimentaires dans plusieurs pays [10]. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne du surnageant de culture neutralisé (SCN) de la souche *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 en combinaison avec du chlorure de sodium, sur des filets de poissons marins de production artisanale au Sénégal, au cours de leur conservation à 10°C.

Les critères microbiologiques dans les poissons et produits dérivés destinés à l'alimentation humaine sont exprimés en bactéries/grammes à l'exception de certaines bactéries telles que *Salmonella* ou *Listeria monocytogenes* qui sont exprimées en bactéries par 25 grammes. En ce qui concerne les poissons marins frais ou congelés, ronds ou en filets la limite généralement acceptable est définie à  $< 10^5$  ou  $5 \times 10^5$ /g pour la flore aérobie mésophile totale contre zéro bactérie pour *Salmonella* ou *Listeria monocytogenes* [11]. Par conséquent, un niveau de flore totale de  $10^6$  ufc/g a été considéré comme la fin de la durée de conservation des filets de poissons au cours des essais d'évaluation de l'activité antibactériennes des préparations salées.

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1 Souches lactiques, milieux et conditions de culture**

*Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410 a été isolée de farine de mil fermentée d'origine sénégalaise [8, 9]. *Lactococcus lactis subsp. lactis* (LMG 6890), utilisée comme

contrôle négatif pour les essais de conservation, a été obtenue de la collection LMG (Université de Gand/ Belgique). *Pediococcus pentosaseus* issu de la collection du Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) de la FUSAGx, sensible à l'activité du SCN de CWBI-B1410 [8], a été utilisé comme souche indicatrice pour l'évaluation de l'activité bactéricide des SCN. Les deux souches CWBI-B1410 et LMG 6890 ont été cultivées pendant 12 h à 30°C sur 1000 ml de bouillon MRS. Les cultures ont été centrifugées à 4000 trs/min., les surnageants de culture ont été neutralisés à pH 6 avec une solution de NaOH (5N).

### **2.2 Activité des surnageants de cultures neutralisés des deux souches lactiques**

L'activité antibactérienne du SCN de CWBI-B1410 et LMG 6890 a été estimée en utilisant la technique de la dilution critique décrite par Barefoot *et* Klaenhammer (1983). La souche *P. pentosaseus* qui s'était révélée très sensible à l'activité inhibitrice du SNC de CWBI-B1410 lors des études de sélection de cette souche, a été utilisée comme souche indicatrice. L'activité, exprimée en Unité Arbitraire par millilitre (AU/ml), est égale à l'inverse de la dernière dilution montrant une zone d'inhibition de croissance. Cette technique a été également utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne résiduelle dans le jus de poisson au cours des essais de conservation des filets. Dans ce cas, l'activité a été exprimée en %, en considérant celle du SCN comme étant 100%.

### **2.3 Préparation des solutions de préservation**

Du chlorure de sodium, a été ajouté dans le SCN de CWBI-B1410, dans le SCN de LMG 6890 et dans de l'eau distillée en concentration de 0,14 mg/ml. Une quatrième solution de NaCl à 0,14 g/ml a été supplémentée de benzoate de sodium (RPL, Leuven, Belgium), et de sorbate de potassium (Fluka, Buchs, Germany) chacun en concentration finale de 0,5 mg/ml. Ces conservateurs sont utilisés dans les produits de pêche de courte durée de conservation à des concentrations maximales de 0,2 mg/kg. Le pH des différentes solutions a été mesuré et

éventuellement ajusté à 6 en utilisant une solution de NaOH ou HCl 0,1N. Les solutions ont été aussi pasteurisées (10 min. à 80°C) puis refroidies à 10°C pendant 2 heures avant d'être utilisées pour imprégner les filets.

#### **2.4 Origine des poissons, conditions de filetage, teneur en lipides totaux et traitements de préservation**

Des échantillons de sompat (*Pomadasys jubelini*), de capitaine (*Polydactylus quadrifilis*), et de mâchoiron (*Arius heudeloti*) ont été achetés au marché artisanal de Soumbédioune (Dakar Fann/Sénégal) durant toute la durée de l'étude, du 10 juillet 2006 au 4 octobre 2006. Les poissons ont été éviscérés et écaillés sur place par les « femmes nettoyeuses » [4], et transportés dans des sacs plastiques achetés sur place au Laboratoire L-MaGI ESP/Dakar (au bout de 15 min.) où ils ont été lavés avec de l'eau potable (de robinet) et filetés stérilement. Des filets de 100 g (munis de peau) ont été utilisés pour les essais de conservation.

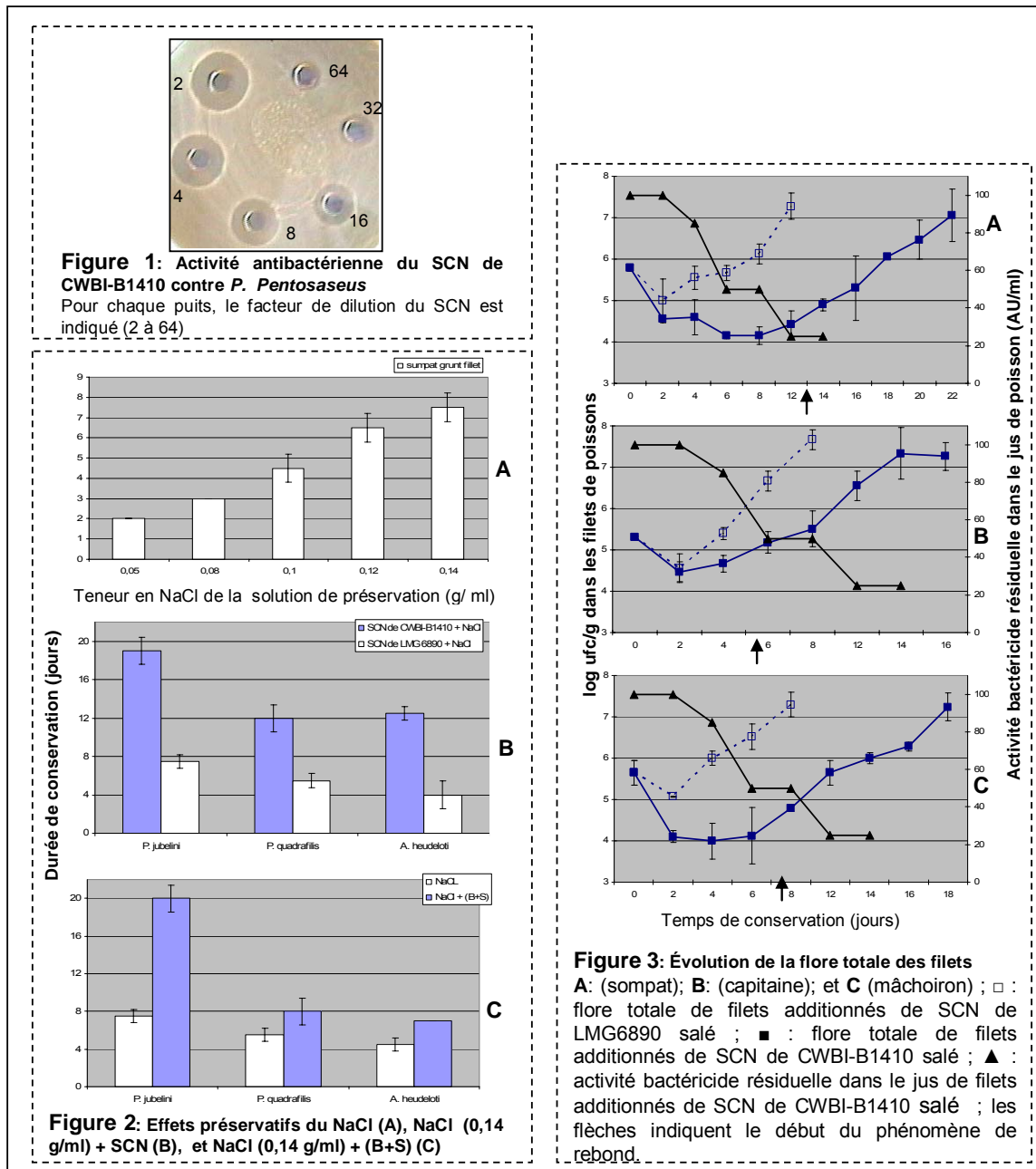
100 ml de solution antimicrobienne ont été ajoutés dans 100 g de filets de poisson cru placés dans un bocal en verre stérile. Les filets ainsi traités ont été incubés à 10°C pendant 22 jours au maximum. La flore totale a été dénombrée sur PCA additionné de 0,5% de NaCl. Toutes les 48 h, le filet est retiré de la solution de conservation dans des conditions stériles pour les prélèvements puis remis dans la solution. Deux grammes de chair de poissons prélevés en différents points du poisson et suspendus dans 18 ml de solution peptone (0,1%) salée (0,5 %) dans un tube Falcon de 50 ml stérile. La suspension a été mélangée vigoureusement pendant 2 minutes au vortex puis diluée successivement de 1/10 dans de l'eau peptonnée salée. Cent microlitres de chaque dilution ont été étalés sur PCA en triplet. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48 h avant que les colonies ne soient énumérées. La flore totale dans les filets a été déterminée toutes les 48 h jusqu'à ce qu'elle atteigne  $10^6$  ufc/g, considéré comme la fin de la durée de conservation. Les résultats présentés dans cette étude sont la moyenne de deux essais séparés sur des échantillons différents pour chaque poisson.

De plus, 10 g de filet de chacun des trois poissons ont été séchés (24 h à 100°C) puis broyés. La teneur en lipides totaux dans les matières sèches obtenues a été déterminée selon [13].

### **3. RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Le niveau de la flore initiale dans les filets de sompat, de capitaine et de mâchoiron atteignait respectivement 5,7, 5,3 et 5,65 log ufc/g. La teneur en lipides totaux des filets a été estimée à 2,8% (sompat), 3,28% (capitaine) et 17,75 % (mâchoiron) selon [13]. L'activité antibactérienne du SCN de CWBI-B1410 et du SCN de LMG 6890 a été évaluée respectivement à 1280 AU/ml (figure 1) et 0 AU/ml (photo non montrée). Les durées de conservation des filets de sompat, de capitaine, et de mâchoiron additionnée d'une solution saline ou du SCN de LMG 6890 salé (0,14 g/ml) sont estimées à 7,5, 5,5 et 4 jours (figures 2A et 2B), contre 19 et 20 jours pour les filets de sompat, 12,5 et 8 jours pour les filets de capitaine, 12 et 7 jours pour les filets de mâchoiron en utilisant respectivement le SCN bactéricide de la souche CWBI-B1410 salé (figure 2B) et la solution saline supplémentée de (B+S) (figure 2C), comme agents antimicrobiens. La solution bactéricide de CWBI-B1410 salée réduit de 1,5 log ufc/g le nombre de microorganismes viables et retarde le phénomène la reprise de la croissance des bactéries dans les filets, entraînant une augmentation de la durée de conservation de 12, 7 et 8,5 jours pour respectivement les filets maigres, moyennement gras, et gras (figures 3A, 3B, et 3C).

Elle a un effet antibactérien similaire à celui de la solution salée additionnée de (B+S) sur des filets de poissons maigres comme le sompat, et est plus efficace que cette dernière sur les filets de poissons plus gras comme le capitaine, et le mâchoiron.



Des augmentations de durée de conservation de 21 jours ont été publiées au cours de la conservation de crevettes salées, additionnées de SCN bactéricides d'une souche de *Lactococcus lactis* SIK-83 [14]. Leurs conditions de conservation diffèrent des nôtres, entre autres facteurs, par une flore initiale plus faible ( $10^{2-3}$  ufc/g) et une température de conservation plus basse ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Nos résultats montrent que cette stratégie est applicable pour des filets de poissons de conditionnement artisanal, conservés à  $10^{\circ}\text{C}$  au Sénégal. Le phénomène de la baisse de l'activité de solutions bactéricides sur matrice alimentaire est due

aux interactions entre les molécules de bactériocines avec les constituants des aliments d'une part, et à l'activité des enzymes protéolytiques naturellement présentes dans les aliments, qui dégradent les bactériocines d'autre part [15,16]. Toutefois malgré une perte de 50% de l'activité bactéricide initiale au bout de 5 jours, le contrôle des microorganismes est encore efficace durant 7 à 12 jours dans les filets, retardant ainsi le phénomène de rebond. Cela indique qu'une proportion importante de la flore contaminant des poissons est sensible à l'activité bactéricide du SCN de CWBI-B1410. La différence d'efficacité du SCN de CWBI-B1410 salé sur les trois types de filets peut s'expliquer par une différence d'adsorption des bactériocines par certains constituants du poisson notamment les constituants lipidiques et protéiques [15].

#### **4. CONCLUSION**

Le niveau de la microflore initiale dans les filets crus de poissons de production artisanale au Sénégal est à la limite de l'acceptabilité (salubrité) (6 log ufc/g). L'utilisation de surnageant de culture bactéricide de CWBI-B1410 en combinaison avec du sel, réduit le nombre de microorganismes viables de 1,5 log ufc/g et retarde l'augmentation du nombre de microorganismes dans les filets. Il en résulte des augmentations de durée de conservation de 12, 7,5 et 8 jours pour les filets de sompat, de capitaine, et de mâchoiron. Les effets antibactériens du SCN de CWBI-B1410 salé sont similaires à ceux de la solution salée, additionnée de (B+S) (0,5 mg/ml chacun), sur les filets maigres de sompat alors qu'il est plus efficace que cette dernière sur les filets plus gras de capitaine, et de mâchoiron. Ces résultats suggèrent que cette technologie simple peut constituer une stratégie convenable d'amélioration du contrôle de la flore de contamination dans les produits de pêche artisanale au Sénégal. Les composés bactéricides contenus dans le produit de fermentation peuvent être précipités par addition de sels à saturation, ou aussi être adsorbés à la membrane des cellules

productrices. Les poudres lyophilisées de bactériocines adsorbées aux membranes des cellules productrices se conservent bien dans les conditions en milieu tropical.

### **Remerciements**

Nous remercions la Coopération Universitaire au Développement (CUD) de la Belgique qui a financé les études doctorales de Mr Michel DIOP réalisées en alternance à la FUSAGx (CWBI) et au L-Magi de l'ESP/UCAD/Sénégal.

### **5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] Boyd, L.C.; Green, D.P. et Lepors L.A. Quality changes of pond raised hybrid striped bass during chillpack and refrigerated storage. *J. Food Sci.* 57 (1992) 59-62.
- [2] Direction des pêches maritimes Dakar/Sénégal, Rapport 2004.
- [3] Diei-Ouadi, Y. In FAO fisheries Circular No 999: FIIU/C999 (EN). Minced sardinella fillets in fish-landing and marketing sites in Senegal. 2005.
- [4] Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques (GRET) et Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA). *Le point sur*. Paris, 1993, 286 p.
- [5] Corsetti, L.; Settani, L. et Van Sinderen, D. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity. *J. Appl. Microbiol.* 96 (2004) 521-534.
- [6] O'Sullivan, L.; Ross R.P. et Hill, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84 (2002) 593-604.
- [7] De Vuyst, L et Vandamme E.J. in De Vuyst L. and Vandamme E. J. (Eds.). *Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and applications; Antimicrobial potential of Lactic acid bacteria*. London Blackie: Academic and Professional, 1994, pp. 91-142.



- [8] Diop, M.B.; Tine, E., NGom, E.H.A., Duboisdauphin, R., Destain, J. et Thonart, P. Selection of bacteriocin-producing LAB from traditional fermented food from Senegal. *Biotechnol. Agr. Soc. Environ.* 11 (4) (2007) 275-281.
- [9] Diop, M.B.; Tine, E., Duboisdauphin, R., NGom, E.H.A., et Thonart P. Description of plasmidic gene encoding nisin A, a bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410 isolated from Senegalese traditional fermented millet flour. EMBL/Genbank/DDBJ ([www.ncbi.com](http://www.ncbi.com)). (2007): EF371000 et ABN45880.
- [10] Thomas, L.V.; Clarkson, M.R. et Delves-Broughton. In: Naidu AS Eds. Nisin, Natural food antimicrobial systems. CRC Press, Boca Raton, FL, 2000, pp. 463-524.
- [11] Guiraud J.P. Microbiologie alimentaire; Dunod: Paris, 1998.
- [12] Barefoot, S.F et Klaenhammer, T.R. Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (6) (1983) 1808-1815
- [13] Folch, J.; Lees, M. et Sloane-Stanley, G. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* 226 (1957) 497-504.
- [14] Einarsson, H. et Lauzon H.L. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 669-676.
- [15] Aasen, I.M.; Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axellsson, L et Naterstad K. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* 87 (2003) 35–43.
- [16] Zapico, P.; De Paz, M., Medina, M. et Nuněz, M. The effect of homogenization of whole milk, skim and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* 46 (1999) 151–157.



**CHAPITRE 7: SPOILAGE BACTERIA CONTROL OF FISH FROM ARTISANAL PRODUCTION IN  
SENEGAL WITH BACTERIOCIN-PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA COMBINED WITH SALT  
ADDITION**

**Michel Bakar DIOP<sup>1, 2</sup>, Robin DUBOIS-DAUPHIN<sup>1</sup>, Jacqueline DESTAIN<sup>1</sup>, Emmanuel  
TINE<sup>2</sup>, El Hadji Abib NGOM<sup>2</sup>, Philippe THONART<sup>1\*</sup>**

1 : Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI)/ Gembloux Agricultural University  
(FUSAGx), 2, Passage des Déportés, B 5030 Gembloux, Belgium, Tel: 081 62 23 05; Fax:  
081 61 42 22,

2 : Université Cheikh Anta DIOP, Ecole Supérieure Polytechnique, Laboratoire de  
Microbiologie Appliquée et Génie Industrielle (L-MAGI), BP 5085 Dakar, Sénégal Tél. (221)  
33824 25 06 FAX : (221) 33825 55 94

**(Submitted to African Journal of Agricultural Research)**

**Abstract:**

Three lean (*Podamassys jubelini*), moderately fat (*Polydactylis quadrifilis*), and fat (*Arius heudeloti*) fishes from a Senegalese traditional market were filleted and sampled for bacterial load. Total bacterial counts reached 5.7 log CFU/g. A predominance of enteric ( $10^4$  CFU/g) and lactic acid bacteria ( $10^{3-4}$  CFU/g) strains was noted. These fillets were stored at 10°C with addition (100 ml/100 g) of neutralized supernatants from two bacteriocin-producers (*Lc lactis* CWBI-B1410 and *Lb curvatus* CWBI-B28) cultures supplemented with sodium chloride (0.14 g/ml), as preservatives, to prevent spoilage bacteria growth. Controls were treated with salted (NaCl 0.14 g/ml) neutralized supernatants from two non-bacteriocin-producers (*Lc lactis* LMG 6890 and *Lb curvatus* LMG21688) cultures. Bacterial counts of all treated fillets declined of 1.5 log CFU/g after two storage days. Spoilage bacteria outgrew in controls and were over  $10^6$  CFU/g after 4 (fat fish) and 7.5 (lean fish) storage days, whereas the increase of bacteria number at  $10^6$  CFU/g in fishes treated with salted supernatants of the bacteriocin producers was delayed (bacteriostatic effects) after 13 to 18 fishes storage days. These results suggest that the combination of salt with CWBI-B1410 or CWBI-B28 cell-free culture supernatant can be a suitable hurdle technology to improve storage of fishes from artisanal production in Senegal.

**Key words:** Fish Spoilage Bacteria; Bacteriocin Producers; Salt; antibacterial effects

## 1. INTRODUCTION

Seafood products are known for their high susceptibility to spoilage. The early biochemical changes that occur in dead fish caused by autolytic enzymes (Aoki *et al.* 2000; Ladrat *et al.* 2003) make catabolites available for bacterial growth in the products (Huss 1995). The bacteriological changes that occur in the fish, lead to its rejection for human consumption. Storage temperature is the most important environmental parameter influencing the growth rate and type of spoilage microorganisms in fish products. A variety of different methods exist for prolonging the shelf-life of fresh fish post-harvest: rapid chilling (-2 to 0°C), storage at very low temperature (-20°C), as well as different preservative agents such as organic acids salts and antibacterial agents (Al-Dagal *et al.* 1999; Boyd *et al.* 1992; Isekson *et al.* 1996; Toledo-Flores and Zall 1992).

Senegal is a West African country known for the importance of its marine fisheries. Average annual marine fishery landings are estimated around 403 911 tonnes this last decade. However, the system of fish production is mainly realized by artisanal fishery which accounts for around more than 85% (DOPM 2004) of the total captures. In artisanal fishery, the use of ice for handling fresh fish products is not a widespread practice. Therefore level of bacterial contamination in such handled fishes is generally high (Diei-Ouadi, 2005).

Three strategies are generally used for processing of such fish products to extend their storage time: fermentation followed by salting and drying, salting and drying, or salting followed by heat-smoking and drying. In the different cases important quantities of salt (NaCl, 30-40 % wt/wt) are incorporated in fishes for controlling the evolution of the flora during processing (GRET and CTA 1993; Infoconseils 2005). The salt cured and dried fish products are important animal protein sources for populations living far from the coast, and generally exported in Western and central Africa (DOPM 2004, GRET and CTA 1993, Fellows 1997). The search of suitable strategy to improve bacterial quality as well as lowering

the level of salt content of such products is great challenge. In this purpose we assayed the combination of antibacterial properties by bacteriocin producing lactic acid bacteria strains recognized generally as safe microorganisms, with salt as preservatives in such products.

In previous studies, we have showed that the inoculation of fish with a nisin producing *Lactococcus lactis subsp lactis* CWBI-B1410 strain, with glucose supplementation (1% wt/wt), inhibited the growth of spoilage bacteria like enteric strains during the fermentation of fishes in Senegal (Diop *et al.* 2008<sub>a</sub>; Diop *et al.* 2008<sub>b</sub>). This study is aimed to assess a second strategy of application of bacteriocin producing lactic acid bacteria to improve control of spoilage bacteria growth on fish products from artisanal fishery in Senegal by using *Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410 strain as well as another strain of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 which produces three bacteriocins [Curvalicin (a, b and c)] (Ghalfi 2006). The antibacterial cell-free supernatants from cultures of these bacteria were supplemented with sodium chloride (0.14 g/ml) and tested as barrier to prevent growth of spoilage bacteria on 10°C stored fishes. The evolution of bacterial spoilage of fish fillets treated with salted neutralized cell-free supernatants from cultures of CWBI-B1410 and CWBI-B28 strains were compared to those of fillets treated with salted neutralized cell-free supernatants from cultures of two non bacteriocin producers (*Lactococcus lactis subsp lactis* LMG6890 and *Lactobacillus curvatus* LMG 21688) used as controls.

[This work was presented in part at the 94<sup>th</sup> congress of the International Association for Food Protection 2007 held in Lake Buena Vista, Florida, July 8-11, 2007 (Abstract no P1-22), and at the IAFI World Seafood Congress – Scientific Poster Competition 2007 held in Dublin, Ireland, September 25 - 27, where it was primed for the 3<sup>rd</sup> prize].

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Bacterial strains and media**

The bacteriocin producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* CWBI-B1410 was isolated from Senegalese traditional fermented millet flour (Diop *et al.* 2008a). *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 strain was obtained from the culture collection of the Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) of the Agricultural University of Gembloux in Belgium. *Lactococcus lactis subsp. lactis* LMG 6890 and *Lactobacillus curvatus* LMG 21688 which did not produce bacteriocins were used as negative controls in storage trials. All strains were maintained on glass beads at - 80°C. The cultures of the different strains were prepared by removing these strains from storage at - 80°C and cultivation on MRS agar at 30°C for 48 h. Two to three colonies of each strain have been transferred in a glass tube containing 10 ml of MRS broth. The tubes were incubated at 30°C for 10 h, and transferred in 1000 ml of MRS broth which were also incubated for 10 h at 30°C. The different cultures were centrifuged at 10 000 x g for 20 min. The supernatants were removed, neutralized at pH 6, by addition of NaOH (5N) and stored at -20°C until use for storage trials. *Pediococcus pentosaseus* and *Listeria monocytogenes* strains from CWBI culture collection were used as indicator strains for evaluation of the evolution of the residual antibacterial activity in the antimicrobial preparations during storage of treated fishes. These strains were used as indicators strains during the screening of the two selected bacteriocin producers (Diop *et al.* 2008a; Ghalfi 2006).

### **2.2 Fish source, preparation and filleting conditions**

Fish samples of sumpat grunt (*Pomadasys jubelini*), giant African threadfin (*Polydactylus quadrifilis*) and smoothmouth sea catfish (*Arius heudeloti*), around 40 to 50 cm of length and 700 to 900 g of weight, were purchased from a traditional market (Soumbédioune/Dakar). These fish commodities are among the main fish species (in term of volume of catches and

commercial value) in artisanal fisheries landings (DOPM 2004). Moreover *Arius heudeloti* is known as fat fish (white flesh) in comparison to the two other fishes. The fat content of the three fishes was subsequently determined by the technique of Folch (1957). The fish samples were scaled, and eviscerated on site by three different “Women cleaners”: in the marketing sites, customers usually purchase themselves the necessary quantity of fish and pay for the service of an operator (generally women) to scale and eviscerate the fishes (Diei-Ouadi 2005). Such practices involve cross-contamination of the fish products. Eviscerated fish samples were brought to laboratory within 15 min in plastic bag purchased on site, and were cleaned by using potable water. Filleting was done in sterile conditions. Two fish fillets (with skin) portions of 200 g of weight and 0.5 to 0.8 cm of thickness and were each subsequently subdivided into 2 portions of 100 g for the storage trials. Moreover, 2 g of fish flesh were crushed and suspended in 2 ml of sterile distilled water. The suspension was homogenized by vigorous stirring using a vortex, decanted for 1 min., and used for measuring the pH of fishes (Eutech instrument, 219208, Singapur).

### **2.3 Quantitative and qualitative assessment of fishes spoilage bacteria**

Twenty five (25) g of fish flesh from the different fishes were suspended in 225 ml of sterile saline water (NaCl, 8 g/l) in a sterile sealed plastic bag (BA 6141/CLR, Seward, UK) and crushed using a stomacher (Blender 80, Seward Laboratory, London UK) for 2 min. The resulting homogenized solution was serially diluted (1/10) in saline water (NaCl, 8 g/l), and 0.1 ml of each dilution was spread on PCA supplemented with 0.5% NaCl for total viable counts, and on the four following selective agar media: MRS supplemented with [cycloheximide (50 mg/l), and polymyxin b (100 UI)] (Davidson and Cronin, 1993), Baird-Parker, Rose Gal Bcig (Biokar Diagnostics, France) and Hektoen (Scharlau Chemie, Spain) agar used for respectively isolation of lactic acid bacteria, *Staphylococci* (black colonies with



halo), *Escherichia coli* (purple colonies) and Enterobacteriaceae strains. Plates were incubated for 48 h at 30°C (for total microbial counts and lactic acid bacteria counts) and 24 h at 37°C for Enterobacteriaceae, *Staphylococcus sp* and *Escherichia coli* strains counts. On Baird-Parker, some beige colonies were found as abundant as the black colonies (*Staphylococcus sp* strains); therefore they were enumerated in addition to the black colonies and further characterized. A determination of the main bacterial groups in each different selective medium was performed later. Twenty to 30 colonies isolated from the same sample of sumpat grunt fish were randomly selected and purified for characterization. The strains were examined microscopically for cellular morphology and Gram stain phenotype determined by KOH method (Buck 1982). Catalase activity was carried out by exposure to 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fermentation of different sugars was determined by using API (Biomérieux) 50 CH (Lactic acid bacteria) and API 20 E (Enterobacteriaceae). For Gram-positive cocci, the determination of coagulation was carried out by tube coagulase tests (Biokar, French) to assess the number of *Staphylococcus aureus* strains.

#### **2.4 Antibacterial solutions and treatment of fish fillets**

In preliminary assays solid sodium chloride was added to distilled water at concentration from 0.08 to 0.14 g/ml, and these solutions were tested for controlling growth of spoilage bacteria in fishes for determining the antibacterial effect by salt. In the second series of assays the salt (sodium chloride) was added in cell-free culture supernatants of the different lactic acid bacteria tested (CWBI-B28, CWBI-B1410, LMG 6890, and LMG 21688) at concentration of 0.14 g/ml. The pH of the different solutions was adjusted to 6 with NaOH or HCl 0.1N. Antibacterial solutions were pasteurized by heat treatment (10 min. at 80°C) and chilled at 10°C for 2 h prior to use. One hundred milliliters of each solution were added to 100 g of fish fillets (1/1; wt/wt) in sterile glass jars of 1 l of total volume, which were stored at 10°C for 22 days.

## **2.5 Sampling and bacterial flora load in treated fish fillets**

For accurate comparison of the effects of the different antibacterial solutions tested, the treated fish fillets came from the same fish sample justifying performing the storage trials on 100 g of fillets. Moreover, as storage trials were conducted for 22 days of fish incubation at 10°C, the sampling has been limited to 4 g of fish flesh at regular intervals (every 48 h). For that the jar containing the treated fish fillets were removed from the incubator (10°C), and shaken (Multi-shaker PSU20 Lab-4 You GmbH, Berlin Germany) for 1 min. for homogenization. The fillet was drained of the liquid in sterile conditions. A total of 4 g of fish flesh was removed from the fillets (at different points) in using a fine sterilized pair of scissors, and the fillets was immersed again in the preservative solution in the glass jar which was incubated at 10°C. The 4 g of fish flesh was suspended in 36 ml of sterile saline water (NaCl, 8 g/l) in a sterile bag. The solution was homogenized in using a stomacher for 1 min. and serially diluted (1/10) in sterile saline water. One hundred microliters of each dilution was smeared onto plate count agar supplemented with 0.5% NaCl. The plates were incubated aerobically at 30°C for 48 h for determination of the CFU. A level of 10<sup>6</sup> CFU/g was conducted as the end of storage (Guiraud 1998). Moreover, the evolution of spoilage enteric strains as well as lactic acid bacteria in fishes treated with salted neutralized culture supernatants of the bacteriocin producers were monitored by bacterial counts as described above on Hektoen (Enterobacteriaceae strains counts) and MRS supplemented with cycloheximide and polymixin B (Lactic acid bacteria strains counts) agar. Plating was performed in triplicate. The data presented in this study are average values from duplicate samples and two separate trials. The values shown are means ± standard deviations of the means.

## **2.6 Evaluation of the residual bactericidal activity in antibacterial solutions during storage trials**

The residual bactericidal activity by salted neutralized cell-free supernatants of the two tested bacteriocin-producing lactic acid bacteria strains used to prevent spoilage bacteria growth on fishes was determined at regular intervals (48 h) during the storage trials by adaptation of the well diffusion assay described by Barefoot and Klaenhammer (1983) in using *Listeria monocytogenes* (for salted CWBI-B28 cell-free supernatant) and *Pediococcus pentosaseus* (for salted CWBI-B1410 cell-free supernatant) as indicator strains. Molten agar was seeded with the appropriate indicator strain and dispensed to Petri dishes (20 ml per plate). Well approximately of 6.5 mm in diameter were bored in the agar. Five hundred microliters from antibacterial solutions containing the fishes were centrifuged at 12 000 x g (Eppendorf AG 22331, Hamburg, Germany). The supernatant was pasteurized by heating at 80°C for 10 min. Two-fold serial dilutions of these solutions were prepared in phosphate buffer (pH 6) and fifty microliters aliquots of the various dilutions were loaded into separate wells. Plates were incubated overnight at 37°C. The absolute antibacterial activity expressed as Arbitrary Units per milliliter (AU/ml) was defined as the reciprocal of the highest dilution showing definite inhibition area around the well. The residual bactericidal activity during the course of storage trials was expressed in percentage, in using the initial bactericidal activity as 100%.

## **3. RESULTS**

This study is aimed to evaluate the antibacterial effects of sodium chloride in combination with two different bacteriocin producing lactic acid bacteria in the perspective to develop an additional barrier to supplement sodium chloride for enhancing the bacterial quality of traditional fish products. The combination of the salt with the two bacteriocin producers as antimicrobial agents is performed by addition of sodium chloride with the neutralized

fermentation medium of the two bacteriocin producers as preservatives in fishes stored at 10°C.

### **3.1 *In vitro* antibacterial activity by tested lactic acid bacteria and level of microbial spoilage in fresh fishes**

In previous studies the bacteriocin-like activity by CWBI-B1410 and CWBI-B28 strains was found to decrease at late stationary phase of growth that occurred after 11 -12 h cultures incubation at 30°C (Diop *et al.* 2008<sub>a</sub>; Ghalfi 2006). Therefore the cultures of the different tested strains were stopped when the cultures entered in stationary phase of growth, after 10 h of incubation ( $10^{9-10}$  CFU/ml) at 30°C, for preparation of the antibacterial solutions. The residual antibacterial activity in the neutralized culture supernatants from the four LAB cultures have been tested in using different indicators strains from different genera including the tested bacteriocin producers and the two controls (Table 1).

**Table 1:** Residual antibacterial activity of neutralized (pH 6) cell-free supernatants from four tested lactic acid bacteria strains cultures.

Indicators strains	Activity (x 10 <sup>3</sup> AU/ml)			
	CWBI-B1410	CWBI-B28	LMG6890	LMG21688
1. <i>Bacillus coagulans</i> LMG 6326	5.12	-	-	-
2. <i>Bacillus sphaericus</i> CWBI-B1432	1.28	0.16	-	-
3. CWBI-B1410	-	-	-	-
4. CWBI-B28	0.32	-	-	-
5. <i>Listeria monocytogenes</i>	0.16	5.120	-	-
6. LMG 21688	0.16	0.16	-	-
7. LMG 6890	0.16	-	-	-
8. <i>Pediococcus pentosaseus</i>	1.28	-	-	-
9. <i>Weissella confusa</i> CWBI-B1432	1.28	0.640	-	-

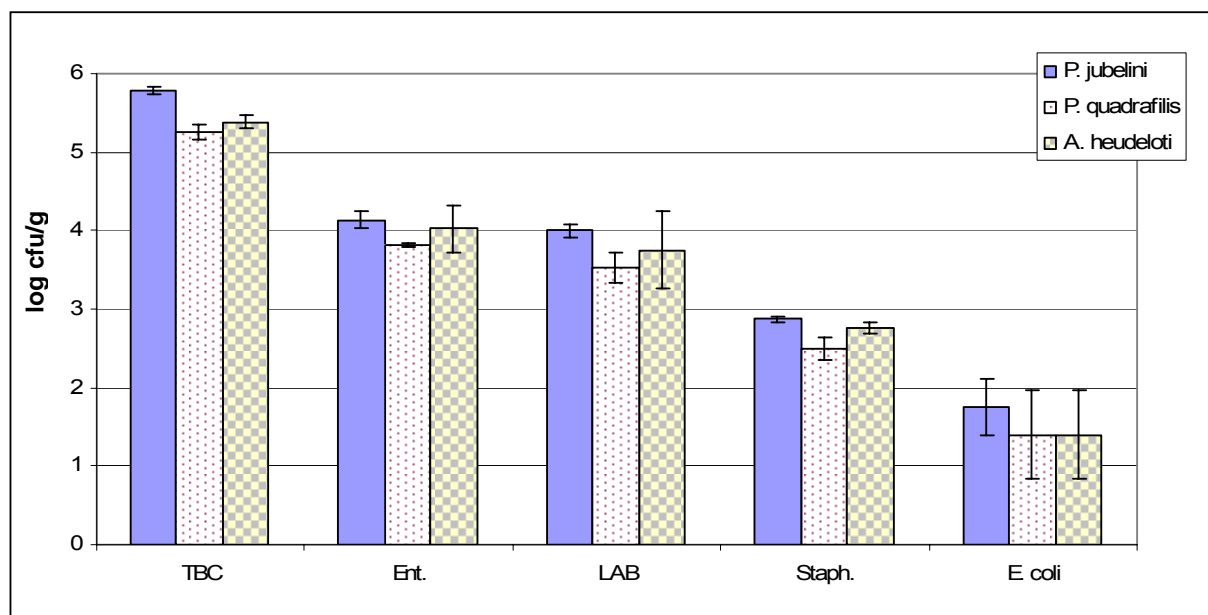
CWBI-B1410: *Lc lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1410; CWBI-B28: *Lb curvatus* CWBI-B28; LMG 6890: *Lc lactis* subsp. *lactis* LMG 6890; LMG 21688: *Lb curvatus* LMG 21688

-: no inhibitory activity

Only CWBI-B1410 and CWBI-B28 showed a presence of residual antibacterial activity by neutralized culture supernatants. CWBI-B1410 strain showed a broad spectrum of activity with high activity against *Bacillus* sp strains. CWBI-B28 demonstrated a high antilisteria activity in comparison to CWBI-B1410.

The fat content of *P. jubelini*, *P. quadrafilis*, and *A. heudeloti*, was determined respectively at 2.8, 3.28, and 17.75 % in the dried matter of fishes flesh. Moreover the pH of raw *P. jubelini* fillets (6.08) was lower to those of *P. quadrafilis* (7.05) and *A. heudeloti* (6.88). The total viable microbial counts of the raw fillets from fishes reached 5.7 log cfu/g. The presumptive Enteric, lactic acid bacteria, *Staphylococci* and *Escherichia coli* strains were estimated respectively at  $10^4$ ,  $10^{3-4}$ ,  $10^{2-3}$ , and  $10^{1-2}$  CFU/g (Figure 1 and Table 2). Moreover, some *Bacillus sp* strains have been isolated from fishes (Table 2). The neutralized culture supernatant of CWBI-B1410 and CWBI-B28 showed antibacterial activity against respectively 75% and 52% of the Gram-positive spoilage bacteria isolated from fishes (Table 2). Any of the Gram negative strains isolated from fishes (table 2) was sensitive to the residual antibacterial activity by neutralized supernatants of CWBI-B1410 and CWBI-B28 strains.

**Figure 1:** Bacterial counts of raw filleted fishes from artisanal production in Senegal.



TBC: total bacterial counts; Ent. : enteric strains); LAB: lactic acid bacteria strains; Staph.: [*Staphylococcus sp*+ beige colonies (*Bacillus sp*)]; E. coli: *Escherichia coli* strains).

**Table 2:** Characterization of spoilage bacteria isolated from filleted sumpat grunt fishes purchased from a local market.

Media of isolation	Number of strains	Shape		Gram stain		Catalase activity		Bacterial speciation
		rod	cocci	+	-	+	-	
<b>Hektoen</b>	30	27	3	9	21	22	8	<i>Proteus sp.</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Aeromonas hydrophyla</i> , <i>Bacillus sp</i> **
<b>Baird-Parker</b>	25	9	16*	25	0	25	0	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> **, <i>Bacillus sp</i> **
<b>Rose Gal Bcig</b>	10	10	0	0	10	10	0	<i>Escherichia coli</i>
<b>MRS</b>	27	16	11	27	0	3	24	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Carnobacterium sp.</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
<b>Total</b>	<b>92</b>	<b>62</b>	<b>30</b>	<b>61</b>	<b>31</b>	<b>60</b>	<b>32</b>	

\*Five coagulase positive *Staphylococci* strains were detected of the 16 strains screened

\*\*Some of these strains have been characterized by 16S rDNA as described by Diop et al. (2007<sub>b</sub>) and registered in Genbank Database under accession numbers EU128488 (*Bacillus sphaericus* CWBI-B1434), and EU128487 (*Staphylococcus epidermis* CWBI-B1433).

### **3.2 Antibacterial effects of lactic acid bacteria culture supernatants in combination with sodium chloride on fishes**

In a first time, an evaluation of the antibacterial effects by sodium chloride preparations on fishes stored at 10°C was undertaken. The total viable counts of *P. jubelini* added 0.08 and 0.12 g/ml NaCl distilled water remained under 10<sup>6</sup> CFU/g after respectively 3 and 6 storage days. In contrast, such preparations had any effect on the evolution of the spoilage bacteria on the more fat fishes (*P. quadrifilis* and *Arius heudeloti*). Total viable counts of *P. jubelini*, *P. quadrafilis*, and *A. heudeloti* treated with 0.14 g/ml NaCl distilled water, remained under 10<sup>6</sup> CFU/g for respectively 7.5, 5 and 3 storage days at 10°C (table 3). Therefore NaCl was added at concentration of 0.14 g/ml in tested lactic acid bacteria supernatants for use as hurdle to prevent spoilage bacteria growth on 10°C stored fishes.

**Table 3:** Total bacterial counts in *P. jubelini*, *P. quadrifilis* and *A. heudeloti* fishes immersed in salted distilled water, and stored at 10°C in Senegal.

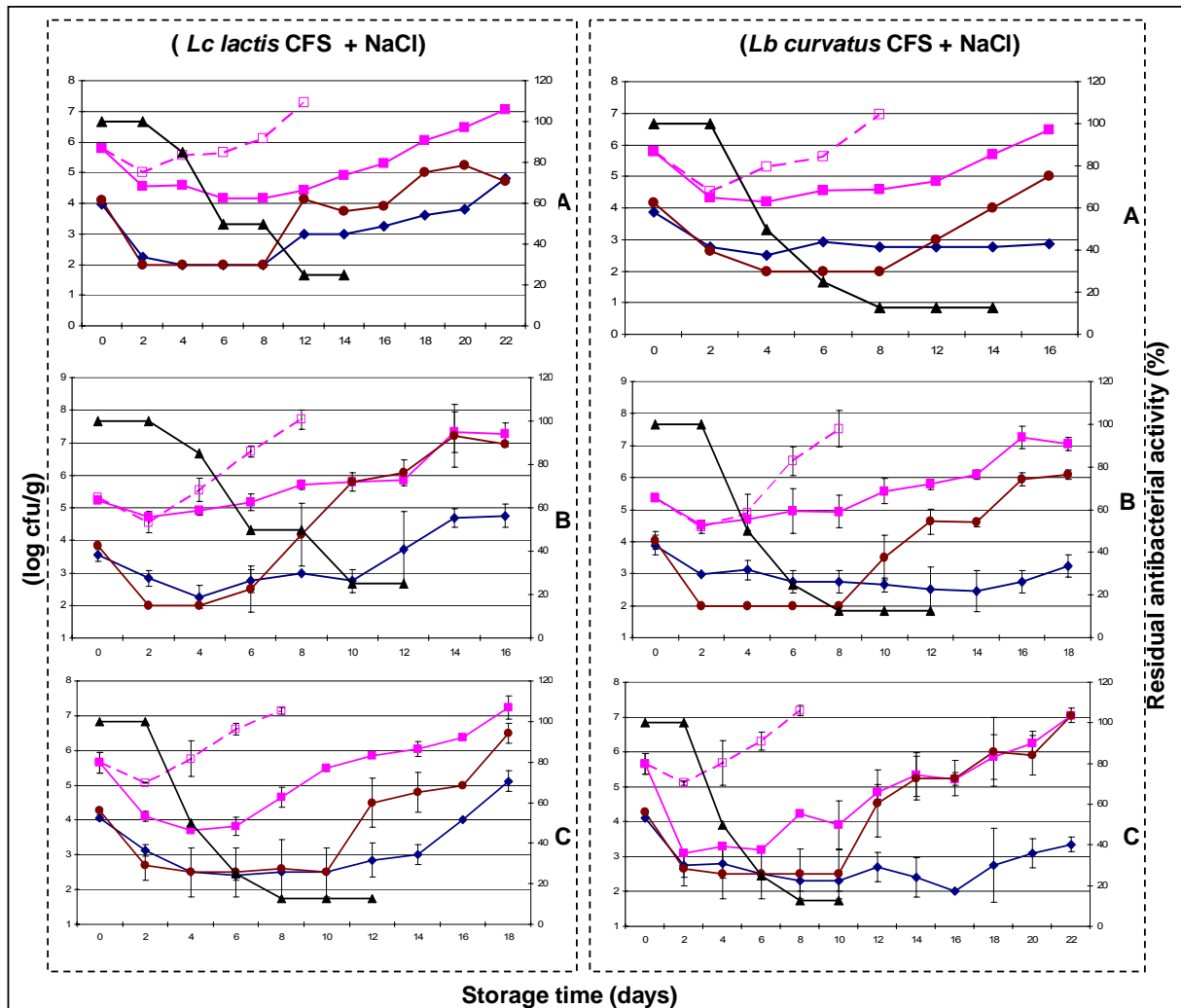
Fishes	NaCl	Bacterial counts (log cfu/g) during storage				
		Days				
	Concentration (g/ml)	0*	2	4	6	8
<i>P. jubelini</i>	0.08	5.70 ± 0.08	4.87 ± 0.2	6.40 ± 0.3	6.73 ± 0.5	7.20 ± 0.2
	0.12	5.70 ± 0.08	4.99 ± 0.09	5.06 ± 0.3	5.42 ± 0.2	6.30 ± 0.3
	0.14	5.70 ± 0.08	4.41 ± 0.29	5.18 ± 0.79	5.50 ± 0.42	6.2 ± 0.28
<i>P. quadrifilis</i>	0.14	5.30 ± 0.03	4.70 ± 0.3	5.60 ± 0.35	6.60 ± 0.1	7.60 ± 0.3
<i>A. heudeloti</i>	0.14	5.65 ± 0.1	4.98 ± 0.2	6.10 ± 0.4	6.50 ± 0.1	7.30 ± 0.1

\* Counts in raw fillets (before addition of salted (NaCl) solutions).

As shown in figure 2, the evolutions of spoilage bacteria in fishes treated with salted neutralized cell-free supernatants of LMG 6890 and LMG 21688 were similar to those observed in using salted distilled water as preservatives on fishes (table 3). When used salt combined with cell-free supernatant from CWBI-B28 or CWBI-B1410 cultures, as preservatives, the increase of bacteria number in fishes was delayed: the total viable microbial counts in fishes remained under 6 log CFU/g after 13 (figure 2 B) to 18 fishes storage days (figure 2). Moreover, presumptive enteric strains as well as presumptive lactic acid bacteria strains found predominant in raw fishes were stabilized at around 2 log CFU/g in treated fishes after 8 to 12 storage days. Salt combined with CWBI-B1410 cell-free culture supernatant showed a higher antibacterial effect on sumpat grunt fish, whereas salt combined with CWBI-B28 supernatant was more effective on *A. heudeloti*.

A decrease of the residual bactericidal activity in the antibacterial solutions was also noted during the storage trials. It was similar for the two tested salted supernatant of the two bacteriocin producers and were determined around 12-20 % of the initial activity after 12 storage days (figure 2).

Figure 2: Evolution of bacterial contamination of 10°C stored three fishes treated with neutralized cell-free culture supernatants (CFS) from *bac*<sup>+</sup> and *bac*<sup>-</sup> *Lc lactis* or *Lb curvatus* strains, in combination with salt (NaCl 0.14 g/ml), as preservatives.



*bac*<sup>+</sup>: bacteriocin producer strains (*Lc lactis* CWBI-B1410 or *Lb curvatus* CWBI-B28); *bac*<sup>-</sup>: non bacteriocin producer (*Lc lactis* LMG 6890 or *Lb curvatus* LMG 21688).

A: *P. jubelini*; B: *P. quadrifilis*; C: *A. heudeloti*

Total bacterial counts [□: filets treated with (*bac*<sup>-</sup> strain + NaCl); ■: filets treated with (*bac*<sup>+</sup> strain + NaCl)]

Enteric bacteria counts (●), lactic acid bacteria counts (◆), residual bactericidal activity in preservative solutions (▲) of filets treated with the *bac*<sup>+</sup> strains CFS + NaCl.

#### 4. DISCUSSION

Sodium chloride is the main antimicrobial agent used as preservative in fish products to control the growth of the spoilage bacteria in traditionally handled fish products in Senegal, which are later subjected to a process of drying for extending the storage. Several factors affect the effectiveness of salt (NaCl) as preservative in fish. These include the purity of the



salt, the thickness, freshness and fat content of fish, the temperature and the care and cleanliness used in handling the fish.

The results of this study showed a high level of microbial spoilage (5.7 log CFU/g) in raw fish fillets, which was barely with the limit of acceptability defined for these products ( $10^6$  log CFU/g). These levels were similar to those reported by Diei-Ouadi (2005). Quantitative and qualitative characterization of the spoilage bacteria isolated from fishes allowed a presumption of slightly higher prevalence of enteric strains with important accompaniment Gram-positive positive spoilage bacteria such as lactic acid bacteria and *Bacillus sp* strains. The majority of Gram positive spoilage strains isolated from fishes was sensitive to antibacterial activity of CWBI-B1410 or CWBIB28 neutralized cell-free culture supernatant, contrary to Gram-negative strains, which are generally known to be not sensitive to antibacterial activity of LAB bacteriocins. The addition of sodium chloride preparation, even at 0.14 g/ml, showed low efficacy to control the growth of bacteria in such products particularly in the fatty fish (*A. heudeloti*). The use of salt (NaCl 0.14 g/ml) combined with neutralized cell-free supernatants from the tested bacteriocin producers (CWBI-B28 or CWBI-B1410) on fishes delayed the increase of bacteria number (bacteriostatic effect) in fishes, that remained under the acceptable limit ( $10^6$  CFU/g) after 13 to 18 storage days at 10°C, whereas bacterial counts in fillets treated with salt in combination with neutralized cell-free supernatants of the controls (without bactericidal activity) were over  $10^6$  CFU/g after 4 (fat fish) to 7 (lean fish) storage days at 10°C.

Because CWBI-B1410 and CWBI-B28 were found to produce bacteriocin in previous studies (Diop *et al.* 2008<sub>a</sub>; Ghalfi *et al.* 2006), and they demonstrated antibacterial activity against different spoilage bacteria isolated from fishes; the bacteriostatic effects (delay of the increase of bacteria) observed on the different fishes can be explained by bacteriocins released from these strains. Therefore the results of this study suggest that the use of *Lactococcus*

*lactis* CWBI-B1410 or *Lacobacillus curvatus* CWBI-B28 cell-free supernatants in combination with sodium chloride as preservatives on fish can be a suitable and natural strategy of controlling the spoilage bacteria growth on products from artisanal fishery in Senegal during storage at 10°C.

The decrease of the residual bactericidal activity in the antibacterial solutions from the two bacteriocin producers during storage of fishes can result from the degradation of the bacteriocins by the proteolytic enzymes naturally present in food (Kouakou *et al.* 2008). Moreover, CWBI-B1410 cell-free supernatant combined with salt was more effective on the lean fish (*P. jubelini*) than on the fat fish (*A. heudeloti*), contrary to CWBI-B28 cell-free supernatant combined with salt. These differences can result the effects of the pH of fishes on the activity of the bacteriocins produced by the different strains and from difference of interaction by the bacteriocins produced by the two bacteria with components of fishes that can make the bacteriocins inactive or available to inhibit sensitive spoilage bacteria strains (Aasen *et al.* 2003; Henning *et al.* 1986, Jung *et al.* 1992). In this purpose, nisin, produced by different *Lactococcus lactis* strains like CWBI-B1410 strain, is reported to interact strongly with phospholipids, which limits its activity in meat with high fat content products (Henning 1986).

## **5. CONCLUSION**

This study showed a high level of bacterial spoilage in products from artisanal fishery in Senegal with a higher prevalence of Enterobacteriaceae and lactic acid bacteria spoilage microorganisms. The use of combination of salt with bactericidal cell-free supernatants from CWBI-B1410 and CWBI-B28 strains, as preservatives, prevent the increase of bacteria number (bacteriostatic effects) on fishes over the acceptable limit ( $10^6$  CFU/g) after 13 to 18 storage days at 10°C, whereas this level was reached early, after 4 (fat fish) to 7 (lean fish) storage days, in controls treaded with salt. These results suggest that this technology can be a

suitable strategy for improving storage of fish from artisanal production in Senegal. Moreover, it could be used as preliminary treatment to enhance the control of spoilage bacteria in the products before the drying process performed for stabilization of these products. It has the advantage to use less salt (NaCl) in comparison to traditional process; its cost is economically reasonable, and it uses salt (NaCl) in combination with natural antibacterial compounds instead of chemical preservatives.

## 6. REFERENCES

1. Aasen IM, Markussen S, Moretro T, Katla T, Axellsson L, and Naterstad K. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int J Food Microbiol* 2003; 87:35-43.
2. Al-Dagal MM and Bazarra WA. Extension of shelf-life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. *J Food Prot* 1999; 62: 51-56.
3. Aoki T, Yamashita T, and Ueno R. Distribution of cathepsins in red and white muscles among fish species. *Fish Sci* 2000; 66: 776-782.
4. Barefoot SF and Klaenhammer TR. Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1983; **45** (6) p. 1808-1815.
5. Boyd LC, Green DP, Lepors LA. Quality changes of pond raised hybrid striped bass during chillpack and refrigerated storage. *J Food Sci* 1992; 57 59-62.
6. Buck JD. Non-staining (KOH) methods for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44(4):992-993.
7. Davidson CM and Cronin F. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Appl Microbiol* 1973; 26:339-440.
8. Diei-Ouadi Y. Minced sardinella fillets in fish-landing and marketing sites in Senegal. In *FAO fisheries Circular* 2005; No 999: FIIU/C999 (EN).

9. Diop MB, Dubois-Dauphin R, Dortu C, Tine E, Destain J, Thonart P. (2008a) Detection and in vitro characterization of bacteriocin-like inhibitory activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Senegalese local food products (submitted Afr J Agric Res, Mai 2008)
10. Diop MB, Dubois-Dauphin R, Tine E, Destain J, and Thonart P. (2008b) Antibacterial effects by *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 with glucose supplementation to control growth of spoilage enteric bacteria on two fishes incubated at 30°C for fermentation in Senegal (submitted: Journal des Sciences pour l'Ingénieur Juin 2008)
11. DOPM (Direction des pêches maritimes). Résultats Généraux des pêches maritimes, Rapport 2004. Ministère de l'économie maritime & des transports maritimes internationaux, république du Sénégal.
12. Fellows P. Traditional foods processing for profits. In: P. Fellow editor. Meat, Fish and dairy products Chap 6. London, UK. Intermediate Technology Publication; 1997. p. 163-191.
13. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 1957; 226: 497-504.
14. Ghalfi H. Sélection et utilisation de bactéries lactiques productrices de bactériocines antilisteria comme bio-conservateur et caractérisation de trois bactériocines produites par *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28. PhD Thesis, Agricultural University of Gembloux, Belgium; 2006.
15. GRET (Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques), and CTA (Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale). In : Gret & CTA éditeur. Conserver et transformer le poisson. Responsables de lourdes pertes: des problèmes techniques et sanitaires. Le Point Sur, Paris ; 1993. p. 41-43.

16. Guiraud JP. Microbiologie alimentaire. In: Microbiologie des poissons et produits aquatiques. Dunod, Paris, FR ; 1998.
17. Henning S, Metz R, and Hammes WR. Studies on the mode of action of nisin to food products based on its mode of action. Int J Food Microbiol 1986; 3: 135-141.
18. Huss HH editor. Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fish. Tech. Pap. 348. FAO Rome Italy; 1995.
19. Infoconseil, Paoa. Etats des lieux de la transformation des produits halieutiques au Sénégal. Dakar Sénégal, GRET, ENDA GRAF, SNC Lavalin, Cintech, MAE, CDE, ACDI, MIA ; 2005, 42p.
20. Isekson I, Pasteur R, Drabkin V, Lapido M, Eizenberg E, Klinger I, Gelman A.. Prolonging shelf-life of carp by combined ionizing radiation and refrigeration. J Sci Food Agric 1996; 72: 353-358.
21. Jung D- S, Bodyfelt FW, Daeshel MA. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. J dairy Sci 1992; 75: 387-393.
22. Kouakou P, Ghalfi H, Destain J, Dubois-Dauphin R, Evard P, Thonart P. Enhancing the antilisterial effect of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 in pork meat and cocultures by limiting bacteriocin degradation. Meat Sci doi: 10.1016/J.meatsci.2008.02.015 (accepted manuscript).
23. Ladrat C., Verrez-Bagnis, Noël J. Fleurence J. In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L): effect of cathepsins B, D and L. Food chem 2003; 81: 517-525.
24. Toledo-Flores LJ and Zall RR. Methods for extending the storage life of the fresh tropical fish. In Flick GJ, Roy JR, and Martin E. editors. Advances in seafood biochemistry. Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa; 1992. p. 233-243.



## **PREAMBULE A LA PRESENTATION DES RESULTATS GENERAUX, AUX DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**

Le **chapitre 8** présente l'ensemble des résultats (détection des souches productrices de bactériocines, caractérisation des souches et des bactériocines et mise en oeuvre des souches lactiques productrices de bactériocines sélectionnées sur poissons). Les séquences des prépeptides précurseurs de bactériocine des souches bactériennes isolées, les résultats de la mise en évidence de l'expression du gène codant pour la nisine chez la souche CWBI-B1410 et l'évolution de la flore mésophile totale de filets de poissons traités avec du SCN de souches bac<sup>+</sup> et bac<sup>-</sup> salé ou non salé y ont été présentés. Il présente également l'évolution des flores contaminantes mésophile (température optimale de croissance de 30°C) et psychrotrophe (température optimale de croissance de 20°C) ainsi que le pH des filets des poissons traités avec de l'eau ou du SCN des souches bac<sup>+</sup> salés (NaCl 0,14 g/ml) et conservés à 10°C. Le **chapitre 9** présente les discussions générales de l'ensemble des résultats ainsi que les conclusions et les perspectives de cette étude.





## CHAPITRE 8: PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

Les principaux résultats obtenus ont été présentés dans les sous-chapîtres suivants.

### 1. ISOLEMENT DE SOUCHES BACTERIENNES LACTIQUES A ACTIVITE INHIBITRICE DE TYPE BACTERICIDE

Un total de 220 souches bactériennes lactiques a été testé pour la détection d'une production de bactériocine. Elles ont été sélectionnées de manière aléatoire parmi 340 souches bactériennes lactiques isolées à partir de 32 produits alimentaires fermentés artisanaux, qui ont montré une activité antibactérienne (par la technique de la double couche) contre une ou plusieurs bactéries indicatrices incluant des souches pathogéniques d'origine alimentaire.

Douze souches présentant une activité inhibitrice de type bactériocine [résistance à la catalase, sensibilité aux protéases, et thermo-résistance (121°C pendant 10 min.)] dans le surnageant de culture sans cellule neutralisé, ont été détectées au sein des 220 souches lactiques testées par la technique de diffusion.

Il faut remarquer que les premiers essais d'isolement de souches bac+ avaient été essentiellement focalisés sur des produits de la pêche fermentés traditionnellement salés et séchés. Une faible prévalence des bactéries lactiques ( $10^{2-3}$  ufc/g) a été notée dans ces produits. Après plusieurs essais infructueux, la recherche a été étendue sur du poisson frais, de la farine de mil fermentée et du lait fermenté, ces deux derniers produits jouant un rôle important dans les habitudes alimentaires locales.

Les douze souches isolées provenaient de quatre échantillons différents. Elles ont montré un profil de fermentation d'hydrates de carbone (API 50 CH) semblable, similaire à celui des souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (tableau 1).

**Table 1:** Origine et caractérisation biochimique des souches développant une activité inhibitrice de type bactériocine.

Nature des aliments	Echantillons	Prév. BL (ufc/g)	STDAB	SASCN	NSBac <sup>+</sup>	API 50 CHL Identification	Échant. SBac <sup>+</sup>	SBac <sup>+</sup> sélect.
Poissons fermentés	10	10 <sup>2-3</sup>	25	1	0	0	0	0
Poisson crus	6	10 <sup>3-4</sup>	35	4	3	<i>Lactococcus lactis</i> (93 %)	1	CWBI-B1426
Farine de mil	8	10 <sup>9</sup>	63	10	7	<i>Lactococcus lactis</i> (95 %)	1	CWBI-B1410
Lait fermenté	8	10 <sup>9</sup>	97	5	2	<i>Lactococcus lactis</i> (94 %) <i>Lactococcus lactis</i> (91%)	2	CWBI-B1427 CWBI-B1411
<b>Total</b>	32		220	20	12	<i>Lactococcus lactis</i>	4	4

*Prév. BL* : prévalence des bactéries lactiques

*STDAB*: nombre de souches lactiques testées pour la détection d'activité bactéricide

*SASCN*: nombre de souches lactiques développant une activité inhibitrice dans le surnageant de culture neutralisé

*NSBac<sup>+</sup>*: nombre de souches lactiques développant une activité bactéricide dans le surnageant de culture neutralisé

*Echant. Bac<sup>+</sup>*: nombre d'échantillons ayant mis en évidence des souches lactiques développant une activité bactéricide

*SBac<sup>+</sup> select.* : souches lactiques sélectionnées pour l'identification génétique par séquençage de l'ADNr 16S.

Quatre des souches positives isolées dénommées CWBI-B1410 isolée de farine de mil fermentée ; CWBI-B1411 isolée de lait fermenté ; CWBI-B1426 isolée de filet de sompat (*Podamysys jubelini*) cru ; et CWBI-B1427, isolée de lait fermenté, ont été caractérisées de manière plus précise par détermination de leur spectre d'inhibition contre une trentaine de souches indicatrices et par le séquençage du 16S ADNr.

## 2. CARACTERISATION GENETIQUE DES SOUCHES ISOLEES

CWBI-B1410, CWBI-B1426 et CWBI-B1427 ont montré un spectre d'inhibition similaire, plus large que celui de CWBI-B1411. Le séquençage du 16S ADNr a permis une discrimination des quatre isolats bac<sup>+</sup>. Les séquences du 16S ADNr des souches CWBI-B1410, CWBI-B1426 et CWBI-B1427 ont montré 99% de similarité avec celles de souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* alors que celles de la souche CWBI-B1411 sont plutôt similaires (99%) à celles de souches d'*Enterococcus faecium*.

L'identification de cette dernière par API 50 CH est différente de celle obtenue par séquençage du 16S ADNr. Compte tenu du faible pourcentage de similarité (91%) obtenu par API CH (explicable par le fait que le test API 50 CH ne soit pas bien indiqué pour une caractérisation sans ambiguïté des entérocoques), d'une part, du score de similarité avec les souches d'*Enterococcus faecium* (99%) par séquençage du 16S ADNr et de la morphologie ovoïde des cellules d'autre part, la priorité a été accordée à l'identification génétique. Par conséquent, les 4 souches ont été dénommées comme suit : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1410, *Enterococcus faecium* CWBI-B1411, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1426 et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1427.

Les séquences du 16S ADNr des souches de *Lc lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1410, de *Ec faecium* CWBI-B1411, de *Lc lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1426, et de *Lc lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1427 ont été enregistrées dans la banque de données internationales Genbank sous les numéros respectifs AY971748, AY971749, EF371002, et EF371003.

Une recherche de gènes codant pour des bactériocines de bactéries lactiques a été entreprise dans les quatre souches par méthodes PCR et séquençage en utilisant des amorces spécifiques ciblant les gènes codant pour la nisine, le prototype des bactériocines produites par *Lc lactis* subsp. *lactis* et des amorces spécifiques ciblant des gènes codant pour les entérocoques (A, B, et L50) produites par certaines souches d'*Enterococcus* sp.

### **3. CARACTERISATION GENETIQUE DES BACTERIOCINES DES SOUCHES ISOLEES**

Les gènes structuraux codant pour la nisine A, l'entérocoque B et la nisine Z ont été mis en évidence respectivement chez *Lc lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1410, *Ec faecium* CWBI-B1411 et *Lc lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1426 et *Lc lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1427.

Les séquences des gènes de bactériocines et celles des prépeptides précurseurs ont été enregistrées dans la banque de données Genbank sous les numéros (EF371000 et ABN45880), (EF371004 et ABN45881), (EU128491 et ABV64388) et (EU 128485 et ABV64387) pour

respectivement les souches CWBI-B1410, CWBI-B1411, CWBI-B1426 et CWBI-B1427. Les séquences des pré-peptides précurseurs de bactériocines n'ont pas montré de différence avec celles de la nisine A (CWBI-B1410), de la nisine Z (CWBI-B1426 et CWBI-B1427) et de l'entéroisine B (CWBI-B1411) disponibles dans les banques de données (figures 1 et 2).

	1	11	50
nisine A	M	↓	H
nisine Q	M		N
nisine Z	M		N
CWBI-B1410	---		H
CWBI-B1426	---		N
CWBI-B1427	---		N
			↑
	51	57	
nisine A	C	-	
nisine Q	C	-	
nisine Z	C	-	
CWBI-B1410	C	-	
CWBI-B1426	C	-	
CWBI-B1427	C	-	

**Figure 1** : Comparaison des séquences (acides aminés) des prépeptides précurseurs de bactériocines des trois souches (CWBI-B1410, CWBI-B1426 et CWBI-B1427) avec celles des prépeptides précurseurs de la nisine A (Gross and Morell, 1971), de la nisine Z (Mulders *et al.*, 1991) et de la nisine Q (Zendo *et al.*, 2003).

La substitution de la valine (V) des précurseurs des nisines (A, Z et Q) en leucine (L) au niveau des précurseurs des bactériocines des isolats bac<sup>+</sup> (position 11) est due à une substitution d'un G par un C au niveau de l'amorce nisin R utilisée pour les réactions PCR. La flèche à la position 50 indique la position de la différence entre la nisine A et la nisine Z (N : Asparagine ; H : histidine)

	1	50
T136	M	H
CWBI-B1411	--	H
	51	71
T136	G	N
CWBI-B1411	G	---

**Figure 2** : Comparaison des séquences (acides aminés) des prépeptides précurseurs de la bactériocine de la souche CWBI-B1411 avec celles du prépeptide précurseur de l'entéroisine B produit par la souche *Ec faecium* T136 (Causas *et al.*, 1997).

Certaines souches d'*Enterococcus* sp développent des activités hémolytiques et/ou sont la cause de diverses infections chez l'homme (Franz *et al.*, 1999 ; Giraffa *et al.*, 1997), justifiant la méfiance des autorités pour l'utilisation de telles souches comme bio-conservateurs dans les produits alimentaires. Par conséquent, la souche CWBI-B1411 a été d'emblée écartée.

Du fait de son large spectre d'inhibition et de son activité inhibitrice importante dans le surnageant de culture, la souche CWBI-B1410 a été sélectionnée pour une caractérisation plus précise de la substance antagoniste de type bactériocine qu'elle produit. Ceci a été réalisé par comparaison avec la nisine, le gène codant pour cette bactériocine ayant été détecté chez cette souche.

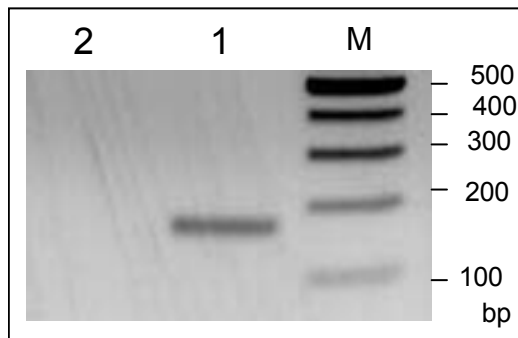
#### **4. PRODUCTIVITE ET CARACTERISATION DE LA BACTERIOCINE PRODUITE PAR LA SOUCHE CWBI-B1410**

Les résultats obtenus (**Chapitre 4**) ont montré que la substance inhibitrice de type bactériocine est produite essentiellement au cours de la phase de croissance exponentielle de CWBI-B1410 et en début de phase stationnaire. La production est plus importante à 30°C qu'à 37 ou 12°C. Elle est par ailleurs plus importante à pH 6,5. L'activité antibactérienne du surnageant de la culture est maximale en début phase stationnaire après 9 à 10 h d'incubation à 30°C, pour une charge bactérienne de  $10^6$  -  $10^7$  ufc/ml (**Chapitre 4, figure 5**).

L'expression du gène codant pour la nisine a été mise en évidence à partir d'une culture de CWBI-B1410 en fin de phase exponentielle. L'ADNc a été d'abord synthétisé par RT-PCR sur de l'ARN total extrait de la culture de CWBI-B1410. Une réaction PCR a été ensuite réalisée sur l'ADNc en utilisant la paire d'amorces spécifiques NisinF/Nisin R ciblant des séquences du gène structural codant pour la nisine.

L'analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose a permis de détecter un fragment d'ADN d'environ 170 pb, similaire au gène structural de la nisine détectée par PCR

en utilisant l'ADN de CWBI-B1410 tandis qu'aucun produit PCR n'a été obtenu en utilisant de l'ARN total extrait comme cible (figure 3).



**Figure 3 :** Analyse sur gel d'agarose des produits PCR obtenus en utilisant les paires d'amorces NisinF/NisinR sur de ADNc et l'ARN total obtenus à partir de cultures bactéricides de CWBI-B1410.

*M : marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder 100 pb) ; 1 : ADNc de CWBI-B1410 ; 2 : ARN total (control de la pureté [(sans ADN)].*

Ces résultats montrent que comme requis pour la synthèse de la nisine classique, le gène structural de la nisine détecté chez la souche CWBI-B1410 est transcrit en ARNm au cours de la croissance de cette dernière.

De plus, la solution bactéricide obtenue à partir de cette culture a montré beaucoup de similarités avec une solution de nisine commerciale: mêmes effets inhibiteurs contre une dizaine de souches indicatrices utilisées comme cibles, mêmes profils de sensibilité aux enzymes protéolytiques, et même temps de rétention par séparation RP-HPLC sur colonne C<sub>18</sub> (TR = 31,5 min.). L'analyse du spectre de masse d'une infusion bactéricide de CWBI-B1410 semi-purifiée par séparation HPLC-RP sur colonne C<sub>18</sub> (TR = 31,5 min.), obtenu en utilisant la technique MALDI-TOF (4700 Proteomic Analyser, Applied Biosystems), a montré trois composés prédominants, de masse moléculaire de 3364.96, 3381.58 et 3347.87 Da (**Chapitre 4, figure 7**). Un de ces composés a une masse molaire de 3347,87 Da, identique à la masse théorique de la nisine (C<sub>143</sub>H<sub>228</sub>N<sub>42</sub>O<sub>37</sub>S<sub>7</sub>) commerciale (Handary Bio-engineering BV, Oosterhout, Netherlands) et est également très proche de la masse moléculaire de la nisine (3346.39 Da) publiée par Megrhous *et al.* (1997). L'ensemble de ces résultats indique une production de nisine par la souche CWBI-B1410.

A l'issue de cette première partie du travail, il a été envisagé d'utiliser la souche *Lc lactis* CWBI-B1410 de même qu'une autre souche productrice de bactériocines de type curvaciline, *Lb curvatus* CWBI-B28, provenant de la collection du CWBI de la FUSAGx, comme barrière additionnelle au sel pour améliorer la conservation des produits de la pêche artisanale au Sénégal.

## **5. NIVEAU DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE DE POISSONS DE PRODUCTION ARTISANALE AU SENEGAL**

Trois types de poissons parmi les plus fréquents dans les débarquements de la pêche artisanale ont été utilisés pour les essais. Ils ont été choisis pour leur teneur en lipides diversifiée : 2,8% pour le sompat (*Podamasyus jubelini*), 3,2% pour le capitaine (*Polydactylus quadrifilis*) et 17,75% pour le mâchoiron (*Arius heudeloti*) dans la matière sèche (analysée selon la méthode de Folch).

La flore mésophile totale dans les filets crus de ces différents poissons prélevés dans deux marchés locaux de Dakar atteignait 5,7 log UFC/g. Une évaluation des flores spécifiques sur milieux sélectifs tels que Hektoen enteric agar (isolation d'Entérobactéries), MRS (isolation de bactéries lactiques), Baird Parker (isolation de *Staphylococcus* sp.) et Rose Gal Bcig (isolation de *Escherichia coli*) montre des résultats similaires pour les trois types de poissons :  $10^4$  ufc/g sur Hektoen,  $10^{3-4}$  ufc/g sur MRS,  $10^{2-3}$  sur Baird Parker, et  $10^{1-2}$  sur Rose gal Bcig.

Sur près de 30 colonies isolées à partir de chair de sompat, sur milieu Hektoen, 21 souches Gram-négatives ont été identifiées et quelques *Bacillus* sp. Parmi les principales espèces d'entérobactéries caractérisées par API 20E figurent des souches de *Proteus* sp., *Shewanella putrefaciens* et *Aeromonas hydrophyla*.

Une vingtaine de souches Gram-positives sous forme de coques isolées sur Baird Parker, à partir de chair de sompat a été testée pour leur activité coagulase : 5 souches positives ont été détectées. Par ailleurs, sur Baird Parker beaucoup de colonies beiges ont été détectées.

Quelques unes de ces souches ont été isolées et caractérisées par les méthodes traditionnelles (Gram-positives, bacilles et catalase +) et par séquençage du 16S ADNr pour confirmer leur appartenance au groupe *Bacillus* sp. La souche *Bacillus sphaericus* CWBI-1434, isolée des filets de poissons crus a été enregistrée dans la banque de données Genbank sous le numéro EU128488.

Les souches bactériennes lactiques contaminantes isolées du sompat sont essentiellement des souches de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus coprophilus* et *Lactobacillus brevis*.

Sur 65 souches de bactéries Gram-positives isolées du sompat de manière aléatoire, 49 se sont révélées sensibles à l'activité inhibitrice *in vitro* (test de diffusion) du SCN de CWBI-B1410 tandis que celui de CWBI-B28 inhibait la croissance de 32 souches bactériennes. Aucune des souches Gram-négatives isolées du poisson cru n'a été sensible à l'activité inhibitrice de ces solutions.

Ces deux souches bactéricides, en combinaison avec du NaCl, ont été testées pour empêcher la prolifération de la flore de contamination dans les poissons par deux méthodes : ajout de bactéries lactiques productrices de bactériocines et ajout de solutions bactéricides issues de culture des souches bactériennes productrices de bactériocine.

## **6. EFFETS ANTIBACTERIENS DE *LC LACTIS* CWBI-B1410 AVEC ADDITION DE GLUCOSE SUR POISSONS FERMENTES AU SENEGAL**

Les résultats obtenus (**Chapitre 5**) ont montré que la conservation des poissons à 30°C dans des conditions similaires à celles utilisées dans la transformation artisanale au Sénégal entraîne une prolifération rapide des entérobactéries (flore contaminante spécifique). Le niveau de la contamination des poissons par ces bactéries atteint  $10^{9-10}$  UFC/g en moins de 23 h, avec une prédominance de *Proteus* sp. (*Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*). De plus quelques souches de *Bacillus* sp. ont été détectées parmi les souches bactériennes contaminantes isolées de poissons dégradés (putrifiants), conservés à 30°C (**Chapitre 5**). Les



séquences du 16S ADNr des souches *Proteus mirabilis* CWBI-B1425 et *Bacillus* sp. CWBI-B1432, isolées de sompat putrescent ont été enregistrées sous les numéros respectifs EF 371001 et EU128486.

Lorsque les poissons ont été inoculés avec CWBI-B1410 avec ajout de glucose (1%), on observe une baisse du niveau de la contamination bactérienne (flore entérique) de 4 log UFC/g chez le sompat et 2 log UFC/g chez le capitaine, comparé au niveau de la contamination bactérienne des filets conservés à 30°C sans aucun traitement, suite à l'acidification des poissons par la souche CWBI-B1410 (**Chapitre 5, figure 2**).

L'apport externe de glucose entraîne également une importante production *in situ* de bactériocine par CWBI-B1410. L'activité antibactérienne de type bactériocine résiduelle détectée dans l'exudat des poissons est similaire à celle mesurée dans le SCN sur bouillon MRS à 30°C. Un tel niveau d'activité permettait une inhibition *in vitro* de la croissance de souches bactériennes pathogéniques comme *L. monocytogenes* et *B. cereus* (**Chapitres 3 et 4**).

Aucune activité inhibitrice de type bactériocine, ni de baisse de pH et d'effet inhibiteur de la croissance de la flore contaminante n'a été observée sur les filets inoculés à l'aide de CWBI-B1410 sans addition de glucose.

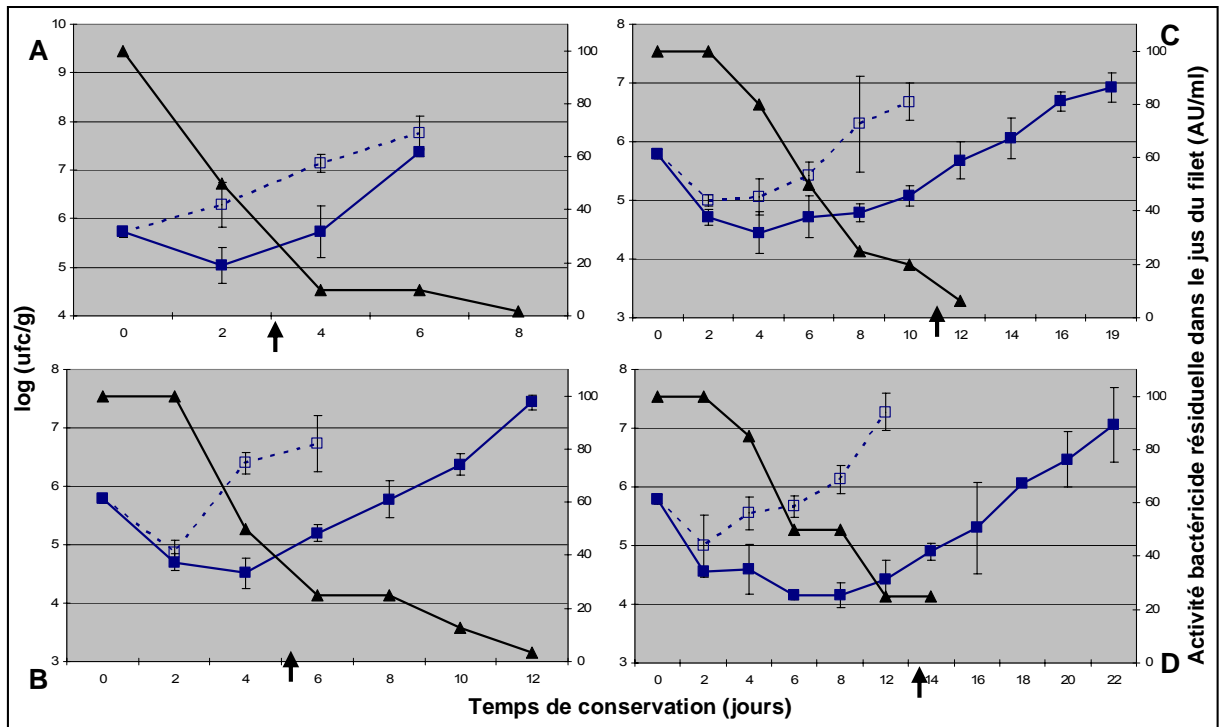
## **7. EFFETS ANTIBACTERIENS DE SCN BACTERICIDES ISSUS DE CWBI-B1410 ET CWBI-B28, EN PRESENCE DE NaCl SUR POISSONS AU SENEGAL**

Les essais ont été réalisés à 10°C compte tenu de l'importance du facteur température dans le contrôle de la croissance des bactéries, cette température étant par ailleurs la plus basse dans les installations disponibles. Ils ont consisté à ajouter des SCN (pH 6) issus de cultures de CWBI-B1410 et CWBI-B28, en combinaison avec NaCl à des concentrations variant entre 0 et 0.14 g/ml. Les effets antibactériens des solutions testées ont été évalués par suivi de la flore totale, fixant une limite de 10<sup>6</sup> UFC/g comme la fin de la durée de conservation.

L'évolution de la flore dans les filets traités comme décrit précédemment a été comparée à celle de filets traités avec des SCN de LMG 6890 ou LMG 21688 (bac-) salés, utilisés comme contrôles, et d'une solution d'eau distillée salée supplémentée de sels de benzoate de sodium et sorbate de potassium, chacun en concentration de 0,5 mg/ml.

De plus, une évaluation de l'évolution des entérobactéries (Hektoen) et des bactéries lactiques (MRS supplémenté de polymixine B 100 UI et cycloheximide 50 mg/l) (Davidson and Cronin, 1973) a été aussi réalisée. L'évolution de l'activité bactéricide résiduelle dans les solutions de préservation à base de SCN de souches productrices de bactériocine a été également suivie par la technique de dilution critique en utilisant les souches *P. pentosaseus* (pour la souche CWBI-B1410) et la souche *Listeria monocytogenes* (pour la souche CWBI-B28), comme souches indicatrices.

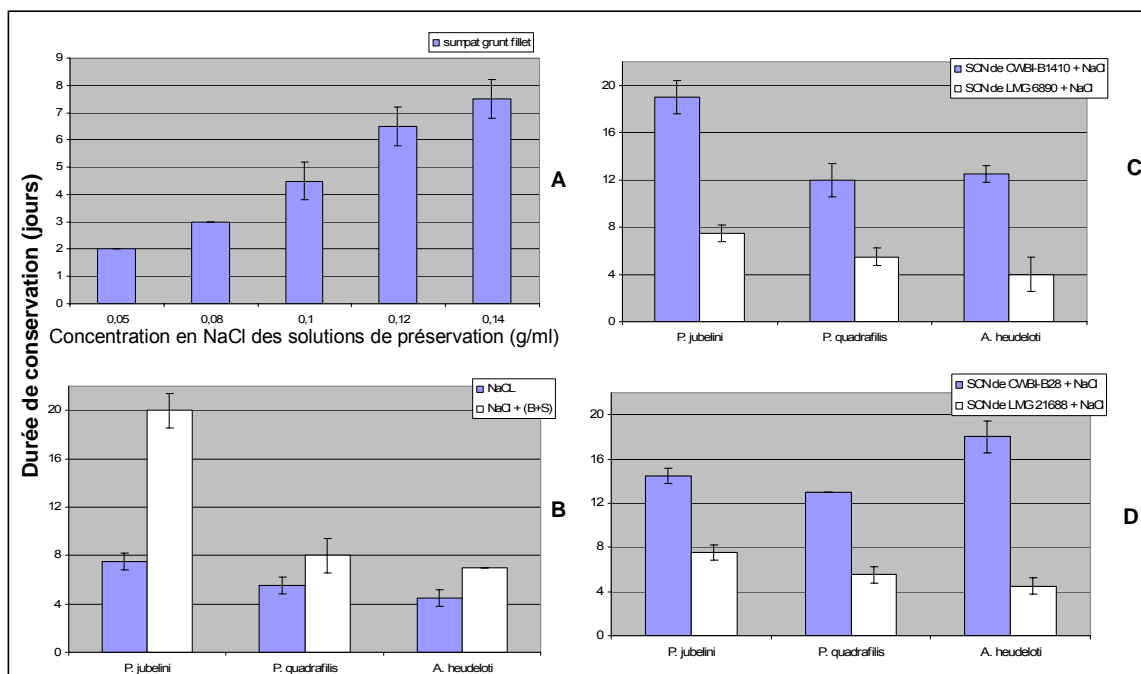
La combinaison du SCN avec du NaCl en concentration de 14% (m/v) améliore la stabilité de l'activité antibactérienne résiduelle *in situ* des SCN issues des souches bac+. Il s'en suit un meilleur contrôle de la croissance de la flore contaminante totale dans les préparations des poissons et une extension de leurs durées de conservation variant de 7 à 13 jours selon le type de poisson et la souche bactéricide utilisée (figures 4 et 5). Le SCN de CWBI-B1410 salé est moins efficace que celui de CWBI-B28 salé sur les poissons de teneur en lipides les plus élevés. Les effets antibactériens des SCN bac+ salées sont par ailleurs plus importants que ceux de la solution de NaCl supplémentée de benzoate de sodium et de sorbate de potassium sur les deux poissons de teneur en lipides supérieure à 3% (figure 5).



**Figure 4** : Evolution de la flore des filets de sumpat additionnés de SCN de LMG6890 (□) et CWBI-B1410 (■) salé ou non salé et incubés à 10°C, et de l'activité antibactérienne résiduelle du surnageant du jus de poisson traité avec le SCN de CWBI-B1410 avec ou sans NaCl (▲).

La concentration en NaCl est de 0 g/ml (A), 0,08 g/ml (B) ; 0,12 g/ml (C) et 0,14 g/ml (D).

Les flèches indiquent la reprise de la croissance de la flore dans les filets traités avec le SCN bactéricide salé ou non salé.



**Figure 5** : Durée de conservation des filets de *P. jubelini*, *P. quadrafilis* et *A. heudeloti* additionnés d'eau salée (A), d'eau salée (NaCl) supplémentée de sels de benzoate et de sorbate (0.5 mg/ml chacun) (B), de SCN de *Lc lactis* salé (C) et de SCN de *Lb curvatus* salé (D) et incubés à 10°C.

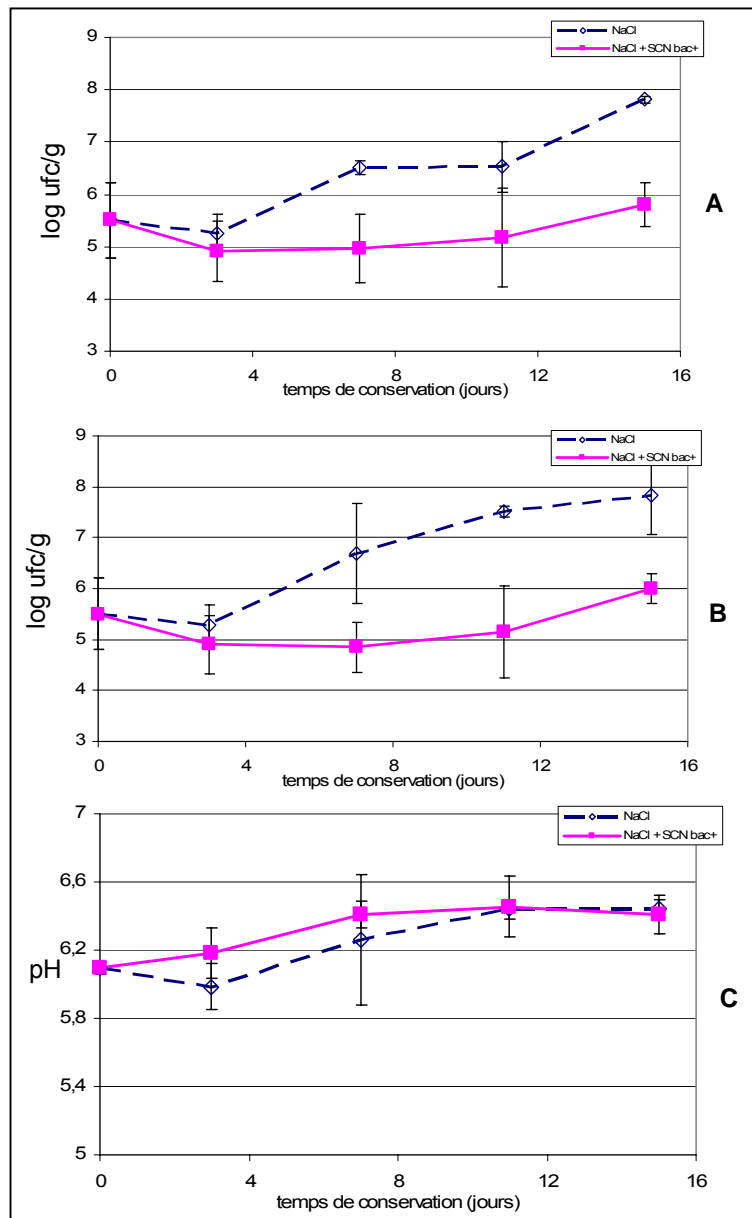
B, C et D : la concentration en NaCl est de 0,14 g/ml dans les solutions de traitement; SCN: surnageant de culture neutralisé. LMG6890 et LMG21688: souches bac-; CWBI-B28 et CWBI-B1410 : souches bac+; (B + S) : (Benzoate + Sorbate). Une flore mésophile totale atteignant  $10^6$  ufc/g a été considérée comme la fin de la durée de la conservation.

Pour les filets traités avec du SCN de souches bac<sup>+</sup> et NaCl, la reprise de la croissance de la flore survient généralement lorsque l'activité antibactérienne résiduelle du jus de poisson traité est en dessous de 20%. La reprise de la croissance est plus précoce chez la flore entérique que la flore lactique (**chapitre 7, figure 2**).

Une caractérisation de souches bactériennes lactiques isolées des filets traités a été réalisée dans le but d'identifier des souches psychrotrophes et halophiles qui pourraient être intéressantes pour la fermentation de poisson à basse température, peu répandue au Sénégal. L'identification par API 50 CH a permis d'identifier 4 espèces de bactéries lactiques psychrotrophes associées avec la contamination ou utilisées comme ferment dans des produits de pêche élaborés pour de courtes durées de conservation : *Carnobacterium* sp., *Lactobacillus brevis*, *Brochothrix thermosphacta*, et *Weissella confusa*. Les séquences 16S ADNr des souches *Weissella confusa* CWBI-B1438 et *Carnobacterium divergens* CWBI-B1439, isolées des poissons, ont été enregistrées dans la banque de données Genbank sous les numéros EU 128489 et EU 128489.

Une comparaison de la croissance de la flore contaminante mésophile et psychrotrophe et le suivi de l'évolution du pH dans les poissons salés (NaCl 0,14 g/ml) et conservés à 10°C ont été entrepris. Les filets issus des poissons conditionnés artisanalement (achetés dans un marché local) ont été découpés en petits morceaux d'environ 1 g dans des conditions stériles, puis répartis dans des tubes falcon (de 50 ml de volume) stériles en raison de 10 g par tube pour faciliter ultérieurement les prélèvements. Dans chaque tube, 10 ml de d'eau salée (NaCl 0,14 g/ml), de SCN de CWBI-B1410 salé (NaCl 0,14 g/ml) ou de SCN de CWBI-B28 salé (NaCl 0,14 g/ml), préalablement pasteurisés (10 min. à 80°C) et refroidis à 10°C, ont été ajoutés dans le poisson, comme agents conservateurs. Les tubes ont été ensuite incubés à 10°C. Toutes les 96 h, pour chaque traitement, un falcon est retiré de l'incubateur. Leur contenu a été suspendu dans 80 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,85%) dans un sac

plastique (BA 6141/CLR, Seward, UK) stérile. La suspension a été homogénéisée au stomacher (Blender 80, Seward Laboratory, London UK) pendant 2 min et utilisée pour déterminer le niveau de la flore contaminante psychrotrophe (incubation des boîtes à 20°C) et mésophile (incubation des boîtes à 30°C) ainsi que le pH du poisson (Eutech instrument, 219208, Singapour). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 6.



**Figure 6** : Evolution de la flore contaminante mésophile (A) et psychrotrophe (B), et du pH (C) dans du poisson (sompat) additionnée de SCN de CWBI-B1410 salé (NaCl+ SCN bac+) et d'eau salée (NaCl), et conservé à 10°C.

*La concentration en NaCl dans les deux solutions de préservation est de 0,14 g/ml.*

Les bactéries psychrotrophes sont moins sensibles au traitement par le froid, comparées aux bactéries mésophiles. Elles croissent mieux que ces dernières dans le poisson traité avec de l'eau salée: leur niveau dans les poissons atteint environ 7 et 7,5 log UFC/g après respectivement 8 et 12 jours de conservation tandis que le nombre de bactéries mésophiles est de 6,5 log UFC/g (figures 6 A et B). Les évolutions des deux types de flore sont par contre identiques dans le poisson traité avec du SCN de CWBI-B1410 salé. On observe une inhibition (effet bactériostatique) de leur croissance : les deux types de flore sont maintenus en dessous de  $10^6$  UFC/g pendant 15 jours de conservation à 10°C. Des résultats similaires ont été obtenus en traitant les poissons avec du SCN de CWBI-B28 salé. Ces résultats montrent que l'inhibition de la croissance de la flore contaminante mésophile dans les poissons n'est pas liée uniquement à l'incubation des poissons à 10°C car la combinaison des effets antibactériens du NaCl et du SCN bactéricide des souches CWBI-B1410 et CWBI-B28 améliore également le contrôle de la croissance de la flore contaminante psychrotrophe plus résistante au traitement par le froid (10°C).

Le pH des poissons traités avec la solution d'eau salée ou le SCN de la souche bactérienne bac<sup>+</sup> salé augmente très légèrement (de 6 à 6,5 en 12 jours environ) au cours de la conservation à 10°C (figure 6C).

## **8. PRODUCTION DE BACTERIOCINE PAR CWBI-B1410 EN FERMENTEUR**

Des études de production de bactériocine par la souche CWBI-B1410 sur bouillon MRS à 30°C en fermenteur de 12 l (Biolafitte, France) à pH régulé à 6,5 de façon automatique, ont montré une activité inhibitrice maximale dans le surnageant de culture de  $5,12 \times 10^3$  AU/ml contre *P. pentosaseus* après 10 h d'incubation (début de phase stationnaire). L'activité baisse à  $3,480 \times 10^3$  AU/ml après 22 h d'incubation. Ces résultats indiquent une amélioration de la production de bactériocine par la souche CWBI-B1410 (d'un facteur de 4) rapport à la culture sur fiole (sans contrôle du pH ; chapitre 4).

## 9. ADSORPTION DE BACTERIOCINES

Un conditionnement des bactériocines dans le surnageant de la culture en fermenteur décrite précédemment, par adsorption aux débris de la membrane des cellules productrices (Yang *et al.*, 1992 ; Benkerroum *et al.*, 2002), a été entrepris. La culture de 22 h de la souche CWBI-B1410 a été pasteurisée par traitement thermique (70°C pendant 20 min.) pour inactiver les protéases présentes. La culture a été ensuite centrifugée à 4000 trs/min pendant 60 min. Le culot cellulaire a été suspendu dans 1,5 l de surnageant de culture et incubé à 4°C pendant 1 h pour permettre l'adsorption des bactériocines aux membranes des cellules productrices (Ghalfi *et al.*, 2006). La suspension a été ensuite centrifugée à 8000 tours/min. Le culot cellulaire a été suspendu de nouveau dans 100 ml de surnageant de la culture. La pâte obtenue a été congelée pendant 48 h (-20°C), puis lyophilisée.

La quantité de matière sèche (poudre lyophilisée) obtenue était de  $31 \pm 1$  g en moyenne par fermenteur. L'activité inhibitrice de la poudre lyophilisée a été estimée à  $4,1 \times 10^5$  AU/g (contre *P. pentosaseus*). Les poudres ont été ensuite conservées à 30°C et à 10°C (réfrigérateur). L'activité bactéricide résiduelle des poudres a été déterminée régulièrement toutes les semaines pendant 3 mois par la technique de dilution critique. Un gramme de poudre a été suspendu dans 9 ml de tampon phosphate (50 mM, pH 6,5). La solution obtenue a été centrifugée. Le surnageant obtenu (environ 1,5 ml) a été pasteurisé puis testé pour la détermination de l'activité résiduelle par la technique de dilution critique.

Pour la poudre conservée à 10°C, l'activité reste stable pendant toute la durée de conservation tandis que celle de la poudre conservée à 30°C a baissé de 50% après deux mois et demi de conservation.

Cependant, il a été constaté un caractère très absorbant (absorption d'eau) des poudres de bactériocines au cours de leur mise en solution. Ceci pourrait constituer un facteur limitant quant à leur utilisation pour le saumurage des poissons. Les résultats des essais préliminaires

d'activité inhibitrice *in situ* de solutions à base de poudre de bactériocine (1-1,5 % m/v) salées (NaCl 0,14 g/ml), réalisés sur sompat, ont montré des effets antibactériens moins importants (flore totale > 10<sup>6</sup> ufc/g au bout de 8 jours à 10°C) par rapport aux poissons traités avec les SCN issus de la souche CWBI-B1410 salés.



## CHAPITRE 9 : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES

### 1. BACTERIES LACTIQUES PRODUCTRICES DE BACTERIOCINE ET CONSERVATION DES ALIMENTS

Dans les pays d'Afrique Sub-Saharienne d'une manière générale et au Sénégal en particulier, la fermentation naturelle est une méthode de conservation des aliments très répandue. La flore lactique naturellement présente dans les denrées crues (Rodriguez *et al.*, 2000) joue le rôle de starters. Les bactéries lactiques transforment les hydrates de carbone en acide lactique (souches homofermentaires) ou en acides lactique et acétique (souches hétérofermentaires). Cette acidification empêche la propagation des souches indésirables notamment les bactéries Gram négatives, certains *Bacillus* sp. (*Bacillus cereus*), les Staphylococcaceae (*Staphylococcus aureus*) et *Listeria* sp. La majorité de ces souches indésirables est très sensible à des pH inférieurs à 4,5 (Bourgeois et Larpent, 1996).

Parmi les bactéries lactiques, certaines souches produisent des substances antagonistes spécifiques de nature peptidique : les bactériocines. Ces substances ne sont pas toxiques à l'égard des cellules eucaryotes ; elles sont dégradées par les enzymes digestives et ont un effet faible sur la flore intestinale. Par contre, beaucoup de bactériocines de bactéries lactiques exercent un effet inhibiteur contre plusieurs bactéries impliquées dans les maladies d'origines alimentaires. Les études focalisées sur l'application de ces composés comme conservateurs dans les aliments ont montré plusieurs avantages notamment l'extension de la durée de conservation des aliments, la réduction de la transmission de maladies via la chaîne alimentaire, et la réduction des pertes économiques liées à la dégradation bactérienne (Thomas, 2000).

L'utilisation des souches productrices de bactériocines comme conservateurs dans un système alimentaire ne nécessite pas toujours d'équipements lourds ni de dépenses

énergétiques élevées. Il suffit surtout de disposer de souches adaptées à l'environnement écologique du système alimentaire considéré ou dans certains cas, de créer les conditions nécessaires à la production *in situ* de bactériocines dans l'aliment par la souche. Cette technologie peut être par conséquent adaptée dans les Pays du Sud pour améliorer les systèmes de production et de conservation des denrées alimentaires qui sont essentiellement de type artisanal.

Dans le cas du Sénégal, cela concerne plus particulièrement la conservation des produits de la pêche artisanale (**Chapitre 1**). Au cours de cette étude, plusieurs souches lactiques productrices de bactériocine ont été mises en évidence à partir d'aliments fermentés traditionnels, et des souches bactériennes de ce type ont été utilisées comme barrière additionnelle contre le développement de la flore bactérienne dans les préparations de produits à base de poisson salés.

## **2. DETECTION, IDENTIFICATION DE SOUCHE BAC+ ET CARACTERISATION DE BACTERIOCINES**

Dans les chapitres 3 et 4, quatre échantillons de produits alimentaires sur les 32 analysés (12,5%) ont mis en évidence au moins, une souche bactérienne lactique productrice de bactériocine. Nos résultats sont similaires à ceux publiés par Garver and Muriana (1993), et Lasagno *et al.* (2002). Il faut signaler que les 12 souches bactériennes bac+ détectées appartiennent toutes à l'espèce *Lc lactis* subsp. *lactis*, exceptée une souche d'*Ec faecium*. L'utilisation couplée des caractères phénotypiques (morphologie, spectre d'inhibition de croissance, API 50 CH...) et génétiques (séquences du 16S ADNr) a permis de distinguer 3 souches différentes de *Lc lactis* subsp. *lactis* bac+ dénommées CWBI-B1410, CWBI-B1426 et CWBI-B1427, en plus de la souche d'*Ec faecium* (CWBI-B1411).

Le spectre d'inhibition du surnageant de culture neutralisé (SCN) des souches de *Lc lactis* est plus large que celui de la souche *Ec faecium*, et comprend différentes souches bactériennes

responsables de dégradation alimentaires et/ou pathogènes tels que *B. coagulans*, *L. monocytogenes* et *B. cereus*. Les activités des préparations bactéricides des différentes souches contre *B. coagulans* sont similaires à celles décrites pour les préparations bactéricides issues de cultures de *Lb salivarius subsp. salivarius* (Flynn *et al.*, 2002).

Les trois souches de *Lc lactis* subsp. *lactis* portent le gène codant pour la nisine qui existe sous trois formes (A, Z et Q). La souche d'*Ec faecium* possède le gène codant pour l'entérocin B, une bactériocine appartenant à la Classe II (Klaenhammer, 1993). Les séquences des gènes de bactériocines des 4 isolats bac<sup>+</sup> n'ont pas présenté de différence avec celles des gènes codant pour la nisine A, nisine Z ou l'entérocin B, disponibles dans les banques de données.

Les souches de *Lc lactis* ont été détectées dans différents types de produits alimentaires traditionnels sénégalais (produits fermentés à base de céréales, produits fermentés à base de lait et produits de pêche marine crus). La détection de souches de *Lc lactis* productrices de bactériocine à partir de produits alimentaires est très commune (Benkerroum *et al.*, 2000; Coventry *et al.*, 1996; Ghalfi, 2006 ; Garver and Muriana, 1993). Nos résultats confirment une large distribution de souches de *Lc lactis* bac<sup>+</sup> dans la nature.

La prévalence élevée des souches de *Lc lactis* bac<sup>+</sup> et leur détection dans différents types de produits alimentaires indique un potentiel élevé de ces souches à croître dans différents environnements écologiques et à dominer les autres bactéries présentes dans ces aliments. Ces derniers sont généralement préparés et conservés à la température ambiante (aux environs de 30 °C), qui correspond à la température optimale de croissance et de production de bactériocines par des souches de ce type, comme cela a été démontré pour la souche CWBI-B1410 dont l'activité inhibitrice de type bactériocine a été la plus importante.

La nisine, connue essentiellement sous deux variantes naturelles, [la nisine A (Gross et Morell, 1971), la nisine Z (Mulders *et al.*, 1991)] est le prototype des bactériocines produites

par les souches de *Lc lactis* subsp. *lactis*. Une troisième variante moins répandue appelée nisine Q, a été décrite par Zendo *et al.* (2003) ainsi que le gène codant pour cette bactériocine. La prévalence des souches productrices de nisine Z dans la nature est similaire à celles productrices de nisine A (De Vos *et al.*, 1993). Le gène structural de la nisine code pour un prépeptide de 57 acides aminés qui subit des modifications catalysées par des enzymes spécifiques permettant d'obtenir un peptide mûre de 34 acides aminés correspondant à la bactériocine biologiquement active libérée par la cellule dans le milieu extérieur (De Vos *et al.*, 1995; Sahl *et al.*, 1998). L'expression du gène codant pour la nisine a été mise en évidence à partir d'une culture de la souche CWBI-B1410. Les investigations complémentaires (comparaison des profils de sensibilité aux protéases et du spectre d'inhibition d'une solution bactéricide issue de CWBI-B1410 avec une solution de nisine commerciale, analyse du spectre de masse d'une infusion bactéricide semi-purifiée par HPLC-RP C<sub>18</sub>, issue de culture de CWBI-B1410) ont également indiqué une production de nisine par la souche CWBI-B1410.

La nisine est utilisée comme conservateur naturel dans différents types de produits alimentaires (fromage, conserves, viandes salées séchées) (Delves-Broughton, 1990), et est légalement approuvée comme conservateur (E 234) dans plusieurs pays (Thomas *et al.*, 2000). Les souches de *Lc lactis* bac<sup>+</sup> sont généralement considérées comme non pathogènes et utilisées comme bioconservateurs. L'incorporation de lactocoques producteurs de nisine dans les aliments comme bio-conservateur constitue économiquement une alternative attractive par rapport à l'utilisation des préparations de la bactériocine purifiées (Lipinska, 1973 ; Lipinska, 1977).

Pour toutes les raisons évoquées précédemment et à cause de son activité antibactérienne *in vitro* importante, la souche *Lc lactis* subsp. *lactis* CWBI-B1410, a été sélectionnée pour les tests de mise en œuvre sur poissons. Les entérocoques sont la cause fréquente de divers types

d'infections chez l'homme (Franz *et al.*, 1999 ; Giraffa *et al.*, 1997 ; Gelsomino *et al.*, 2001 ; Jett *et al.*, 1994). Par conséquent, la souche *Ec faecium* CWBI-B1411 a été écartée des essais sur poissons. La souche *Lb curvatus* CWBI-B28 provenant de la collection du CWBI de la FUSAGx a été aussi utilisée comme deuxième souche pour le traitement des poissons. Cette souche produit trois bactériocines de type curvalicine (a, b et c) et a une importante activité anti-Listeria (Ghalfi, 2006).

### **3. APPLICATION DE SOUCHES BACTERIENNES BAC+ A L'AMELIORATION DE LA CONSERVATION DE POISSONS**

Au Sénégal la conservation des produits de la pêche demeure un problème récurrent, lié d'une part à la nature très dégradable du poisson dont la préservation de la qualité nécessite des équipements lourds mais aussi à la prédominance d'un conditionnement et d'un système de transformation qui sont restés artisanaux et empiriques. Une bonne partie des débarquements de la pêche artisanale, environ 30 à 40%, est conservée par salage et séchage, ou fermentation, salage et séchage. La tendance au niveau des procédés traditionnels est une incorporation de chlorure de sodium en grande quantité (30-40% (m/m) (GRET et CTA, 1993 ; Infoconseil, 2005) afin d'empêcher le développement de la flore dans les préparations à base de poisson.

Les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les trois poissons (de teneur en lipides diversifiée) provenant de marchés locaux de Dakar au Sénégal, ont été présentés dans les chapitres 5, 6 et 7. Ils ont montré un niveau de contamination bactérienne dans les filets issus des poissons frais de production artisanale à la limite de l'acceptabilité (6 log ufc/g) définie pour ces produits selon les normes internationales. Ce niveau est similaire à ceux publiés par Gram (1992) et Diei-Ouadi (2005). La flore contaminante entérique ( $10^4$  UFC/g) est légèrement plus abondante que les bactéries lactiques ( $10^3$  UFC/g) et autres coques ( $10^2$  UFC/g) Gram-positifs.

Ces résultats confirment une prévalence élevée des bactéries dans les produits de la pêche frais conditionnés artisanalement au Sénégal et pose le problème de la salubrité des produits issus de leur transformation évoqué dans le chapitre 1 ; la plupart de ces transformations étant effectuée aux températures ambiantes, très favorables à la croissance des entérobactéries.

Deux stratégies d'évaluation de l'efficacité des souches bactériennes bac<sup>+</sup> comme barrière additionnelle pour contrôler la croissance de la flore dans les produits de la pêche ont été envisagées : l'utilisation de cultures vivantes des souches productrices de bactériocine en combinaison avec le sel et l'utilisation des surnageants de cultures neutralisés des souches productrices de bactériocine additionnés de NaCl. Dans le premier cas, le salage a été réalisé juste après l'étape de fermentation (24 h environ), car la croissance de la souche CWBI-B1410 est faible sur milieu de culture, même liquide, contenant un pourcentage de sel (NaCl) > 2%. Dans le second cas, les SCN salés ont été utilisés comme barrière contre le développement de la flore à 10°C, la plus basse température à notre disposition.

Dans le premier cas, comment appliquer la souche CWBI-B1410 à l'amélioration de la qualité microbiologique des préparations de poissons et quels effets cela a-t-il produit ? La réponse à cette question se trouve dans le **chapitre 5**. Aux températures ambiantes, *Shewanella putrefaciens* et les entérobactéries constituent la flore contaminante spécifique des poissons marins tropicaux (Gram, 1992). Les principales souches bactériennes contaminantes de poissons conservés à 30°C mises en évidence au cours de cette étude sont des souches de *Proteus* sp. De plus quelques souches de *Bacillus* sp. ont aussi été détectées (**Chapitre 5**). Les Entérobactéries sont généralement sensibles à des valeurs de pH inférieures à 4,5 (Bourgeois and Larpent, 1996). De plus, les bactériocines ne sont généralement pas actives contre les bactéries Gram-négatives. Par conséquent, l'acidification du poisson reste le principal moyen de contrôle de cette flore dans les filets par la souche testée.

L'inoculation des poissons avec CWBI-B1410 n'a pas d'effet considérable contre le développement de la flore entérique. Les produits de la pêche ayant une faible teneur en hydrates de carbone fermenticibles, il en résulte une faible production de substances antagoniste notamment d'acides organiques par la souche CWBI-B1410, insuffisante pour abaisser le pH du poisson.

L'inoculation des poissons avec CWBI-B1410 et ajout de glucose a constitué un moyen de limiter la croissance des entérobactéries (réduction du niveau de la flore entérique de 2 à 4 log UFC/g par rapport au poisson transformé traditionnellement) et l'intensité des odeurs putrifiantes dans les produits par rapport à ceux préparés traditionnellement (**Chapitre 5**). La dégradation homofermentaire du glucose en acide lactique est à l'origine de la réduction du pH du poisson, rendant ce dernier plus résistant à la propagation des entérobactéries. L'activité inhibitrice de type bactériocine dans le jus du poisson a été estimée à 1280 AU/ml en utilisant la souche *P. pentosaseus*. Dans les chapitres 3 et 4, il a été démontré qu'une telle activité inhibe la croissance *in vitro* de souches Gram positives pathogéniques tels que *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*.

Dans la seconde stratégie, les filets ont été conservés à 10°C. Le traitement préservatif combine les effets antibactériens du sel généralement très actif contre les bactéries Gram-négatives (Leroi *et al.*, 2000), et ceux des SCN des souches bac<sup>+</sup>, plutôt actifs contre des bactéries Gram positives (**Chapitre 3 et 4**). Ce traitement permet une réduction du nombre de bactéries (mésophiles et psychrotrophes) viables dans les poissons de 1-2 log UFC/g et un maintien de la contamination bactérienne à un niveau inférieur à 10<sup>6</sup> UFC/g pendant plusieurs jours (3 à 12 jours) selon la concentration en NaCl dans la solution de préservation. La stabilité de l'activité bactéricide résiduelle de la solution de préservation est fonction de la quantité de NaCl dans le SCN utilisé pour le traitement du poisson.

L'utilisation du SCN de bac<sup>+</sup> en combinaison avec du NaCl en concentration de 14% (m/v) améliore la stabilité de l'activité inhibitrice *in situ* des SCN de CWBI-B1410. Il en résulte une augmentation des durées de conservation des poissons de 7 à 13 jours à 10°C par rapport aux poissons traités avec de l'eau salée ou du SCN de souche bactérienne bac- salé, selon la teneur en lipides du poisson. Des résultats similaires ont été observés en traitant les poissons avec du SCN de CWBI-B28 salés (**Chapitre 7**).

Les effets antibactériens des SCN des souches bac<sup>+</sup> en combinaison avec du sel (NaCl 0,14 g/ml) sont, par ailleurs, plus importants que ceux d'une solution d'eau salée (NaCl 0,14 g/ml) supplémentée de sels de sorbate de benzoate (0,5 mg/ml) sur les poissons de teneur en lipides plus élevée (capitaine et mâchoiron) (**Chapitre 6**).

Comme il a été démontré qu'une production de bactériocine par les souches CWBI-B1410 et CWBI-B28 est à l'origine de leur activité bactéricide dans les surnageants de culture neutralisés, comparée aux souches non productrices de bactériocines, l'amélioration du contrôle de la croissance de la flore bactérienne contaminante notée dans les filets traités avec les surnageants de culture issues des souches CWBI-B1410 et CWBI-B28 salés peut être expliquée par un effet antibactérien additionnel des bactériocines libérées par les souches en plus de celui du NaCl, et/ou un effet synergique du NaCl et des bactériocines. Pour des produits aussi dégradables que le poisson, des augmentations de la durée de conservation de 7 à 12 jours (maintien de la flore de contamination en dessous de 6 log CFU/g) à 10°C sont très significatives.

La baisse progressive de l'activité inhibitrice de préparations de bactériocine sur matrice alimentaire est liée à plusieurs facteurs notamment les interactions moléculaires des bactériocines avec les constituants des aliments, le pH des aliments et surtout à l'activité des enzymes protéolytiques naturellement présentes dans les aliments, qui peuvent dégrader les bactériocines (Goff *et al.*, 1996 ; Ghalfi *et al.*, 2006 ; Kouakou *et al.*, 2008).



En ce qui concerne l'inhibition de l'activité des enzymes dans les poissons, le sel ne devient efficace que lorsque sa concentration dans la chair de poisson atteint et dépasse 5 – 6% (Gérard, 1989). Pour un poisson maigre qui laisse diffuser plus rapidement le sel (OSU Extension Service, 1993), cela correspond à l'ajout d'une solution salée de 0,14 g/ml. Ceci peut expliquer la stabilité plus importante de l'activité bactéricide résiduelle dans les filets de sompat (de teneur en lipides plus faible) traités avec les solutions (SCN) salées à 0,14 g/ml par rapport à celle des filets plus faiblement salés.

La différence d'efficacité par les deux solutions bactéricides des deux souches, salées sur les différents poissons peut s'expliquer par une différence d'interaction entre les molécules de bactériocine et certains constituants des aliments tels que les lipides mais également les protéines (Aasen *et al.*, 2003 ; Davies *et al.*, 1999 ; Zapico *et al.*, 1999).

La nisine est connue pour être peu efficace dans les aliments gras (Jung, 1992). La souche CWBI-B1410 étant une souche productrice de nisine, ceci peut expliquer, entre autres facteurs, l'effet antibactérien moins important de son SCN salé sur du poisson gras (le mâchoiron).

Ces résultats suggèrent que le saumurage de poisson avec du SCN de souche bac<sup>+</sup> en combinaison avec du sel en concentration d'environ 14% (m/v), peut constituer un moyen approprié d'amélioration de la technique traditionnelle de conservation du poisson par salaison au Sénégal. Cette stratégie permettrait de réduire les pertes liées à la dégradation bactérienne et d'améliorer la qualité microbiologique des préparations de produits de la pêche salés. Il présente l'avantage d'utiliser des substances d'origine naturelle en supplément du sel pour réduire la croissance de la flore bactérienne contaminante des poissons. De par sa simplicité, il est économiquement raisonnable par rapport à l'utilisation d'autres agents chimiques de conservation non toujours accessibles ou disponibles sur place.

Par ailleurs, ce traitement peut être intégré dans le schéma de production de produits de pêche salés séchés (chapitre 1, figure 6). Pour cela, les produits de la pêche crus peuvent être traités par addition de solutions bactéricides de l'une ou l'autre des deux souches bac+, salées (NaCl 0,14 %) et d'une incubation à 10°C pendant plusieurs jours (8 à 10 jours), généralement nécessaire pour une bonne maturation de produits de pêche salés. Durant ce traitement, la concentration en sel dans le poisson va augmenter du fait de la diffusion du NaCl dans le produit et de la sortie de l'eau par le phénomène de l'exsudation. Le séchage (ou fumage suivi de séchage généralement réalisé pour les poissons gras comme le mâchoiron), des poissons ainsi traités permettrait de réduire l'activité de l'eau ( $a_w$ ) à un niveau suffisamment bas permettant de réduire ou d'arrêter le développement des bactéries dans les produits et de prolonger de manière très significative leur temps de conservation.

Comment pourrait-on améliorer la productivité de bactériocines par les souches et conditionner les bactériocines dans le surnageant de culture? Les études réalisées sur fermenteur (régulation automatique du pH à 6.5) montrent une productivité de bactériocine quatre fois plus importante par la souche CWBI-B1410 comparée à celle obtenue sur fiole. Les bactériocines produites dans le milieu de culture des souches peuvent être conditionnées par adsorption aux débris de la membrane des cellules productrices. De plus les poudres de bactériocines montrent une stabilité de deux mois à 30°C similaire aux températures ambiantes en milieu tropical. Les bactériocines peuvent également être précipitées par addition de sel à saturation suivie de centrifugation.

#### **4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHES**

Ce travail est une contribution à l'étude de la sélection de souches lactiques productrices de bactériocine à partir d'aliments traditionnels, à la caractérisation partielle des bactériocines, et à la mise en œuvre de procédés adaptés d'application de souches de ce type à l'amélioration des techniques de conservation du poisson au Sénégal.

Quatre souches bactériennes lactiques productrices de bactériocine, *Lc lactis* CWBI-B1410, *Ec faecium* CWBI-B1411, *Lc lactis* CWBI-B1426 et *Lc lactis* CWBI-B1427 ont été isolées. Elles ont permis la création d'une nouvelle collection de bactéries de ce type au Laboratoire de Microbiologie Appliquée et de Génie Industrielle (L-MAGI) de l'Ecole Supérieure Polytechnique de l'Université de Dakar (Sénégal) et un enrichissement de la collection du CWBI de la FUSAGx en nouvelles souches. Les précurseurs de la nisine A, de l'entérocoque B, et de la nisine Z ont été mis en évidence chez respectivement CWBI-B1410, CWBI-B1411 et (CWBI-B1426 et CWBI-B1427. Les études complémentaires réalisées sur la principale souche sélectionnée (CWBI-B1410) pour les essais de conservations de poissons ont confirmé une production de nisine.

Les poissons crus prélevés de différents marchés locaux de Dakar (où ils sont conditionnés artisanalement) et filetés ont un niveau de contamination bactérienne à la limite de l'acceptabilité définie pour ces produits ( $10^6$  UFC/g) selon les normes internationales. La flore contaminante entérique est légèrement plus abondante que les bactéries lactiques et autres coques Gram-positifs.

La flore bactérienne contaminante spécifique mise en évidence dans les poissons fermentés naturellement (sans utilisation de ferment) à 30°C (pratique répandue au cours de la production de « guedj » au Sénégal) est essentiellement constituée de bactéries Gram-négatives [d'entérobactéries (*Proteus* sp. et *Aeromonas* sp.) et de *Shewanella putrefaciens*] estimées à  $10^9-10^{10}$  UFC/g en moins de 23 h d'incubation. Il en résulte des odeurs putrides intenses dans les produits.

Le saumurage des filets de poissons crus avec de l'eau salée (NaCl de 0,14 g/ml) permet de maintenir le niveau de la flore contaminante totale en-dessous de la limite d'acceptabilité ( $10^6$  UFC/g) pendant 3 à 7 jours de conservation à 10°C, selon la teneur en lipides des poissons. La majorité des bactéries Gram-positives isolées des filets de poissons crus est

sensible à l'activité antibactérienne *in vitro* de type bactériocine des SCN des deux souches CWBI-B1410 (isolée de farine de mil fermentée d'origine sénégalaise) et CWBI-B28 (provenant de la collection du CWBI de la FUSAGx).

Ces observations ont permis de développer deux stratégies d'application des souches bactériennes bac<sup>+</sup> (CWBI-B1410 et CWBI-B28) comme barrière additionnelle au chlorure de sodium, permettant d'améliorer le contrôle du développement de la flore bactérienne contaminante dans les préparations des poissons:

- l'innoculation des poissons avec des cellules vivantes des souches lactiques bac<sup>+</sup> avec ajout de glucose (1%) permet une production *in situ* de bactériocine et une acidification du poisson suffisante (pH 4,5) limitant la croissance de la flore entérique dans les préparations de poisson. Il en résulte une réduction du niveau de la flore entérique de 2 à 4 log UFC/g et de l'intensité des odeurs putrides dans les produits par rapport à ceux fermentés naturellement.
- le saumurage des poissons avec du SCN des souches CWBI-B1410 ou CWBI-B28 salé [NaCl, 14% (m/v)] entraîne une réduction du nombre de bactéries viables dans les poissons et permet de maintenir le niveau de la contamination bactérienne en-dessous de 10<sup>6</sup> UFC/g pendant 13 à 18 jours de conservation à 10°C, soit 7 à 12 jours de plus par rapport à l'utilisation du NaCl comme unique agent conservateur (utilisation d'eau salée ou de SCN de souches bac<sup>-</sup> salé comme agents antibactériens). Les SCN des souches CWBI-B1410 et CWBI-B28 salés [NaCl, 14% (m/v)] ont des effets antibactériens plus importants qu'une solution d'eau salée [NaCl, 14% (m/v)] supplémentée de sels de benzoate et de sorbate (0,5 mg/ml) sur les poissons de teneur en lipides supérieure à 3% (capitaine et mâchoiron).

Ces deux stratégies peuvent constituer des moyens appropriés d'amélioration de la qualité microbiologique des produits à base de poissons salés au Sénégal et de réduction des pertes de produits de la pêche artisanale liées à la dégradation bactérienne. Elles peuvent par ailleurs être combinées au séchage afin de générer des produits fermentés salés et séchés, ou salés et

séchés de meilleure qualité microbiologique, et contenant moins de sels par rapport aux poissons salés préparés traditionnellement.

Par conséquent, les perspectives de ce travail devraient s'articuler sur :

- l'étude de la conservabilité des souches bactériennes isolées, l'amélioration de leur productivité de bactériocine et le conditionnement de cette dernière afin de développer les nouveaux procédés de fermentation et de saumurage du poisson mis au point au cours de cette étude ;
- les analyses microbiologiques ayant montré que l'utilisation de CWBI-B1410 comme ferment avec ajout de glucose ou le traitement des poissons avec du SCN de bac+ en combinaison avec du sel améliore le contrôle de la croissance de la flore contaminante dans les produits, les études complémentaires devraient être orientées sur l'impact de ces deux types de traitements sur les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits ;
- la poursuite de la caractérisation des bactériocines mûres produites par les souches isolées afin de déterminer la structure des propeptides (séquence en acides aminés).

Cette étude a montré que les aliments traditionnels sénégalais constituent un réservoir intéressant de souches productrices de bactériocines. Ce travail a permis d'acquérir les techniques de détection de telles souches. Il devrait être poursuivi, en étendant l'échantillonnage dans les autres régions du Sénégal pour améliorer la diversité des souches et enrichir la nouvelle collection créée au L-MAGI de l'Ecole Supérieure polytechnique de Dakar. Dans le cas de la fermentation du poisson, l'idéal serait d'utiliser des souches bac+ halophiles et psychrotrophes afin de réaliser des fermentations de poissons dans des conditions de températures moins élevées que celles utilisées dans la préparation artisanale du poisson au Sénégal (30°C), très favorables à la croissance des entérobactéries. Différentes souches de *Lactobacillus* sp. et *Carnobacterium* sp., fréquemment utilisées comme ferment

pour la conservation de produits de pêche de courtes durées de conservation, ont été isolées des poissons salés par saumurage et conservés à 10°C. La recherche de souches productrices de bactériocines parmi ces isolats devrait être entreprise dans la perspective d'expérimenter une fermentation du poisson à basse température, non répandue au Sénégal, pour diversifier la gamme de produits de la pêche.

Le problème de la conservation des aliments se posant également pour les autres types de produits alimentaires par exemple le lait, il serait envisageable de tester les souches nouvellement isolées (CWBI-B1410, CWBI-B1426 et CWBIB1427) pour l'amélioration de la fermentation traditionnelle du lait au Sénégal.

## 5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DES CHAPITRES 8 ET 9

1. Aasen IM., Markussen S., Moretro T., Katla T., Axellsson L. and Naterstad K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* **87**: 35-43.
2. Benkerroum N., Oubel H. and Lben M. (2002). Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *J. Food Prot.* **65**: 799-805.
3. Benkerroum N., Oubel H., Zahar M., Dlia S. and Filali-Maltouf A. (2000). Isolation of a Bacteriocin-producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *J. Appl. Microbiol.* **80**: 960-968.
4. Bourgeois CM. and Larpent JP. (1996). Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires. Lavoisier Technique & documentation. paris 2 ème édition. 523 p. août 1996.
5. Causas P, Nilsen T, Cintas LM, NES IF, Hernandez PE and Holo H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 with can act synergistically with Enterocin A. *Microbiol.* **143**: 2287-2294.
6. Conventry MJ., Gordon JB., Mawson RF. and Hickey MW. (1996). Production of brevisin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. *J. Appl. Bacteriol.* **80**: 91-98.
7. Davidson CM. and Cronin F. (1973). Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Appl. Microbiol.* **26**:339-440.
8. Davies EA., Milne CF., Bevis HE., Potter RW., Harris JOM., Williams GC., Tomas LV. and Delves-Broughton J. (1999). Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in Vacuum-packed bologna-type sausage. *J. Food Prot.* **62** (9):1004 -1010.

9. De Vos WM., Mulders JWM., Siezen RJ., Hugenholtz J. and Kuipers OP. (1993). Properties of Nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. ***Appl. Environ. Microbiol.* 59** (1): 213-218.
10. De Vos WM., Kuipers OP., Van Der Meer JR. and Siezen RJ. (1995). Maturation Pathway of nisin and other lantibiotics: Post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram positive bacteria. ***Mol. Microbiol.* 17**: 427-437.
11. Delves–Broughton J. (1990). Nisin and its uses as food preservative, ***Food Technol.* 44**: 100–112.
12. Diei-Ouadi Y. (2005). Minced sardinella fillets in fish-landing and marketing sites in Senegal. In FAO fisheries Circular No 999:FIIU/C999(EN).
13. Flynn S, Sinderen DVG, Thornton M, Holo H, Nes IF and Collins JK. (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* UCC118. ***Microbiol.* 148**: 973-984.
14. Franz CMAP., Holzzapfel WH. and Stiles ME. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? ***Int. J. Food Microbiol.* 47**: 1-24.
15. Garver KI. and Muriana PM. (1993). Detection, Identification and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from retail food products. ***Int. J. Food Microbiol.* 19**: 241-258.
16. Gelsomino R., Vancaneyt M., Condon S, Swing J. and Cognan TM. (2001). Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type Cheesemaking factory. ***Int. J. Food Microbiol.* 71**: 177-188.
17. Gérard P. (1989). Méthode moderne de séchage du poisson. ***Nouv. Sci. Technol.* 7** (2): 127-130.



18. Ghalfi H. (2006). Sélection et utilisation de bactéries lactiques productrices de bactériocines antilisteria comme bio-conservateur et caractérisation de trois bactériocines produites par *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28. Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique.
19. Giraffa G., Carminati D. and Neviani E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: A review of Risks and potential technological use. *J. Food Prot.* **60** (6): 732-738.
20. Goff JH., Bhunia AK. and Johnson MG. (1996). Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. *J. Food Prot.* **59**:1187-1192.
21. Gram L. (1992). Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice at ambient temperature. In: E. H. Bligh (editor), *Seafood Science and Technology*. Chap. 23 pp 225–233. Fishing News Books, Blackwell, Oxford.
22. Gross E. and Morell JL. (1971). The structure of Nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 4634-4635.
23. GRET (Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques) and CTA (Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale. (1993). *Conserver et Transformer le Poisson. Guide technique et méthodologique*, Collection "le point sur"
24. Infoconseil, Paoa. (2005). *Etats des lieux de la transformation des produits halieutiques au Sénégal*. Dakar Sénégal, GRET, ENDA GRAF, SNC Lavalin, Cintech, MAE, CDE, ACDI, MIA, 42p.
25. Jett BD., Huycke MM. and Gilmore MS. (1994). Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 462-478.
26. Jung D- S., Bodyfelt FW. and Daeshel MA. (1992). Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J. dairy Sci.*, **75**: 387-393.

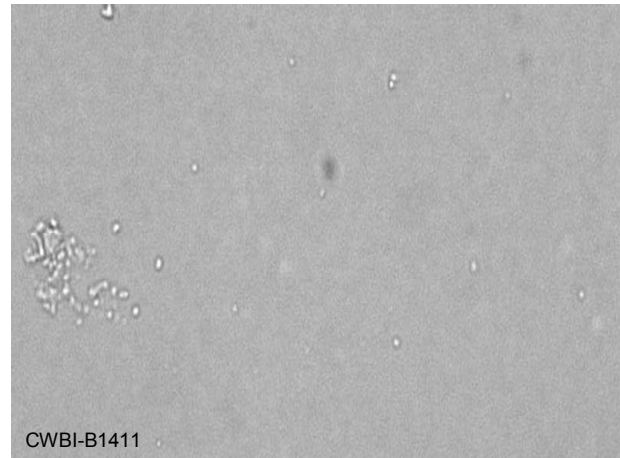
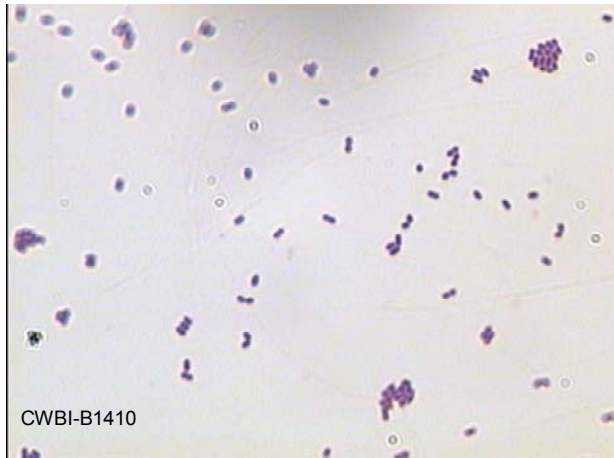
27. Klaenhammer TR. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol Rev.* **12**: 39-86.
28. Kouakou P., Ghalfi H., Destain J., Dubois Dauphin R. Evrard P. and Thonart P. (2008). Enhancing the antilisterial effects of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 in pork Meat and Cocultures by limiting bacteriocin degradation. *Meat Sci.* doi: 10.1016/J.jmeatsci.2008.02.015.
29. Lasagno M., Beoletto V., Sesma F., Raya R., Font De Valdez G. and Eraso A. (2002). Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *Microbiologia* **25**: 37- 44.
30. Leroi F., Joffraud JJ. and 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. *J. Food Prot.* **63**: 502-508.
31. Lipinska E. (1973). Use of nisin-producing lactic streptococci in cheesemaking. *Bull. Int. Dairy Fed* **73**: 1-24.
32. Lipinska E. (1977). Nisin and its application, P. 103-130. In M. Woodbine (ed.), Antimicrobials and antibiotics in agriculture. Butterworths, London.
33. Meghrouts J., Lacroix C., Bouksaïm M., Lapointe G. and Simard RE. (1997). Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* UL 719. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 133-138.
34. Mulders JWM., Boerrigter IJ., Rollema HS. and De VOS WM. (1991). Identification and Characterization of the Lantibiotic Nisin Z, a natural variant. *Eur. J. Biochem.* **201**:581-584.
35. OSU (Oregon State University) Extension Service. (1993). Fish pickling for home use PNW 183. <http://extension.oregonstate.edu> (visited October 20<sup>th</sup>, 2006).

36. Rodríguez E., B. Gonzáles B., P. Gaya, M. Nuñez and M. Medina. (2000). Diversity of bacteriocins produced by Lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* **10**: 7-15.
37. Sahl H.-G. and G. Bierbaum. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **52**: 41-79.
38. Thomas LV., Clarkson MR. and Delves-Broughton J. (2000). Nisin, In: Naidu AS editors. Natural food antimicrobial systems. Boca Raton, Fla: CRC Press. p 463-524.
39. Yang R., Johnson MC. and Ray B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3355-3359.
40. Zapico P., De Paz M., Medina M. and Nunéz M. (1999). The effect of homogenization of whole milk, skim and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* **46**:151-157.
41. Zendo T., Fukao M., Ueda K., Higuchi T., Nakayama J. and Sonomoto K. (2003). Identification of the Lantibiotic Nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biol. Biotechnol. Biochem.* **67**:1616-1619.



**ANNEXES**

*Annexe 1 : Morphologies des cellules des souches bactériennes bac<sup>+</sup> isolées*



## *Annexe 2 : Origine des échantillons et composition des milieux d'isolement*

### **Matériel d'isolement**

Les bactéries lactiques testées pour la production de bactériocines ont été isolées de différents produits alimentaires d'origine sénégalaise.

#### *Nature et provenance des échantillons*

<b>Natures des aliments</b>	<b>Nombre d'échantillons</b>	<b>Marchés d'origine</b>
Poissons fermentés	10	Dakar : Sahm Gueule Tapée (3), Dakar : Parcelles Assainies (4) ; Dakar Grand Yoff (3)
Poisson crus	6	Dakar : Sahm Gueule Tapée (2), Dakar : Parcelles Assainies (2) ; Dakar Grand Yoff (2)
Farine de mil fermentée	8	Thiès : kirène (2) ; Dakar : Sham Gueule Tapée (2), Dakar : Parcelles Assainies (2) ; Dakar Grand Yoff (2)
Lait fermenté	8	Thiès : kirène (3) ; Dakar : Sham Gueule Tapée (3), Dakar : Parcelles Assainies (2)

### **Milieux d'isolement des bactéries**

<b>MRS</b>		<b>M17</b>	
<b>composants</b>	<b>Concentration (g/l)</b>	<b>composants</b>	<b>Concentration (g/l)</b>
Peptone de caséine	10	Peptone de soja	5
Extrait de levure	5	Peptone de viande	2,5
Extrait de viande	5	Peptone de caséine	2,5
Phosphate dipotassique	2	Extrait de levure	2,5
Acétate de sodium 3H <sub>2</sub> O	5	Extrait de viande	2,5
Citrate diammonique	2	Acide ascorbique	0,5
Sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2	Sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2
Tween 80	1 ml	Phosphate dipotassique	13,3
Sulfate de manganèse 4H <sub>2</sub> O	0,05	potassium Dihydrogénophosphate	5,7
Glucose*	1	Glucose	1
Agar	15	Agar	15
Eau déminéralisée	1000 ml	Eau déminéralisée	1000 ml

\*Sur les milieux MRS et M17 normaux, la concentration en glucose est de 20 g/l. Elle a été réduite afin de limiter la production d'acides organiques par les souches isolées dans la gélose.

Les étapes suivantes de la détection des souches lactiques productrices de bactériocines ont été détaillées dans les chapitres 3 et 4.

### ***Annexe 3 : Méthodes de caractérisation génétique des souches et des bactériocines***

#### **Principe de la PCR**

La PCR est basée sur le mécanisme de la réplication de l'ADN *in vivo* : l'ADN bicaténaire est dénaturé en ADN monocaténaire, puis dupliqué. Cette technique comprend les cycles répétitifs suivants :

- dénaturation de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire ;
- hybridation de l'ADN cible par deux oligonucléotides utilisés comme amorces ;
- extension de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseurs en présence d'ions  $Mg^{2+}$

#### **Mise en évidence du gène codant pour la nisine**

L'ARN total a été isolé à partir d'une culture de CWBI-B1410 en utilisant le protocole du kit RNeasy mini (Qiagen GmbH, Germany). La concentration en ARN de la solution est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm selon la formule :

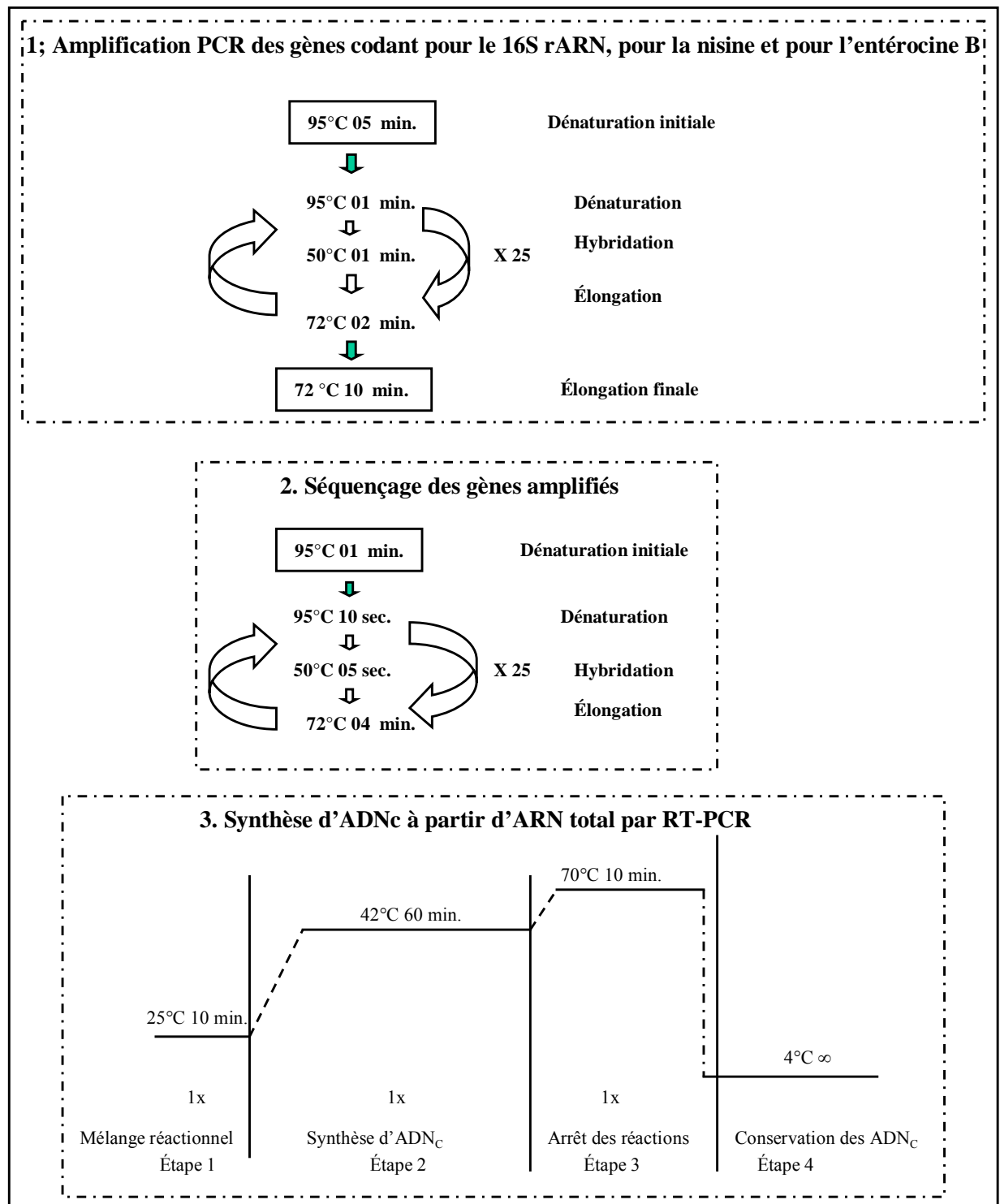
$$C_{ARN} (\mu\text{g/ml}) = D.O._{260} \times 40 \times 100$$

Une synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a été entreprise à partir de l'ARN total isolé de la souche productrice de bactériocine sélectionnée en utilisant le kit « Reverted first strand cDNA synthesis » (Fermentas). La transcriptase reverse (RT) est une ADN polymérase 5'-3' qui permet de synthétiser le premier brin d'ADNc (ADN double brin) à partir d'un ARNm. Des amorces d'hexanucléotides aléatoires s'hybrident sur l'ARNm et permettent d'initier l'action de la RT, qui synthétisera une copie complémentaire des ARNm.

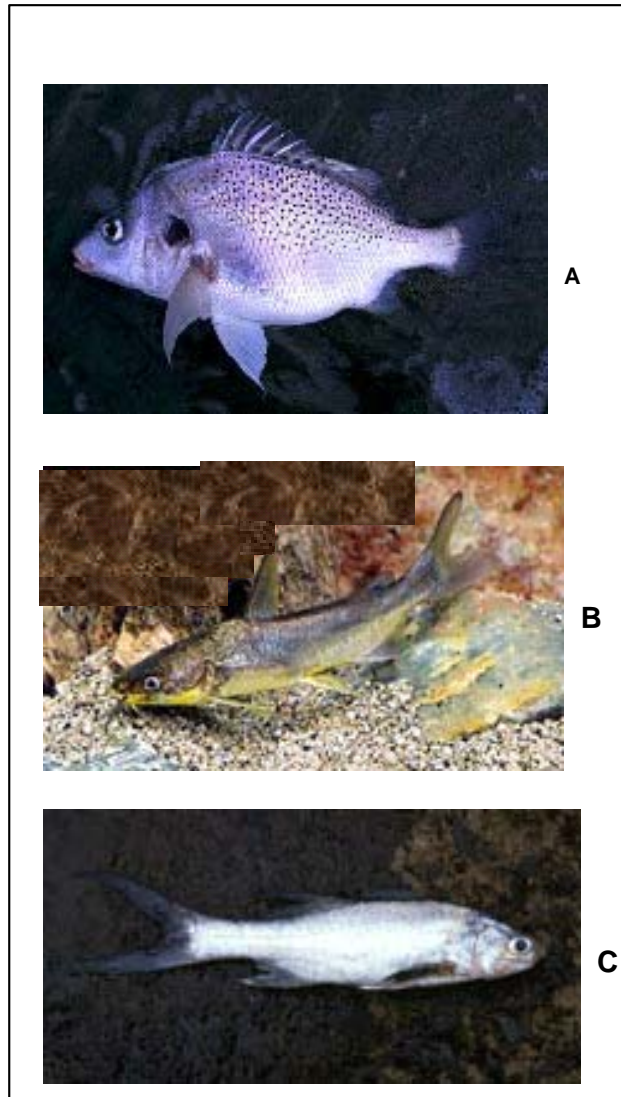
Deux  $\mu\text{l}$  de solution d'ADNc issu de la RT-PCR ont été utilisés pour l'amplification PCR du gène codant pour la nisine, en utilisant la paire d'amorce nisine F/nisin R décrite au chapitre 4.



## Conditions des réactions de l'amplification PCR, de séquençage et de RT-PCR



**Annexe 4 : Poissons marins utilisés pour les essais de conservation**



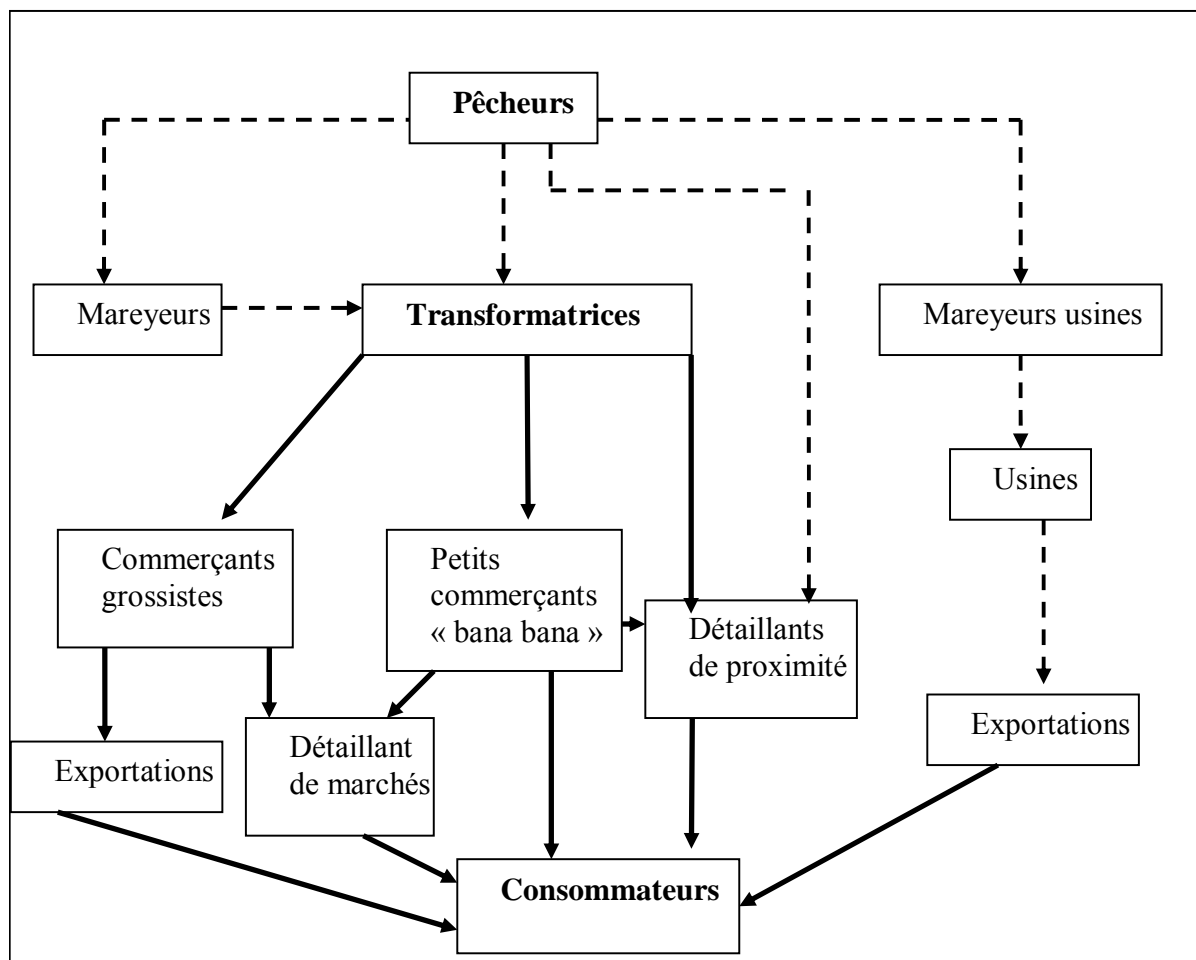
Sources: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) (mars 2006)

	Teneur en lipides totaux (% de matière sèche)		
	A	B	C
Lipides totaux	2,8 ± 0,2	17,7 ± 0,79	3,28 ± 0,2

A : *P. jubelini* ; B : *A. heudeloti*; C: *P. quadrafilis*

La teneur en lipides totaux des poissons a été déterminée à partir de filets séchés pendant 24 h (100 °C) et broyés, suivant la technique de Folch (1957).

*Annexe 5 : Pêche artisanale au Sénégal : acteurs et circuits de distribution des produits transformés*



Source : Infoconseil Paoa, 2005. Etats des lieux de la filière de transformation de produits halieutiques au Sénégal, Dakar, Sénégal, Gret, Enda Graf, SNC Lavalin, Cintech, MAE, CDE, ACIDI, MIA, 42 p.

## *Annexe 6: Publications, activités et distinctions*

### **Articles publiés ou soumis**

1. **Problématique de la conservation des produits de pêche artisanales au Sénégal : Potentialité des bactéries lactiques productrices de bactériocines comme biocconservateurs.** *Synthèse bibliographique, soumise à BASE*
2. **Bacteriocin producers from traditional food products.** *BASE 2007 11 (4) 275-281.*
3. **In vitro detection and characterization of bacteriocin-like inhibitory activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from Senegalese traditional food products.** *Submitted to African Journal of Microbiological Research mars 2008*
4. **Antibacterial effects by *Lactococcus lactis* CWBI-B1410 with glucose supplementation to control growth of spoilage enteric bacteria on two fishes incubated at 30°C for fermentation in Senegal.** Submitted to Journal des Sciences pour l'Ingénieur juin 2008
5. *Effets antibactériens du surnageant de culture neutralisé d'une souche lactique productrice de bactériocine, additionné de sel (NaCl), sur différents poissons conservés à 10°C au Sénégal.* Sakho et Crouzet (Eds.). AUF, 2008, pp 39-44.
6. **Control of Spoilage bacteria with bacteriocin-producing lactic acid bacteria combined with salt addition on fish in Senegal.** *Submitted to African Journal of Agricultural Research juin 2008*

### **Communication orale (Séminaire)**

Utilisation du surnageant de culture bactéricide de *Lactococcus lactis* CWBI-B1410, isolé de farine de mil fermentée, en combinaison avec du chlorure de sodium pour contrôler la flore contaminante de différents poissons filetés conservés à 10°C au Sénégal. *Séminaire AUF (Génie des Procédés Appliqués à l'Agroalimentaire) Dakar 21- 23 novembre 2007.*

### **Abstracts et Posters (congrès et symposiums)**

1. Detection, isolation and antibacterial activity on dairy products of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods from Senegal. *Bioforum, December 7, 2004 ULG, Liège Belgium, abstract N° 145.*

2. Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from dried fermented products and dairy environment. *10<sup>th</sup> Conference on Food Microbiology, University of Liege (Belgium), June 23 & 24 2004.*

3. Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Senegalese traditional fermented foods for use as biopreservative in fish. *Congress of Food Microbiology, Bologna (Italy), August 29th – September 2nd 2006).*

4. Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Senegalese traditional fermented foods. *Conference Food Microbiology, University of Gent (Belgium), September 2006.*

5. A Novel Technology for Senegalese Fish Species Preservation by Combined Treatment with Sodium Chloride and Fermentation Products of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria during Storage under Refrigeration. *94<sup>th</sup> Congress of the International Association for Food Protection, 8 -11 July 2007, Buena Vista, Florida USA, abstract P 1-22.*

6. Selection, characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Senegalese traditional Fermented foods and application to improve preservation of tropical fish commodities. *10<sup>ème</sup> conférence Européenne de Nutrition, 10 - 13 Juillet 2007 à Paris, abstract P. 129.*

7. Control of spoilage bacteria of two lean and fat Senegalese fish species during storage at 10°C by treatment combined sodium chloride with cell-free supernatants of two selected bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria. *Seafood congress, 25 – 27 September 2007, Dublin Ireland. Poster primé pour la médaille de bronze.*

8. Use of Culture Supernatants of Two Selected Bacteriocin Producers in Combination with Sodium Chloride to Sanitize Three Filleted Fish Species during Storage at 10°C in Senegal. *3<sup>rd</sup> IAFP's European symposium Rome 18 -19 October, 2007, abstract N° P 3.*

### **Distinctions (2007)**

3<sup>ème</sup> prix au International Association of Fish Inspector (IAFI) world Seafood Congress – Scientific Poster Competition 2007, *Dublin Ireland.*