

ANALYSE METAGENOMIQUE DE LA DYNAMIQUE DE L'ECOSYSTEME BACTERIEN DE LA VIANDE DE PORC BIOPRESERVEE

BOZEC A.¹, LE ROUX A.¹, FEURER C.¹

¹IFIP- Institut du porc, La Motte au Vicomte 35651 Le Rheu, France.

arnaud.bozec@ifip.asso.fr

Abstract: Metagenomic dynamic analysis of the bacterial ecosystem of biopreserved pork meat

The objective of this study was to evaluate the bacterial evolution of biopreserved pork meat, vacuum-packed and stored at a temperature of -1.5° C for 12 weeks. The use of metagenomic analysis allowed a new insight into the bacterial competition taking place. The comparison of control samples to biopreserved meat with two separate *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus sakei* cultures showed three different scenarios. *Pediococcus acidilactici* survived well for a period of five weeks. Subsequently however, it was then supplanted by the bacterial flora naturally present in the product, which was, in this case, *Lactobacillus sakei*, *C. divergens* and *Leuconostoc gelidum*. Alternatively, the protective culture *Lactobacillus sakei* showed the ability to maintain the microbiological quality in the vacuum-packed meat at an acceptable level for 12 weeks.

Introduction

Cette étude vise à étudier la possibilité de conservation de viande de porc biopréservée conditionnée sous vide pendant 12 semaines à -1.5°C. Le challenge de la biopréservation est de pouvoir doubler la limite de conservation actuelle qui est de 6 semaines (Bozek *et al.*, 2005), grâce à la maîtrise des flores d'altération et au maintien de la qualité sanitaire des viandes. La comparaison des modalités expérimentales, avec l'utilisation de deux ferments par rapport à un essai témoin non biopréservé a permis de suivre l'évolution bactérienne par microbiologie classique et métagénomique tout au long de la conservation.

Matériel et méthodes

Cent vingt carcasses ont été sélectionnées au cours du processus d'abattage dans le but d'assurer la variabilité microbiologique. Après refroidissement, découpe et désossage, chaque filet de porc a été coupé en trois morceaux et les ferments ont été appliqués. Un échantillon témoin sans culture a été inclus dans l'expérience. Environ 2,75 g de ferment ont été pulvérisés sur les viandes (1.1 kg en moyenne) avant le conditionnement sous vide. Les viandes sous vide ont ensuite été refroidies dans une cellule de refroidissement cryogénique puis stockées à l'obscurité à -1,5 °C pendant 12 semaines. Les cultures de protection 1 et 2, respectivement, appartiennent à l'espèce *Pediococcus acidilactici* et *Lactobacillus sakei*. Afin d'étudier l'écosystème bactérien associé aux viandes une analyse par approche métagénomique 16S a été réalisée. L'évolution de la flore totale (ISO 4833-1), des bactéries lactiques (ISO 15214), des entérobactéries (NF V08-154) a été suivie. Les prélèvements ont été réalisés sur les viandes par excision de 25 cm² en surface des rôtis. N=5 échantillons ont été analysés par semaine et par modalité. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SAS version 9.2 avec les tests de khi-2 et de FISHER.

Résultats et discussion

Microbiologie : La surveillance microbiologique de la flore totale a mis en évidence trois scénarios distincts. Le témoin avait un niveau de contamination initiale de 4 LOG CFU/cm², cohérent avec les niveaux observés au sein de l'industrie française. Les viandes de porc biopréservées montraient des niveaux de flore totale allant de 7 à 8 LOG UFC/cm². Les niveaux de bactéries lactiques variaient de 7-9 LOG UFC/cm², montrant que la flore totale était principalement composée de bactéries lactiques. Cela a confirmé la bonne colonisation des cultures de protection au cours de l'essai. L'application de la culture 1 a empêché le développement des entérobactéries jusqu'à la 4^{ème} semaine de stockage. Au-delà son efficacité n'a pas été démontrée. En revanche, l'efficacité de la culture 2 (*L. sakei*) contre la croissance des entérobactéries a été démontrée (test de Fisher, p <0,005) de la semaine 1 (S1) à S12 dans le cadre de l'application d'un plan en trois classes (n=5, C1=2, C2=0, M=10 m) avec m = 5 LOG UFC/cm².

Métagénomique des échantillons témoins : En S1, la composition bactérienne était très diverse et comprenait plus de 54 taxons bactériens. Elle était dominée par le genre *Ralstonia* qui représentait près de 23% des séquences identifiées suivies par *Pseudomonas sp.* ou *P. syncyanea* (14,6%). *Lactobacillus sakei* qui est souvent identifié dans la viande de porc représentait 2,5% des séquences. En S5, deux espèces *Carnobacterium divergens* et *C. maltaromaticum* (Imaki *et al.*, 2011) ont émergé, représentant 77% des séquences et mettant en évidence une diversité bactérienne inférieure de l'échantillon. *Lactococcus piscium* a été détecté pour la première fois, représentant jusqu'à 12% des séquences. Entre S1 et S5, S6, S7 10% de la composition bactérienne correspondait à une espèce inconnue actuellement. En S6, S7 et S8, l'échantillon témoin était dominé par *C. divergens* ou *C. maltaromaticum* et *L. piscium* était faiblement détecté (de 0,7% à 3,5% dans les séquences). *L. sakei* représentait 11% des séquences en S7 et S8. En S9, *L. piscium* est devenu dominant (46,8% des séquences) avec *C.*

maltaromaticum (32,6%). En S10, l'émergence de *Leuconostoc gelidum* était observée (31%), cette espèce devenant l'une des espèces les plus dominantes. Cette espèce est capable de croître à des températures inférieures à 4°C et est décrite comme responsable d'altération type « odeur de vinaigre », « décoloration », « production de gaz et de poissage » dans les viandes. Deux autres bactéries ont également pris une place importante : *L. piscium* (22,8%) et *C. divergens* (21,6%). *L. piscium* est une bactérie que l'on retrouve dans la viande fraîche emballée sous vide, son effet sur le porc sous atmosphère protectrice a été démontré. *C. divergens* est une bactérie anaérobie, hétérofermentaire et faiblement aéro-tolérante et est fréquemment isolé à partir de produits laitiers, de viande, de poisson et de crevettes. Elle est impliquée dans l'altération de la viande fraîche. En S11, *L. gelidum* est devenu dominant, avec 60% des séquences tandis que *C. divergens*, *L. sakei* et *L. piscium* représentaient chacun en moyenne 10% des séquences. En S12 et S13, *L. piscium* et *C. divergens* sont devenus dominants à nouveau, et, ensemble représentait de 70,3% (S12) à 81,8% (S13) des séquences identifiées.

Métagénomique des échantillons biopreservés avec la culture 1 (*P. acidilactici*) : De la S1 à la S4, la culture protectrice 1 était dominante, et représentait 94,5% à 98,6% des séquences identifiées dans l'échantillon. En S5, les deux espèces *C. maltaromaticum* et *C. divergens* ont émergé, cette évolution est similaire à celle observée dans l'échantillon témoin. S5, *L. piscium* a été détectée dans 3,6% des séquences. À partir de S7 et jusqu'à S9, *L. sakei* qui représentait auparavant moins de 0,5% des séquences est devenu dominant et représentait entre 52,2% et 79,2% des séquences en S9. Entre S7 et S8, cette domination a été partagée avec *C. divergens* (≈ 25%). En S10, comme dans le témoin, l'émergence de *L. gelidum* a été observée (36,5%). Cette espèce, ainsi que *L. sakei* (42,8%), représentaient les deux espèces dominantes identifiées dans la viande de porc, alors que *C. divergens* ne représentait que 3,1% des séquences. En S11, le scénario était similaire avec une prévalence plus élevée de *L. sakei* (68,7%). En S12, *L. sakei* est devenu subdominant (4,1%) au profit de *L. piscium* alors que *L. gelidum* est resté prédominant avec 55,6% des séquences détectées. En S13, comme dans le témoin, *C. divergens* et *L. piscium* dominaient l'échantillon avec 36,4% et 23,7% des séquences identifiées respectivement. *L. sakei* était la troisième espèce dominante avec près de 13% et *L. gelidum* représentait 6,8% des séquences identifiées. A partir de la S5, l'évolution de la composition bactérienne des échantillons inoculés avec la culture 1 (*P. acidilactici*) était similaire à celui observé dans l'échantillon témoin. Cela démontre que, dans les conditions de notre expérience, la culture 1 n'a pas été compétitive et a été supplantée par la flore bactérienne naturellement présente dans la viande de porc.

Métagénomique des échantillons biopréservés avec la culture 2 (*L. sakei*) : Quel que soit le stade de l'analyse, la souche de *L. sakei* de la culture 2 était toujours largement dominante dans les échantillons de 99,8% à 100% des séquences. Cette culture de protection était particulièrement adaptée pour se développer sur la viande de porc. Inoculée jusqu'à 6 LOG UFC/cm², cette culture a été suffisamment compétitive pour rivaliser avec la flore bactérienne d'origine naturelle dans la viande de porc.

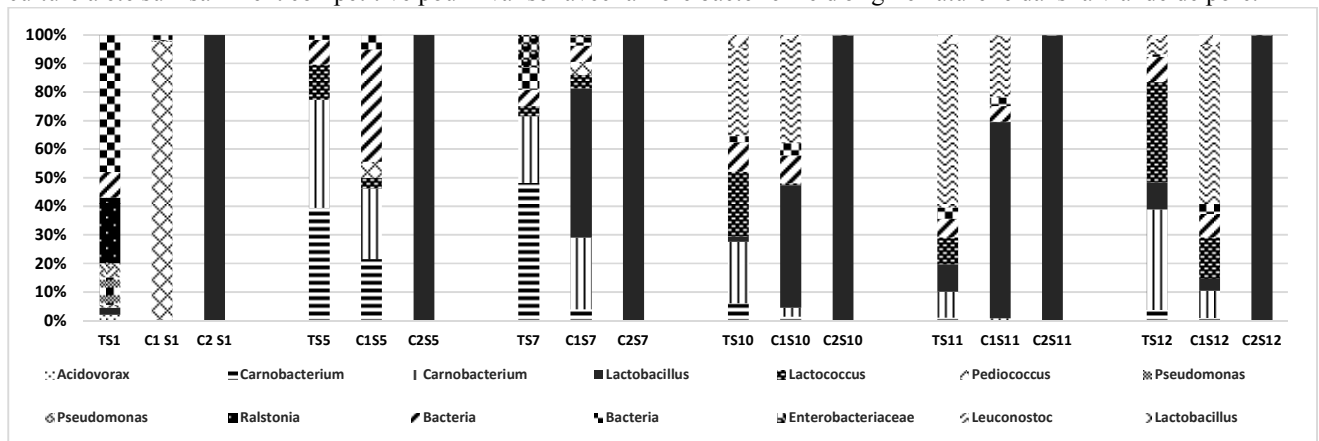


Figure 1 : Proportion (%) des espèces bactériennes dans les échantillons (Témoin (T), Cultures 1&2 (C1, C2)) pendant les semaines 1 à 12 (S1-S12)

Conclusion

Les résultats de cette étude sont très encourageants. L'analyse métagénomique 16S de la dynamique de la flore bactérienne d'échantillons de viande de porc suivis pendant 12 semaines nous a donné un nouvel aperçu des compétitions bactériennes qui s'opèrent pendant le stockage. La biopréservation représente une nouvelle avancée dans la conservation longue durée de la viande de porc. Cependant, le choix d'une culture protectrice adaptée à la matrice alimentaire est primordial afin que la souche utilisée ne soit pas supplantée par la flore bactérienne endogène.

Références bibliographiques

Bozec A., Minvielle B., Vautier A., Le Roux A. (2005). Techniporc, vol 28, n°1.
 Imazaki P.H, Tahiri A., Rodrigues A., Taminiau B., Nezer C., Daude G., Clinquart A (2011). University of Liège