

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE
VÉGÉTAL-ENVIRONNEMENT-NUTRITION-AGRO-ALIMENTAIRE- MER (VENAM)

Année 2009

N° attribué par la bibliothèque

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

Caractérisation moléculaire de l'écosystème microbien complexe de la crevette cuite et étude des flores d'altération

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie et Biologie des Organismes

Spécialité : Microbiologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Emmanuel JAFFRÈS

Le 20 mars 2009, devant le jury

Président	M. FLEURENCE Joël, Professeur à l'Université de Nantes
Rapporteurs	Mme ZAGOREC Monique, Directeur de Recherche à l'INRA, Jouy-en-Josas M. MILLIERE Jean-Bernard, Professeur à l'Université de Nancy
Examineurs	Mme LONVAUD Aline, Professeur à l'Université de Bordeaux M. DOUSSET Xavier, Professeur à l'ENITIAA, Nantes M. JOFFRAUD Jean-Jacques, Cadre de Recherche à l'IFREMER, Nantes
Membre invité	M. PREVOST Hervé, Professeur à l'ENITIAA, Nantes

Directeur de thèse : M. DOUSSET Xavier, Professeur • ENITIAA
Co-encadrant de thèse : M. JOFFRAUD Jean-Jacques, Cadre de Recherche • IFREMER

A mon père...

*A ma mère qui a toujours cru en moi
et qui m'a toujours soutenu quels que soient les choix
et les voies que j'ai empruntés*

A mes frères qui m'ont toujours encouragé

A Ariane dont le fil m'a servi de guide pendant ces trois années et auparavant

A Jean-Claude, au reste de ma famille et amis

- Loi de Murphy régissant l'incertitude biologique -

« Dans des conditions parfaitement contrôlées de pression, température, humidité, volume, taux d'oxygène, débit et autres variables, un micro-organisme fera absolument et uniquement tout ce qu'il lui plaira. »

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres de mon jury, d'avoir accepté d'évaluer ce travail de recherche. Plus particulièrement, je remercie Madame Monique ZAGOREC, Directrice de Recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas, et Monsieur Jean-Bernard MILLIÈRE, Professeur à l'IUT de Nancy, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je suis également reconnaissant à Madame Aline Lonvaud, Professeur à l'Université de Bordeaux et Monsieur Joël Fleurence, Professeur à l'Université de Nantes d'avoir bien voulu faire partie de mon jury.

J'adresse ma profonde gratitude à Monsieur Jean-Luc VALLET, responsable du Département Sciences et Techniques Alimentaires Marines (STAM) du centre IFREMER de Nantes, et Monsieur Hervé PRÉVOST, Professeur à l'ENITIAA de Nantes et Directeur Scientifique de l'UMR INRA 1014 SECALIM, pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires respectifs pour réaliser l'ensemble de mes travaux de thèse.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Xavier DOUSSET, Professeur à l'ENITIAA de Nantes d'avoir été mon directeur de thèse et de m'avoir confié cette thèse. Je le remercie pour son encadrement scientifique, sa disponibilité et son écoute tout au long de ce travail de thèse.

Je remercie vivement Monsieur Jean-Jacques JOFFRAUD, Cadre de Recherche au Département STAM de l'IFREMER de Nantes pour avoir été mon co-encadrant de thèse, pour son investissement, ses conseils et son soutien moral sans faille.

J'exprime également ma profonde gratitude à Madame Danièle SOHIER, responsable de l'Unité IDEA (Interactions et Dynamique des Ecosystèmes microbiens des Aliments) de l'ADRIA de Quimper, pour m'avoir accueilli au sein de cette Unité de Recherche afin que je puisse acquérir la technique TTGE. Je la remercie également pour tous ses conseils scientifiques.

Je tiens à remercier Madame Françoise LEROI, Cadre de Recherche au Département STAM de l'IFREMER de Nantes et Madame Marie-France PILET, enseignant chercheur de l'UMR SECALIM à l'ENITIAA et l'ENV pour leurs conseils scientifiques et leurs encouragements tout au long de ma thèse.

J'adresse également toute ma reconnaissance aux représentants des partenaires scientifiques et industriels du programme IMIBIOMER, et tout particulièrement à Madame Marie-Pierre CASSAGNE et Monsieur Henri FREULON du Pôle Agronomique Ouest pour leur dynamisme et leur encadrement pour mener à bien ce programme.

Merci également à Morgan Guilbaud, post-doctorante à l'INRA de Jouy-en-Josas et ex-doctorante de l'UMR INRA 1014 SECALIM, pour son soutien et pour l'ensemble des informations cruciales qu'elle a su m'apporter.

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

Je remercie tout le personnel du laboratoire de microbiologie de l'ENITIAA, Isabelle, Martine, Maguy, Sylvie, Sabrina, Sébastien et Angélique pour leur soutien technique et leur bonne humeur.

Enfin je remercie également Madame Frédérique GIGOUT, Madame Mireille CARDINAL, Madame Josiane CORNET ainsi que l'ensemble du personnel de Département STAM de l'IFREMER de Nantes qui se souviendront sans doute longtemps d'une petite détonation « micro-ondesque » de bon matin.

Pour finir j'adresse un grand remerciement à l'ensemble des doctorants et stagiaires de tous ces laboratoires et notamment Sébastien, Raoul, Ludovic, Emilie, Papa-Abdoulaye, Clément, Maria, Jitkha, Yanath, Gilles.

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

• Publication dans des revues internationales à comité de lecture :

1. **Jaffres E.**, Sohier D., Leroi F., Pilet M. F., Prevost H., Joffraud J. J. and X. Dousset (2009). Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 131(1), 20-29.

2. **Jaffrès E.**, Guilbaud M., Goldenberg O., Prévost H., Joffraud J.J. and X. Dousset. Molecular fingerprinting of cooked shrimps microbiota by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). Article en voie de soumission dans la revue *Food Microbiology*.

3. **Jaffrès E.**, Prévost H., Joffraud J.J. and X. Dousset. *Vagococcus penaei* sp. nov., isolated from spoilage microbiota of cooked shrimps (*Penaeus vannamei*). Article soumis à *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

4. **Jaffrès E.**, Lalanne V., Cornet J., Cardinal M., Prévost H., Serot T., Dousset X. and J.J. Joffraud. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cooked and peeled tropical shrimps. Article en preparation pour *Food Research International*.

Chapitre d'ouvrage :

Rachman C., Guilbaud M., **Jaffrès E.**, Kabadjova P. et X. Dousset. Caracterisation et identification moléculaire des bactéries lactiques. *Dans Les bactéries lactiques : Métabolisme – Génétique – Applications biotechnologiques*. Ouvrage en voie de publication aux Editions ECONOMICA. Coordination Drider D. and Prévost H.

• Communications orales :

- **Jaffrès E.**, Prévost H., Leroi F., Joffraud J.J. et X. Dousset. Les bactéries lactiques : part importante de la microflore de la crevette cuite. 15^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques (CBL), Rennes, 13 – 15 novembre 2007.

- **Jaffrès E.**, Prévost H., Leroi F., Joffraud J.J. and X. Dousset. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked shrimps during storage by a polyphasic approach. 37th West European Fish Technologists Association (WEFTA) Annual Meeting, Lisbon, Portugal, 24 – 27 october 2007.
- **Jaffrès E.**, Prévost H., Leroi F., Joffraud J.J. et X. Dousset. Caractérisation de l'écosystème microbien de la crevette cuite au cours de sa conservation par une approche polyphasique. 7^{ème} congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Nantes, 30 mai – 1^{er} juin 2007.
- **Jaffrès E.**, Prévost H., Leroi F., Joffraud J.J. et X. Dousset. Caractérisation de l'écosystème microbien de la crevette cuite au cours de sa conservation par une approche polyphasique. Colloque des doctorants de l'IFREMER, Nantes, 15 – 16 septembre 2008.

• Communications affichées :

- Hénaff N., **Jaffrès E.**, Huchet V., Dousset X., Joffraud J.J. and D. Sohier. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis for global analysis of bacterial ecosystem dynamics in seafood samples. 21st International ICFMH Symposium, Foodmicro 2008 “Evolving Microbial Food Quality and Safety” Aberdeen, Scotland, 1st – 4th September 2008.
- Guilbaud M., **Jaffrès E.**, Joffraud J.J., Prévost H. et X. Dousset. Utilisation de la Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) pour le suivi de la dynamique d'une flore microbienne. 15^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques (CBL), Rennes, 13 – 15 novembre 2007.
- **Jaffrès E.**, Prévost H., Leroi F., Joffraud J.J. et X. Dousset. Caractérisation de l'écosystème microbien de la crevette cuite au cours de sa conservation par une approche polyphasique. 7^{ème} congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Nantes, 30 mai – 1^{er} juin 2007.
- **Jaffrès E.**, Prévost H., Leroi F., Joffraud J.J. et X. Dousset. Empreinte moléculaire de l'écosystème microbien de la crevette cuite. Colloque des doctorants de l'université de Nantes, 16 juin 2007.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. La crevette : économie, production et transformation.....	5
1.1. Définition de la crevette.....	5
1.2. Systématique.....	5
1.3. Morphologie et anatomie des crevettes.....	6
1.4. Composition chimique des crevettes cuites décortiquées.....	7
1.5. Economie de la crevette.....	8
1.5.1. La production halieutique mondiale.....	8
1.5.2. Les techniques de production des crevettes.....	9
1.5.2.1. Crevette de pêche.....	9
1.5.2.2. Crevette d'aquaculture.....	9
1.5.3. Le marché international de la crevette.....	10
1.5.4. Le marché européen de la crevette.....	12
1.5.5. Le marché français de la crevette.....	12
1.5.6. La consommation de crevettes en France.....	13
1.6. Transformation des crevettes (cas des crevettes cuites conditionnées sous atmosphère protectrice).....	14
1.7. Qualité et sécurité des produits de la mer : la réglementation européenne.....	16
1.7.1. Les fondements de la réglementation européenne.....	16
1.7.2. Analyse des dangers microbiologiques et points critiques pour la maîtrise dans le process de fabrication des crevettes cuites.....	17
1.8. Critères microbiologiques applicables aux crustacés cuits.....	18
1.8.1. Les critères d'hygiène des procédés.....	19
1.8.2. Les critères de sécurité autres que <i>Listeria monocytogenes</i>	19
1.8.3. Cas de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
1.8.4. Evolution des critères européens liés à la filière produits de la mer.....	22
2. Microbiologie et altération sensorielle de la crevette cuite.....	22
2.1. Taxonomie et physiologie des principales bactéries isolées de la crevette cuite.....	23
2.1.1. <i>Brochothrix thermosphacta</i>	23
2.1.1.1. Les espèces du genre <i>Brochothrix</i> et leurs habitats.....	23
2.1.1.2. Caractéristiques physiologiques de <i>Brochothrix thermosphacta</i>	24

2.1.1.3.	Rôle de <i>Brochothrix thermosphacta</i> dans les aliments	25
2.1.2.	<i>Carnobacterium</i>	26
2.1.2.1.	Les espèces du genre <i>Carnobacterium</i> et leurs habitats	26
2.1.2.2.	Les caractéristiques physiologiques du genre <i>Carnobacterium</i>	27
2.1.2.3.	Rôle des espèces de <i>Carnobacterium</i> dans les aliments	28
2.1.3.	<i>Enterococcus</i>	29
2.1.3.1.	Les espèces du genre <i>Enterococcus</i> et leurs habitats	29
2.1.3.2.	Les caractéristiques physiologiques des espèces du genre <i>Enterococcus</i>	30
2.1.3.3.	Rôle des espèces du genre <i>Enterococcus</i> dans les aliments.....	30
2.1.4.	<i>Lactobacillus</i>	31
2.1.4.1.	Les espèces du genre <i>Lactobacillus</i> et leurs habitats	31
2.1.4.2.	Les caractéristiques physiologiques des espèces du genre <i>Lactobacillus</i>	31
2.1.4.3.	Rôle des espèces de <i>Lactobacillus</i> dans les aliments.....	32
2.1.5.	Les bactéries à Gram négatif	33
2.2.	Processus d'altération microbienne des produits de la mer	35
2.2.1.	Biochimie de l'altération des produits de la mer.....	35
2.2.2.	Notion de flores spécifiques d'altération dans les produits de la mer.....	37
2.3.	La microflore d'altération de la crevette cuite	38
2.3.1.	La crevette saumurée.....	39
2.3.2.	La crevette non saumurée.....	41

3. Les outils d'analyse de la biodiversité et d'identification des communautés microbiennes dans les aliments

3.1.	Les méthodes culture-dépendantes	42
3.1.1.	Les outils de microbiologie reposant sur l'étude du phénotype des bactéries	42
3.1.1.1.	Les milieux de culture pour l'énumération des bactéries.....	42
3.1.1.2.	L'identification des bactéries fondée sur leurs caractères phénotypiques et biochimiques	43
3.1.2.	Les outils de microbiologie reposant sur l'étude du génotype des bactéries	44
3.1.2.1.	L'hybridation ADN/ADN.....	44
3.1.2.2.	Le séquençage du gène codant l'ARNr-16S.....	45
3.1.2.3.	Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)	48
3.1.2.4.	Polymorphisme de la région intergénique 16S-23S de l'ADNr.....	49
3.2.	Les méthodes culture-indépendantes	50
3.2.1.	Electrophorèse en condition dénaturante : TTGE, DGGE	51
3.2.1.1.	Principe de ces techniques	51

3.2.1.2.	Applications de ces techniques dans les aliments : identification des bactéries sans culture préalable	55
3.2.2.	La DHPLC	56
3.2.2.1.	Principe de cette technique	56
3.2.2.2.	Application de cette technique.....	57
RÉSULTATS		56
Chapitre I		59
Caractérisation de la microflore d'altération de la crevette tropicale décortiquée cuite		
Partie 1 : Etude polyphasique de l'écosystème bactérien de la crevette tropicale décortiquée cuite		61
Partie 2 : Empreinte moléculaire de la microflore de la crevette cuite par Chromatographie Liquide Haute Performance en condition dénaturante		81
Chapitre II		111
Identification d'une nouvelle espèce du genre <i>Vagococcus</i>, . <i>Vagococcus penaei</i> sp. nov., isolée de la microflore de la crevette cuite		
Chapitre III		131
Etude du potentiel d'altération des espèces bactériennes isolées de crevettes tropicales décortiquées cuites		
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION		159
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		174
ANNEXES		171
<u>Communications affichées :</u>		
Annexe I : Hénaff N., Jaffrès E., Huchet V., Dousset X., Joffraud J.J., and D Sohier. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis for global analysis of bacterial ecosystem dynamics in seafood samples. 21st International ICFMH Symposium, Foodmicro 2008 "Evolving Microbial Food Quality and Safety" Aberdeen, Scotland, 1st – 4th September 2008.		
Annexe II : Guilbaud M., Jaffrès E., Joffraud J.J., Prévost H., et X. Dousset. Utilisation de la Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) pour le suivi de la dynamique d'une flore microbienne. 15ème colloque du Club des Bactéries Lactiques (CBL), Rennes, 13 – 15 novembre 2007.		
Annexe III : Jaffrès E., Prévost H., Leroi F., Joffraud J.J et X. Dousset. Caractérisation de l'écosystème microbien de la crevette cuite au cours de sa conservation par une approche polyphasique. 7ème congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Nantes, 30 mai – 1er juin 2007.		

TABLE DES ILLUSTRATIONS

• Figures :

Figure 1 : Morphologie (A) et anatomie (B) générale d'une crevette.....	6
Figure 2 : Principaux produits de la mer exportés en 2005 (% de valeurs exportées).	8
Figure 3 : Répartition de la production mondiale de crevettes entre la pêche et l'aquaculture.....	11
Figure 4 : Diagramme du process de cuisson des crevettes (entières ou décortiquées).	15
Figure 5 : Dendrogramme représentant les similarités de séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr-16S entre les souches types de <i>Brochothrix</i> , <i>Listeria</i> et <i>Sporolactobacillus</i>	24
Figure 6 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr-16S pour les espèces des genres <i>Carnobacterium</i> et <i>Lactobacillus</i>	27
Figure 7 : Evolution de la flore totale, des flores spécifiques d'altération et de l'indice d'altération chimique au cours du stockage.	38
Figure 8 : Structure secondaire de l'ARNr 16S de <i>Escherichia coli</i>	46
Figure 9 : Schéma de la région codant pour l'ARNr 16S, la région intergénique (ISR) 16S-23S et la région codant pour l'ARNr 23S chez <i>Escherichia coli</i>	49
Figure 10 : Insertion du GC-clamp dans le fragment d'ADN amplifié par PCR.	52
Figure 11 : Courbe de dénaturation des fragments amplifiés et position relative de leur bande de migration respective, sur un gel de polyacrylamide après migration électrophorétique en condition de dénaturation thermique (TTGE).	53
Figure 12 : Les différentes étapes dans l'analyse d'une population microbienne par PCR-DGGE/TTGE.....	54
Figure 13 : Rétention de l'ADN dans une colonne de DHPLC	56
Figure 14 : Protocole de suivi analytique des deux lots de crevettes au cours de leur stockage	64
Figure 15 : Profils TTGE de la région V3 du gène codant l'ARNr 16S au cours du stockage des échantillons de crevettes conservés à 5 °C.	67
Figure 16 : Chromatogrammes du suivi des communautés bactériennes dans le lot A stocké à 5 °C par la DHPLC.	86
Figure 17 : Chromatogrammes du suivi des communautés bactériennes dans le lot A stocké à 15 °C par la DHPLC.	87
Figure 18 : Arbre phylogénétique non enraciné construit à partir des séquences du gène codant l'ARNr 16S, avec la méthode de neighbour-joining.	115

• Tableaux :

Tableau 1 : Composition chimique moyenne des crevettes tropicales et nordiques, cuites décortiquées.....	7
Tableau 2 : Production mondiale de crevettes par pays (pêche et aquaculture) en 2004.....	10
Tableau 3 : Répartition de la consommation de crevettes à domicile, par type de produits disponibles sur le marché français en 2006.	13
Tableau 4 : Etape critique (CCP) de la cuisson des crevettes cuites.....	17
Tableau 5 : Etape critique (CCP) du stockage des crevettes cuites.	18
Tableau 6 : Critères d'hygiène applicables aux produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits	20
Tableau 7 : Critères de sécurité autres que <i>Listeria monocytogenes</i> , applicables aux produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits.	20
Tableau 8 : Critères de sécurité relatifs à <i>Listeria monocytogenes</i>	21
Tableau 9 : Régions variables de l'ADNr 16S.....	47
Tableau 10 : Répartition des espèces bactériennes isolées des deux lots de crevettes conservées à 5 °C et 15 °C.....	65

ABRÉVIATIONS

A3C	Association des Cuiseurs de Crevettes et de Crustacés
ABVT	Azote Basique Volatil Total
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ADRIA	Association pour le Développement et la Recherche appliquée aux Industries Agricoles et alimentaires
AFNOR	Agence Française de Normalisation
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AMP	Adénosine monophosphate
ARDRA	Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
A_w	Activity of water (activité de l'eau)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCP	Critical Control Point
CD	Crevette Décortiquée
CE	Communauté Européenne
CEE	Communauté Economique Européenne
CIHEAM	Centre International des Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes
DDBJ	DNA DataBank of Japan
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DLC	Date Limite de Consommation
EFSA	European Food Safety Authority
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ENITIAA	Ecole Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires
FAO	Food and Agriculture Organization
GC/MS	Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
HPLC	High Performance Liquide Chromatography
HX	Hypoxanthine

IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
IMIBIOMER	Interactions Microbiennes et Bio-préservation des Produits de la mer
IMP	Inosine monophosphate
INO	Inosine
ISR	Intergenic Spacer Région
ITS	Internal Transcribed Spacer
LH	Long and Hammer
MLSA	Multilocus Sequence Analysis
NAP	Nitrite Actidione Polymixine
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPP	Nombre le Plus Probable
OFIMER	Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTMA	Oxyde de Triméthylamine
PAO	Pôle Agronomique Ouest
pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentiel hydrogène
RDP	Ribosomal Database Project
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RT-PCR	Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPME	Solid Phase Micro Extraction
STAA	Streptomycine Thallous sulphate Acetate Actidione agar
TEA ⁺	Triéthylammonium Acétate
Tm	Melting Temperature
TMA	Triméthylamine
TTGE	Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultraviolet
VALORIAL	VALOrisation pour la Recherche et l'Innovation Alimentaire (pôle de compétitivité)
VRBG	Violet Red Bile Glucose agar
°C	Degré Celsius

Abréviations des noms de micro-organismes :

<i>Ac.</i>	<i>Aerococcus</i>
<i>Ae.</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Bt.</i>	<i>Brochothrix</i>
<i>Cb.</i>	<i>Carnobacterium</i>
<i>Es.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Li.</i>	<i>Listeria</i>
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Ph.</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>St.</i>	<i>Serratia</i>
<i>Sc.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sw.</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Vc.</i>	<i>Vagococcus</i>
<i>Vb.</i>	<i>Vibrio</i>

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La crevette, souvent qualifiée « d'or rose », constitue le premier produit de la mer échangé dans le monde en terme de valeur, avec environ 10 Milliards d'Euros exportés en 2005. Dans ce contexte, l'Europe domine l'ensemble du marché mondial avec près de 830 000 tonnes importées en 2007. En France, la consommation de crevettes qui concerne essentiellement les crevettes cuites réfrigérées, augmente d'environ 2 % chaque année depuis dix ans. Cette augmentation de la consommation peut être attribuée à l'image santé et nutrition que véhiculent les crevettes et les produits de la mer en général, auprès des consommateurs. Cependant, les crevettes cuites réfrigérées sont considérées comme des denrées alimentaires fragiles d'un point de vue microbiologique et sensibles au processus d'altération provoqué par le développement de certaines bactéries. En effet, bien qu'elles subissent une étape de cuisson réduisant leur charge bactérienne initiale, elles peuvent être recontaminées après cuisson *via* l'environnement, les équipements ou le personnel des usines de transformation. Parmi ces bactéries de recontamination, certaines qualifiées de bactéries spécifiques d'altération mettent en œuvre un métabolisme provoquant l'apparition de modifications organoleptiques indésirables, entraînant une diminution non négligeable de la durée de conservation de ce type de produit (Gram et Dalgaard, 2002). Par ailleurs, dans la nouvelle réglementation européenne (CE n° 1441/2007) relative à la sécurité sanitaire des aliments, il n'existe pas de critères d'hygiène des procédés recommandant la recherche et le dénombrement des flores d'altération des produits de la mer. Néanmoins, dans ce nouveau contexte réglementaire, il est prévu que les professionnels s'approprient eux-même cette question et déterminent dans le cadre de leur entreprise ou de l'interprofession, des critères d'hygiène des procédés pertinents, qui soient adaptés à leurs procédés, à leurs produits et à l'usage attendu de ces derniers.

C'est dans ce contexte que le programme IMIBIOMER (Interactions Microbiennes et Biopréservation des Produits de la mer) a été mis en place. Celui-ci vise à apporter des connaissances sur la microbiologie des produits de la mer et notamment de leurs flores d'altération, pour améliorer la qualité hygiénique et la conservation des crevettes cuites. Il s'agit d'un programme inter-régional financé par les régions Bretagne et Pays de la Loire, labellisé par le pôle de compétitivité Valorial. Il associe des partenaires des deux régions, à la fois scientifiques : IFREMER, ENITIAA, ADRIA et industriels : MITI, Capitaine-Houat, Marine-Harvest et Biocéane.

Ce projet de thèse s'inscrit dans le programme IMIBIOMER, et a pour objectif d'étudier la biodiversité microbienne au sein de l'écosystème complexe que constitue la crevette cuite, et de mettre en évidence les flores impliquées dans le processus d'altération organoleptique de ce produit. Dans ce but, le projet prévoit de mettre en œuvre des outils de microbiologie adaptés. En effet, si les méthodes classiques de numération restent incontournables pour l'analyse des flores des produits alimentaires, elles comportent cependant de nombreuses limites dont le délai important dans l'obtention des résultats et la lourdeur des manipulations qui rendent difficile tout suivi « dynamique ». En outre, certaines populations bactériennes qui ne sont pas ou peu adaptées à la croissance sur des milieux synthétiques ou semi-synthétiques sont donc sous-estimées par les milieux utilisés. Pour remédier à ce biais méthodologique, des outils moléculaires dit « culture-indépendants » s'affranchissant de l'utilisation des milieux de culture seront développés dans cette recherche pour étudier, à l'aide d'empreintes génétiques, l'écosystème microbien de la crevette et notamment ses flores d'altération. Celles-ci seront caractérisées de manière approfondie et leur potentiel d'altération sera étudié à l'aide des méthodes d'analyse sensorielle, et des techniques biochimiques pour la recherche des composés volatils produits par ces bactéries.

Ce document expose dans un premier temps les connaissances actuelles et les données qui ont été nécessaires à la réalisation de ce travail, au travers d'une revue bibliographique comprenant trois parties. Une première partie qui replace la crevette dans un contexte économique et industriel. La deuxième partie est consacrée à la microbiologie et à l'altération de la crevette. Enfin, la troisième partie présente les outils d'analyse de la biodiversité et d'identification des communautés microbiennes dans les aliments.

La partie correspondant aux résultats de ce travail de thèse comporte trois chapitres :

- Le chapitre I est consacré à la caractérisation de la microflore d'altération de la crevette tropicale décortiquée cuite avec, dans une première partie, la mise en œuvre d'une approche polyphasique combinant des techniques culture-dépendantes et indépendantes, notamment la TTGE. Cette approche a permis de mettre en évidence et de suivre la dynamique des principaux genres et espèces de bactéries présents dans ce produit. Dans une deuxième partie, la microflore des crevettes cuites a été caractérisée à l'aide d'une nouvelle technique d'empreinte moléculaire, la DHPLC.

- Le chapitre II concerne l'identification et la description d'une nouvelle espèce bactérienne, *Vagococcus penaei* sp. nov., isolée de la microflore d'altération des crevettes décortiquées cuites.

- Le chapitre III porte sur l'étude du potentiel d'altération des principales espèces bactériennes isolées de la microflore de crevettes décortiquées cuites, en mettant en œuvre un suivi sensoriel ainsi que, pour les bactéries spécifiques d'altération, une analyse des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Enfin ce document présente une discussion générale et une présentation des perspectives résultant de ce travail pour une meilleure connaissance de la microbiologie des produits de la mer et notamment des crevettes cuites en vue de mieux maîtriser leur conservation.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

1 La crevette : économie, production et transformation

1.1 Définition de la crevette

D'un point de vue étymologique, le terme crevette vient du latin *-caridis*, qui a donné le nom carididé, qui désigne les arthropodes crustacés dont font partie les crevettes. Le terme crustacé provient lui même du latin *crusta* qui signifie « croûte » ou « recouvert d'une enveloppe dure » (Le Garff, 1998). La crevette est donc le nom vernaculaire (aussi connue comme chevrette ou chevrollette dans certaines régions de la Francophonie) traditionnellement donné à un ensemble de crustacés décapodes aquatiques, nageurs, essentiellement marins mais aussi dulçaquicoles (eaux douces ou saumâtres), possédant un corps protégé par une carapace segmentée dont chaque segment, relié aux autres par des membranes articulaires, porte typiquement une paire d'appendices articulés. Leur corps est enclos dans une cuticule tégumentaire chitineuse sécrétée par l'épiderme. Par tradition, deux termes anglo-saxons sont utilisés pour désigner la crevette : « shrimp » et « prawn ». D'un point de vue systématique, le terme « prawn » qualifie les crevettes de l'infra-ordre *Dendrobranchiata*, alors que le terme « shrimp » qualifie quant à lui, les crevettes de l'infra-ordre *Caridea*. Toutefois, ces deux termes sont couramment employés de façon interchangeable pour dénommer plusieurs espèces dans différentes régions du monde. Conventionnellement, la FAO réserve le terme « shrimp » pour les crevettes d'eaux marines et saumâtres, et le terme « prawn » pour les espèces d'eaux douces (données FAO, 1998).

1.2 Systématique

Dans la classification zoologique universelle, les crevettes appartiennent à l'embranchement des *Arthropoda*, au sous-embranchement des *Crustacea*, à la classe des *Malacostraca*, à l'ordre des *Decapoda* (qui comprend également les crabes, écrevisses, homards, langoustes et galathées) et au sous-ordre des *Natantia* (Dore et Frimodt, 1987). Bien que d'apparences similaires entre elles, les crevettes se distinguent par leur structure segmentaire variée, qui les classe dans trois infra-ordres différents : *Dendrobranchiata*, *Caridea*, *Stenopodidea*. Ces deux premiers infra-ordres regroupent la quasi totalité des espèces d'intérêt commercial, dont les crevettes de la famille des *Penaeidae* (*Dendrobranchiata*) encore appelées « crevettes tropicales ou d'eau chaude », les deux espèces les plus commercialisées étant, *Penaeus monodon* et *Penaeus vannamei*. L'infra-ordre des *Caridea* comprend quant à lui les crevettes

de la famille des *Pandalidae*, encore appelées « crevettes nordiques ou d'eau froide », les deux espèces les plus commercialisées étant, *Pandalus platyceros* et *Pandalus borealis*.

1.3 Morphologie et anatomie des crevettes

Les crevettes présentent un exosquelette appelé communément la carapace. Elle est composée en grande majorité de chitine et de carbonate de calcium. Le corps est constitué de deux parties principales : d'une part le céphalothorax qui comprend la tête (céphalon) et le thorax (péréion) et d'autre part l'abdomen ou pléon composé de 6 segments articulés (figure 1A). Le corps de la crevette se termine par la queue, constituée par le telson qui a une forme souvent triangulaire et qui abrite ventralement l'anus de la crevette, et l'uropode qui sert de gouvernail lors des nages en pleines eaux. La quasi totalité des organes sont localisés dans le céphalothorax (figure 1B). Seul l'intestin traverse l'abdomen et aboutit à l'anus, à la face ventrale du telson.

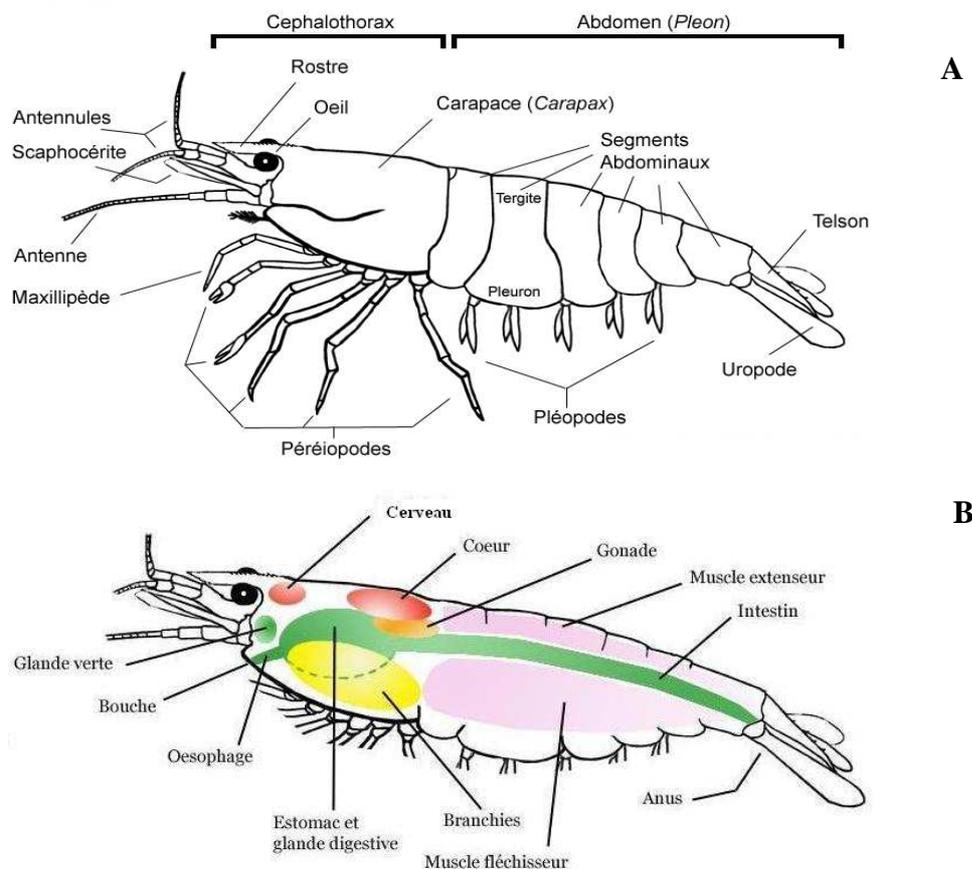


Figure 1 : Morphologie (A) et anatomie (B) générale d'une crevette (Quéro et Vayne, 1998).

1.4 Composition chimique des crevettes cuites décortiquées

La mesure des composés chimiques a été réalisée uniquement sur la partie comestible des crevettes, c'est-à-dire sur la chair abdominale débarrassée de sa carapace. Les lipides et les glucides sont à l'état de traces alors que les protéines totales représentent en moyenne 20 g pour 100 g de chair de crevette (tableau 1). Ces protéines renferment une très grande diversité en acides aminés avec des proportions plus élevées pour les acides aminés suivants : acide glutamique, acide aspartique, lysine, arginine, leucine. L'élément minéral majeur est le sodium.

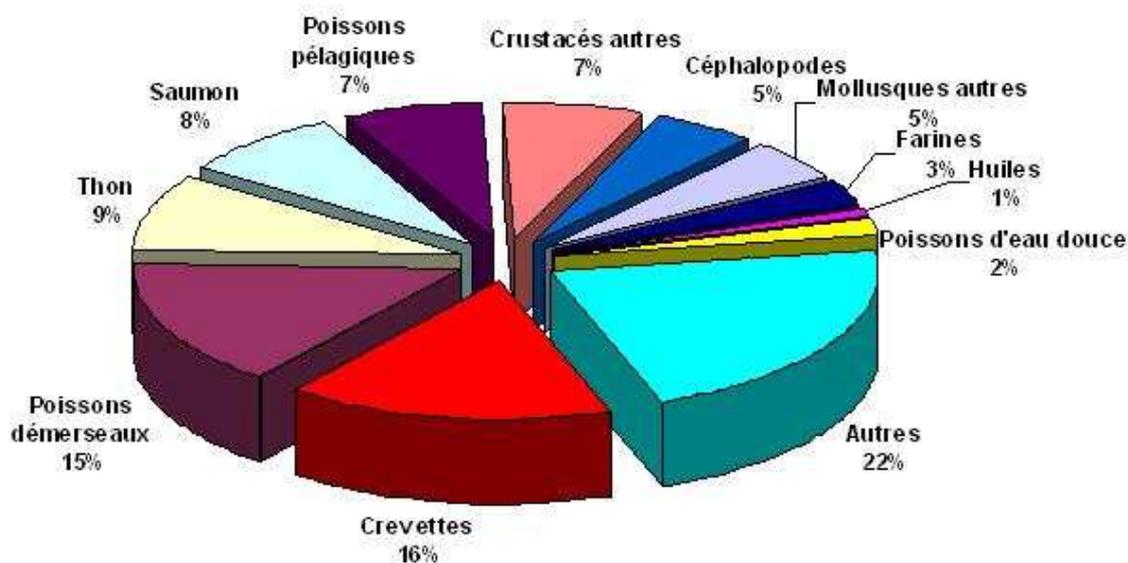
Tableau 1 : Composition chimique moyenne des crevettes tropicales et nordiques, cuites décortiquées (Danish-National-Food-Institut, 2006 ; Pôle-Filière-Produits-Aquatiques, 2007)

Composition (g / 100g)	crevettes tropicales (ex : <i>Penaeus vannamei</i>)	crevettes nordiques (ex : <i>Pandalus borealis</i>)
Humidité	73,90	80,90
Cendres	2,90	1,60
Protéines totales	22,60	16,80
Glucides	0,30	0,00
Lipides totaux	0,30	1,10
Sodium	0,73	0,58
Potassium	0,28	0,084
Phosphore	0,17	0,11
Acide glutamique	3,47	2,40
Acide aspartique	2,10	1,80
Lysine	1,77	1,50
Leucine	1,61	1,30
Arginine	1,78	1,30

1.5 Economie de la crevette

1.5.1 La production halieutique mondiale.

La production mondiale des produits de la mer n'a cessé d'augmenter depuis 1950 pour atteindre 143 millions de tonnes en 2007 (FAO-CIHEAM/Lem, 2007). Les deux tiers de cette production sont encore assurés par la pêche avec 91 millions de tonnes pour une production de 52 millions de tonnes par l'aquaculture. Toutefois, on observe depuis la fin des années 1980, une augmentation de la production aquacole, qui est notamment nécessaire pour satisfaire la demande mondiale croissante en produits de la mer. En terme d'échanges commerciaux, cette production mondiale se traduit également par un accroissement des valeurs exportées qui ont atteint 60 Milliards d'Euros en 2006, soit plus de 9,6 % par rapport à l'année 2005, avec une répartition pratiquement égale entre les pays développés et en voie de développement. Parmi l'ensemble des ressources halieutiques disponibles, la crevette constitue le premier marché des exportations avec 16 % soit environ 10 Milliards d'Euros exportés en 2005 (figure 2).



**Figure 2 : Principaux produits de la mer exportés en 2005 (% de valeurs exportées)
(FAO-CIHEAM/Lem, 2007)**

1.5.2 Les techniques de production des crevettes

1.5.2.1 Crevette de pêche

Les principales techniques de pêche utilisent le chalut de fond, le chalut pélagique, le filet maillant ou les casiers (OFIMER, 2001). Dans la plupart des pays producteurs, co-existent une pêche côtière traditionnelle utilisant des embarcations à pagaie ou à voile et des engins dormants (filets maillants, sennes de plage, casiers), une pêche artisanale avec de petites embarcations motorisées armées de mini-chaluts et une pêche hauturière avec des bateaux puissants, armés de chaluts à tangon appelés également « chaluts floridiens ». Ces derniers bateaux sont équipés pour conditionner et congeler les crevettes en mer et débarquer un produit fini. La plupart des grands armements crevettiers industriels appartiennent aux pays développés ou sont le fruit de joint-ventures avec des entreprises locales.

1.5.2.2 Crevette d'aquaculture

L'élevage des crevettes se pratique depuis des siècles en Asie du Sud-Est selon des méthodes traditionnelles. Toutefois, le stade commercial et industriel n'a été véritablement atteint qu'au début des années 1970 afin de répondre à une demande croissante provenant des Etats-Unis, du Japon et de l'Europe occidentale (Rönnbäck, 2001). Elle s'est considérablement accrue entre 2002 et 2004, devenant la branche aquacole la plus florissante avec un taux de croissance de 28,7 % sur cette période et 2,6 millions de tonnes produites en 2005. Les progrès technologiques ont permis d'élever des crevettes avec des densités toujours plus élevées. La grande majorité des crevettes d'élevage appartiennent à la famille des *Penaeidae* avec essentiellement les espèces *Penaeus monodon*, *Penaeus vannamei* et *Penaeus chinensis* qui représentent près de 80 % de la totalité des élevages. Dans l'élevage des crevettes, le cycle biologique se déroule dans des conditions contrôlées. Les raisons en sont une plus grande intensification de l'élevage, un meilleur contrôle de la taille permettant une plus grande homogénéité des crevettes produites, un meilleur contrôle des prédateurs, ainsi que la possibilité d'accélérer le cycle en maîtrisant les facteurs climatiques. Il existe quatre niveaux d'élevage de crevettes en fonction de leur densité : par ordre croissant de densité on distingue les élevages extensifs, semi-intensifs, intensifs et super-intensifs.

1.5.3 Le marché international de la crevette.

D'après les statistiques de la FAO (Leung et Engle, 2007) et en tenant compte de la grande incertitude entourant les données relatives à la Chine, la production mondiale de crevettes peut être estimée à 6 millions de tonnes en 2004, soit 4 % de la production mondiale de produits aquatiques destinés à l'alimentation humaine (tableau 2). Cette production recouvre un très grand nombre d'espèces réparties dans toutes les zones géographiques. Cependant, dix pays réalisent plus des deux tiers de la production mondiale : la Chine, l'Inde, l'Indonésie, la Thaïlande, le Vietnam, les Etats-Unis, le Canada, le Mexique, la Malaisie et l'Equateur. L'Asie et l'Amérique du Sud fournissent des crevettes tropicales qui représentent 86 % de la production mondiale de crevettes, tandis que l'Amérique du Nord et l'Europe sont les principaux fournisseurs de crevettes nordiques. Les crevettes tropicales proviennent majoritairement de la pêche avec 3 millions de tonnes pêchées en 2004, mais aussi de l'élevage pour plus du tiers, avec 2,4 millions de tonnes. En revanche, toutes les crevettes nordiques proviennent de la pêche avec 542 000 tonnes. En dehors de la Chine, les principaux producteurs de crevettes de pêche sont l'Inde, l'Indonésie et la Thaïlande pour les crevettes d'eau chaude, le Groenland, la Norvège et l'Islande pour les crevettes d'eau froide.

**Tableau 2 : Production mondiale de crevettes par pays (pêche et aquaculture) en 2004
(Leung et Engle, 2007)**

Pays	Milliers de tonnes	%
Chine	2421	40
Inde	554	9
Indonésie	490	8
Thaïlande	471	8
Vietnam	382	6
Canada	177	3
USA	144	2
Mexique	120	2
Malaisie	109	2
Autres	1210	20
Total	6078	100

La figure 3 présente la répartition de la production de crevettes par l'aquaculture et la pêche (FAO-Globefish/Josupeit, 2004). Après une forte progression de la production aquacole au cours des années 1980 et jusque dans le début des années 1990 qui atteint en 1992 près de 30 % de la production totale de crevettes, on constate depuis une légère diminution de l'aquaculture. En dépit de l'augmentation continue du nombre de fermes d'élevage et de l'arrivée de nouveaux pays producteurs, l'absence de croissance de la production est due aux nombreux accidents sanitaires qui ont frappé les différentes zones d'élevage à tour de rôle depuis une dizaine d'années. Le dernier en date est le virus « Whitespot » qui a décimé les élevages de l'Equateur en 1999 et en 2000. Actuellement, le premier producteur de crevettes d'élevage est la Chine avec 935 000 tonnes en 2004, suivie par les autres pays de la ceinture inter-tropicale asiatique (Thaïlande, Vietnam, Indonésie, Inde,) et par les pays d'Amérique Centrale et du Sud (Brésil, Equateur, Mexique). Il faut noter l'émergence de nouveaux producteurs de crevettes d'élevage tels que Madagascar, l'Iran, l'Arabie Saoudite ou l'Australie.

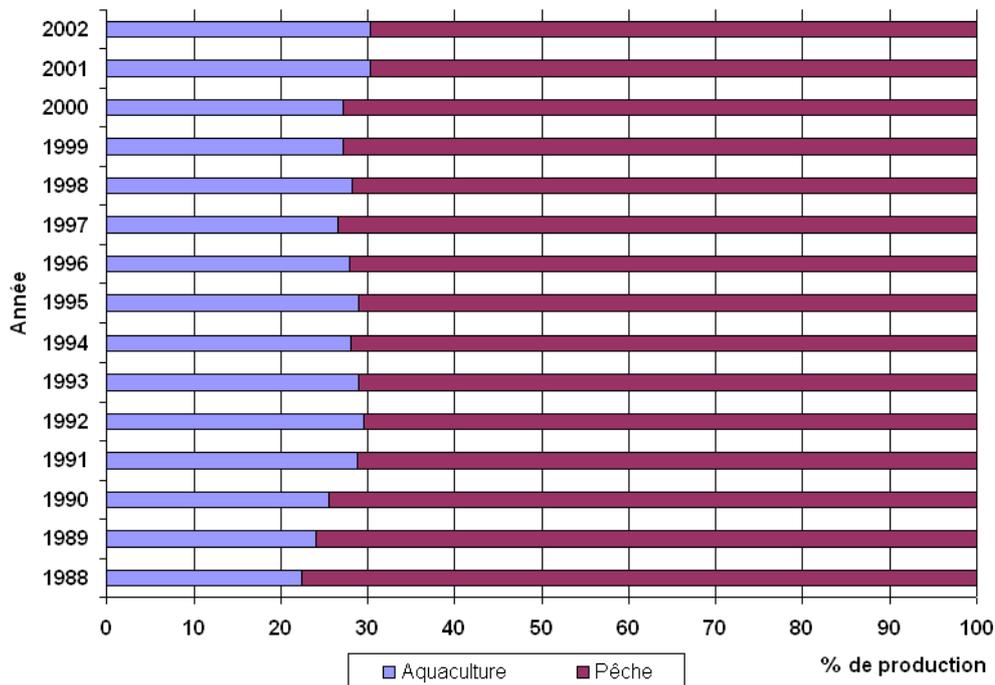


Figure 3 : Répartition de la production mondiale de crevettes entre la pêche et l'aquaculture (FAO-Globefish/Josupeit, 2004)

1.5.4 Le marché européen de la crevette

L'Europe est le premier importateur mondial de crevettes avec près de 830 000 tonnes importées en 2007 (FAO-Globefish/Josupeit, 2008) pour une valeur de plus de 3 Milliards d'Euros (FAO-Globefish/Boisset, 2008a). Ces importations recouvrent deux types de produits : les crevettes crues entières (fraîches ou congelées) pour 630 000 tonnes, et les crevettes préparées (décortiquées, crues ou cuites, congelées ou en conserve) pour 200 000 tonnes. Les principaux pays fournisseurs de crevettes congelées sur le marché européen sont l'Equateur, la Thaïlande et le Groenland. Les principaux pays fournisseurs de crevettes préparées sont l'Islande, la Norvège, le Danemark et récemment l'Argentine. Le marché européen est loin d'être homogène et les consommateurs de chaque pays ont leurs préférences. L'Espagne est le premier importateur européen de crevettes fraîches et congelées avec près de 100 000 tonnes par an, suivi par la France (50 000 tonnes), le Danemark (48 000 tonnes) et l'Italie (40 000 tonnes). Il faut noter cependant que le Danemark achète des crevettes congelées au Groenland pour les transformer et les remettre en vente sur le marché européen après transformation. Le Royaume-Uni est le premier importateur européen de crevettes transformées (40 000 tonnes), suivi par le Danemark (25 000 tonnes), l'Allemagne (15 000 tonnes) et la France (11 000 tonnes). En revanche, l'Espagne n'importe pratiquement pas de crevettes transformées.

1.5.5 Le marché français de la crevette

Depuis 1995, les crevettes représentent sur le marché français le premier poste d'importation des produits de la mer en terme de valeur, devant le saumon et le thon, atteignant 533 millions d'euros en 2004, et le troisième poste en terme de tonnage avec environ 100 000 tonnes importées (OFIMER, 2004). Ces importations ont notamment connu un accroissement important à partir de 2001, passant de 70 000 tonnes à 100 000 tonnes en 2004. Contrairement à l'Espagne et l'Italie, la France a continué d'augmenter ses importations de crevettes dans le premier trimestre (janvier à mars) de l'année 2008 avec 23 500 tonnes pour une valeur de 11,3 millions d'euros, soit une progression de 11 % par rapport à la même période de l'année précédente (FAO-Globefish/Boisset, 2008b). Il s'agit principalement d'une croissance des importations de crevettes entières congelées (+ 15 %), tandis que les produits transformés ont diminué de 4 % et les produits réfrigérés de 19 %. Sur ce premier trimestre, l'Equateur a confirmé sa position de fournisseur numéro un en France avec 4 700 tonnes de crevettes exportées vers la France, soit une augmentation de 63 % de ses exportations par rapport à

2007. L'Inde a atteint la deuxième place avec une augmentation de 4 %. Le Brésil a continué à perdre du terrain avec seulement 1 900 tonnes, soit une diminution de 42 % par rapport à 2007. La croissance générale des importations de crevettes en France est également attribuable à la reprise des exportations malgaches (près de 50 % par rapport à 2007). Madagascar a toujours été un fournisseur traditionnel de crevettes de haute valeur commerciale (crevettes labellisées) sur le marché français. Les exportations colombiennes ont également augmenté de façon constante au cours des dernières années (plus de 62 % en 2008 par rapport à 2007).

1.5.6 La consommation de crevettes en France.

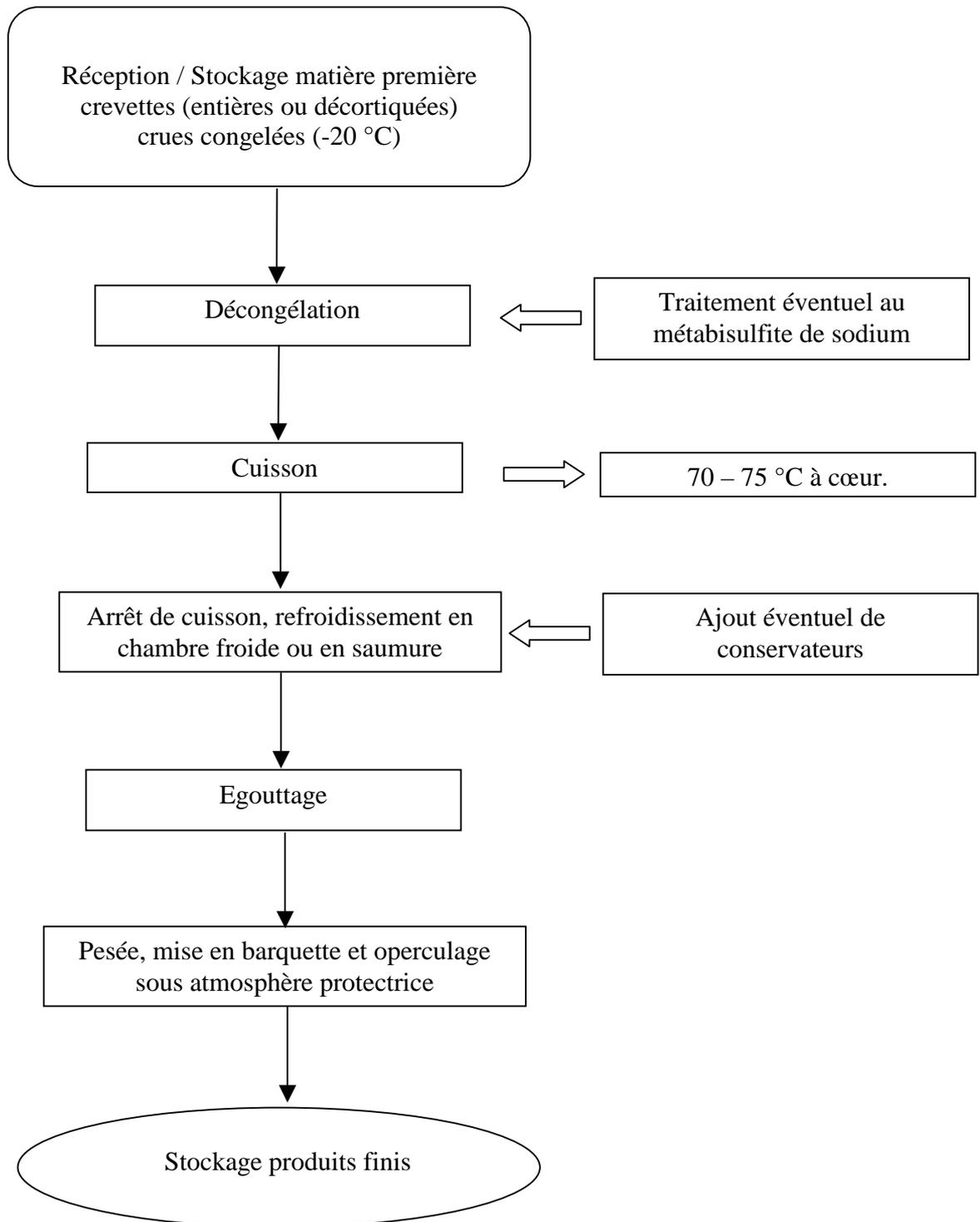
La consommation apparente de crevettes en France peut être estimée à 91 000 tonnes en 2004, soit environ 1,5 kg par an et par habitant (OFIMER, 2005). Plus des trois quarts de la consommation portent sur les crevettes tropicales, soit 75 000 tonnes, contre 16 000 tonnes de crevettes nordiques. Ce sont les crevettes cuites réfrigérées qui ont la faveur des consommateurs français, dans le cadre d'une consommation à domicile (environ 62 acheteurs sur 100), avec 23 688 tonnes achetées en 2006 pour une dépense de 260 millions d'euros, soit un prix moyen de 11 euros le kg de crevettes (tableau 3). Cette consommation se répartit tout au long de l'année avec 1500 à 2000 tonnes de crevettes cuites réfrigérées consommées chaque mois, cependant on constate un pic de consommation pour le mois de décembre avec environ 3000 tonnes soit près de 12 % du volume total consommé chaque année. Le prix au kg reste quant à lui constant tout au long de l'année.

Tableau 3 : Répartition de la consommation de crevettes à domicile, par type de produits disponibles sur le marché français en 2006 (OFIMER, 2006)

Consommation des particuliers à leur domicile en poids net (2006)	Prix moyen (€/kg)	Quantités achetées (tonnes)	Sommes dépensées (K€)	Nombre d'acheteurs / 100 ménages	Part de valeur des GMS
Crevette crues	13,5	1861	25 202	9,70	67 %
Crevettes cuites réfrigérées	11,0	23 688	260 977	61,90	81 %
Crevettes cuites surgelées	9,6	9 515	91 571	28,40	73 %

1.6 Transformation des crevettes (cas des crevettes cuites conditionnées sous atmosphère protectrice)

La majeure partie des crevettes importées en France sont sous la forme de matières premières congelées, crues, décortiquées ou entières. Le processus de transformation comprend les étapes suivantes : décongélation, cuisson, refroidissement en chambre froide ou en saumure, égouttage, mise en barquette, conditionnement sous atmosphère protectrice. Il n'existe pas de règles strictes à suivre pour la cuisson des crevettes, chaque entreprise dispose de son propre procédé, par exemple, certaines usines utilisent un procédé de cuisson en chambres spéciales saturées en vapeur d'eau (Kanduri et Eckhardt, 2002). Certains procédés prévoient également de traiter les crevettes avant cuisson au tripolyphosphate de sodium (STPP), agent de rétention d'eau, ceci afin de prévenir la déshydratation des crevettes (concentration maximum de 10 mg/kg dans le produit fini selon la norme du *Codex alimentarius* (FAO/OMS, 1995). Néanmoins, on constate que le procédé le plus utilisé pour la cuisson reste le bain d'eau bouillante. Un diagramme de process standard, obtenu auprès de l'Association des Cuiseurs de Crevettes et de Crustacés (A3C), est présenté en figure 4. La première étape consiste à décongeler les produits. Cette étape est généralement réalisée dans un bain d'eau douce dont la température peut varier entre 20 et 50 °C. Au cours de cette étape il est possible d'ajouter dans le bain de décongélation, uniquement dans le cas des crevettes entières, du métabisulfite de sodium (concentration maximum de 30 mg/kg dans le produit fini selon la norme du *codex alimentarius* (FAO/OMS, 1995), agent anti-oxydant qui permet de lutter contre la mélanose ou noircissement des crevettes lié à une action enzymatique produisant de la mélanine de couleur noire. La durée de cette étape est en moyenne d'une dizaine de minutes. Les crevettes sont ensuite placées dans des paniers métalliques qui sont plongés dans le bain de cuisson. Celle-ci se déroule en eau douce ou salée (entre 20 et 40 %) chauffée à une température de 90 à 100 °C. En 2 à 5 minutes, les crevettes atteignent une température à cœur d'environ 75 °C. Elles sont ensuite refroidies soit en chambre froide soit dans un bain de saumure (environ 15 % de sel) qui peut contenir des conservateurs comme les acides organiques (acides citrique, sorbique, benzoïque, lactique, ascorbique) ou encore le diacétate ou le benzoate de sodium. Les crevettes sont ensuite égouttées et conditionnées sous atmosphère protectrice, avec des mélanges gazeux qui peuvent être très variés, allant de 100 % de CO₂ au mélange de trois gaz : CO₂, N₂, O₂ dans diverses proportions. Cependant le mélange 50 % CO₂, 50 % N₂ est le plus répandu.



**Figure 4 : Diagramme du process de cuisson des crevettes (entières ou décortiquées)
(modifiée d'après A3C, 2006)**

1.7 Qualité et sécurité des produits de la mer : la réglementation européenne

1.7.1 Les fondements de la réglementation européenne

Le livre blanc de la commission sur la sécurité alimentaire, adopté le 12 janvier 2000, avait fixé des objectifs pour une amélioration de l'expertise scientifique, une responsabilisation des opérateurs, une approche filière et un souci de simplification. C'est sur cette base qu'ont été définies les nouvelles règles communautaires, tout d'abord le règlement 178/2002, entré en vigueur le 1er janvier 2005, puis le « paquet hygiène », au sens strict, qui s'est appliqué au 1er janvier 2006. Le règlement 178/2002 (« Food law ») a institué l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments. Il précise aussi l'obligation de traçabilité, de retrait des produits susceptibles de présenter un risque pour la santé publique et de notification aux autorités.

Ce règlement constitue le socle de la nouvelle législation alimentaire communautaire. Il est complété par un ensemble de règlements relatifs à l'hygiène, certains concernant les professionnels de l'alimentation animale (règlement 183/2004) et de l'alimentation humaine (règlement 852/2004 pour toutes les denrées alimentaires et 853/2004 pour les denrées d'origine animale), et d'autres relatifs aux services de contrôle (règlements 882/2004 et 854/2004). La nouvelle réglementation relative à la sécurité sanitaire des aliments a pour objectif une clarification et une simplification des procédures. Elle remplace ainsi 17 directives sectorielles et la directive horizontale 93/94/CEE.

La nouvelle réglementation européenne concerne l'ensemble de la filière agroalimentaire depuis la production primaire jusqu'au consommateur dans une approche intégrée « de la fourche à la fourchette ». L'esprit général des textes consacre la logique de la « nouvelle approche » apparue en 1993: la réglementation fixe les résultats à atteindre par les professionnels en leur laissant une certaine latitude sur les moyens. La mise en place de procédures basées sur les 7 principes de l'HACCP est généralisée (hormis la production primaire) et le recours aux guides de bonnes pratiques d'hygiène est fortement encouragé. Chaque établissement doit mettre en place un plan de maîtrise sanitaire qui lui est propre, constitué de bonnes pratiques d'hygiène ou prérequis, de procédures basées sur les principes de l'HACCP et de procédures de traçabilité et de retrait/rappel en cas d'alerte. Enfin, le dispositif sépare clairement les responsabilités entre les professionnels et les services de contrôle. Les premiers sont tenus de montrer qu'ils mettent en place toutes les mesures nécessaires afin de répondre aux objectifs fixés par la réglementation. La responsabilité en matière de sécurité sanitaire des aliments leur incombe. L'article 1 du règlement 854/2004

souligne en particulier que la réalisation de contrôles officiels est sans préjudice de la responsabilité juridique primaire de l'exploitant. De plus, le règlement européen CE n°2073/2005, concernant les critères microbiologiques des denrées alimentaires est entré en application le 1^{er} janvier 2006. Ce texte a depuis été modifié par le règlement CE1441/2007.

1.7.2 Analyse des dangers microbiologiques et points critiques pour la maîtrise dans le process de fabrication des crevettes cuites.

Pour l'ensemble du process de fabrication des crevettes cuites (voir figure 4), les deux étapes de la cuisson et du stockage du produit fini peuvent être considérées comme CCP (point critique pour la maîtrise du danger microbiologique des produits finis). L'analyse de ces deux étapes selon une démarche HACCP est présentée dans les tableaux 4 et 5.

**Tableau 4 : Etape critique (CCP) de la cuisson des crevettes cuites
(modifié d'après A3C, 2006)**

Danger considéré	Causes	Mesures de maîtrise	Action de surveillance	Mesures correctives
cuisson				
Danger microbiologique : survie.	Barème de pasteurisation non maîtrisé.	Température à cœur de 75 °C Calcul de la valeur pasteurisatrice.	Enregistrement du barème. Contrôle de l'état de cuisson de la crevette.	Augmenter le barème de pasteurisation. Eliminer les produits non conformes.
	Matière première contaminée.	Respect du cahier des charges des matières première.	Agrément des matières premières à la livraison	Refus des lots non conformes.
	Recontamination par les cuves de cuisson.	Nettoyage, désinfection des cuves.	Contrôles microbiologiques de surface (gélose contact).	Renouveler le nettoyage et la désinfection

**Tableau 5 : Etape critique (CCP) du stockage des crevettes cuites
(modifié d'après A3C, 2006)**

Danger considéré	Causes	Mesures de maîtrise	Action de surveillance	Mesures correctives
Danger microbiologique : multiplication.	Rupture de la chaîne du froid.	Entretien régulier des chambres froides par la maintenance.	Contrôle de la température de la chambre froide par des enregistreurs.	Destruction du produit fini si la rupture de la chaîne du froid dépasse 2h00. Contrôle renforcé de la température des produits mis en chambre froide. Intervention de la maintenance pour réparation immédiate.

1.8 Critères microbiologiques applicables aux crustacés cuits

Auparavant, il n'existait pas de législation européenne en ce qui concerne les critères microbiologiques des denrées alimentaires, mais seulement une réglementation nationale avec l'arrêté du 21 décembre 1979, qui a fait référence pendant 25 ans. Ce texte qui fixait un certain nombre de critères microbiologiques en fonction des denrées alimentaires, ne qualifiait pas ces critères selon qu'ils soient relatifs à la denrée elle-même, ou aux conditions d'hygiène devant être respectées au cours des opérations de fabrication. Ce texte a depuis été abrogé pour laisser place au règlement européen CE n°2073/2005 faisant partie du « paquet hygiène », applicable à la fois aux denrées animales et aux denrées végétales. Il établit un cadre législatif européen unique pour assurer la libre circulation des produits alimentaires et un haut degré de protection des consommateurs. Un des points notables du règlement CE n° 2073/2005 est l'usage de deux termes nouveaux pour qualifier les critères microbiologiques, selon que l'on s'adresse au produit ou au procédé. Il est question désormais de critères de sécurité applicables au produit et de critères d'hygiène des procédés. Le critère de sécurité des denrées alimentaires est un critère définissant l'acceptabilité d'un produit ou d'un lot de denrées alimentaires, applicable aux produits mis sur le marché. Le critère d'hygiène du

procédé est un critère indiquant l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production. Les critères microbiologiques sont établis sur la base d'avis scientifiques publiés par l'agence européenne de sécurité des aliments (EFSA). Ainsi, le règlement CE n° 2073/2005 n'est pas définitif, et il est destiné à faire l'objet de révisions régulières pour tenir compte des progrès scientifiques, technologiques et méthodologiques ainsi que des micro-organismes pathogènes émergents dans les denrées alimentaires et des informations fournies par les évaluations des risques. Depuis son entrée en application, le 1er janvier 2006, le règlement CE n° 2073/2005 a fait l'objet d'une modification avec le règlement CE n° 1441/2007 du 5 décembre 2007 publié le 7 décembre 2007 au Journal Officiel de l'Union Européenne.

1.8.1 Les critères d'hygiène des procédés

Les critères d'hygiène pour les crustacés cuits sont présentés dans le tableau 6. Il convient de préciser que le règlement CE n° 1441/2007 a défini ces critères d'hygiène uniquement pour les produits de crustacés décortiqués cuits, il s'agit des dénombrements d'*Escherichia coli* et des *Staphylococcus* à coagulase positive. Cependant, la direction générale de l'alimentation (DGAL) précise la nécessité ou l'intérêt scientifique du maintien de critères microbiologiques utilisés de longue date (certains critères datant de l'arrêté du 21 décembre 1979) en complément des critères européens applicables au 1er janvier 2006. C'est le cas notamment des micro-organismes aérobies à 30 °C, qui ne doivent pas dépasser pour les crevettes décortiquées cuites, $5 \cdot 10^4$ UFC/g en sortie d'usine et 10^6 UFC/g à la DLC.

1.8.2 Les critères de sécurité autres que *Listeria monocytogenes*

Les critères de sécurité applicables aux crustacés cuits, qui ont été retenus par le règlement CE n° 1441/2007, définissent l'acceptabilité d'un produit ou d'un lot de denrées alimentaires, applicables aux produits mis sur le marché (tableau 7). Ils fixent une limite au-delà de laquelle on doit considérer que la denrée alimentaire est contaminée de manière inacceptable par le ou les micro-organismes pour lesquels ces critères sont établis. Comme dans le cas des critères d'hygiène, la DGAL a précisé l'intérêt de distinguer les produits de crevettes entières ou décortiquées, ce qui n'est pas le cas dans le règlement.

Tableau 6 : Critères d'hygiène applicables aux produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits (règlement CE n° 1441/2007)

Micro-organismes	Plan d'échantillonnage ⁽¹⁾		Limites		Stade d'application	Action en cas de résultats insatisfaisants
	n	c	m	M		
<i>Escherichia coli</i>	5	2	1/g	10/g	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production
<i>Staphylocoques</i> à coagulase positive	5	2	100 UFC/g	1000 UFC/g	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production

⁽¹⁾ : n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs entre m et M.

Tableau 7 : Critères de sécurité autres que *Listeria monocytogenes*, applicables aux produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits (règlement CE n° 1441/2007)

Micro-organismes	Plan d'échantillonnage ⁽¹⁾		Limites		Stade d'application
	n	c	m	M	
<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25g		Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

⁽¹⁾ : n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs entre m et M.

1.8.3 Cas de *Listeria monocytogenes*

La recherche de *Listeria monocytogenes* n'est pas un critère de sécurité propre aux produits de crustacés cuits mais concerne en général tous les produits pouvant favoriser le développement de *Listeria monocytogenes*, c'est-à-dire les produits prêts à être consommés sans opération de cuisson avant ingestion (tableau 8). Une distinction est faite entre le produit fini mis sur le marché et le produit en cours de fabrication avant qu'il ne quitte le contrôle immédiat de l'opérateur qui l'a fabriqué. En cas de présence dans le produit fini, une analyse complémentaire doit être effectuée sur la matière première.

Tableau 8 : Critères de sécurité relatifs à *Listeria monocytogenes* (règlement CE n° 1441/2007)

Produit	Plan d'échantillonnage ⁽¹⁾		Limites		Stade d'application
	n	c	m	M	
Denrées alimentaires prêtes à être consommées pouvant favoriser le développement de <i>Listeria monocytogenes</i> ,	5	0	100 UFC/g ⁽²⁾		Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales					Absence dans 25 g ⁽³⁾

(1) : n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs entre m et M.

(2) : ce critère est applicable lorsque le fabricant est en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 UFC/g pendant toute la durée de conservation. L'exploitant peut fixer, pendant le procédé, des valeurs intermédiaires suffisamment basses pour garantir que la limite de 100 UFC ne sera pas dépassée au terme de la durée de conservation.

(3) : ce critère est applicable aux produits avant qu'ils n'échappent à la maîtrise immédiate de l'exploitant du secteur alimentaire, lorsque celui-ci n'est pas en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 UFC/g pendant toute la durée de conservation.

1.8.4 Evolution des critères européens liés à la filière produits de la mer

Le choix de micro-organismes pertinents est essentiel pour définir des critères d'hygiène des procédés qui soient utiles pour les professionnels d'une filière comme celle des produits de la mer. Les critères d'hygiène des procédés qui ont été définis dans le règlement CE n° 1441/2007 ne répondent pas parfaitement à la problématique des industriels pour garantir la qualité de leurs produits. C'est le cas notamment des flores d'altération, comme les flores psychrotrophes, qui peuvent se développer sur les produits en provoquant des modifications organoleptiques, entraînant une diminution non négligeable de leur durée de conservation. Dans ce nouveau contexte réglementaire, il est donc prévu que les professionnels s'approprient eux-même cette question et déterminent dans le cadre de leur entreprise ou de l'interprofession, des critères d'hygiène des procédés pertinents, qui soient adaptés à leurs procédés, à leurs produits et à l'usage attendu de ces derniers. Il est donc utile de mieux connaître les flores d'altération potentielles de la crevette, si l'on souhaite mettre en place de nouveaux critères d'hygiène des procédés.

2 Microbiologie et altération sensorielle de la crevette cuite

Après capture, à l'état cru, les crevettes sont des denrées très sensibles au processus d'altération microbienne. En effet, elles peuvent être contaminées par des bactéries naturellement présentes dans l'environnement marin d'où elles sont issues, comme *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Serratia* sp., *Shewanella* sp. (Hanninen *et al.*, 1997 ; Gopal *et al.*, 2005 ; Jeyasekaran *et al.*, 2006) ou des bactéries présentes dans leur tube digestif qui n'est pas systématiquement retiré après la capture (Gomez-Gil *et al.*, 1998 ; Al-Harbi, 2003). Ces bactéries peuvent se développer très rapidement sur les crevettes crues qui constituent un environnement favorable au développement microbien, du fait d'un pH neutre (pH proche de 7), d'une activité de l'eau (A_w) élevée et de la présence de composés chimiques de faible poids moléculaire tels que les acides aminés et les nucléotides libres (Chinivasagam *et al.*, 1998 ; Jeyasekaran *et al.*, 2006). Ces composés sont directement utilisables pour la croissance et le métabolisme de ces bactéries, dont certaines vont participer à la production de mauvaises odeurs et saveurs. Toutefois, le traitement par la cuisson qui intervient dans le procédé de transformation des crevettes permet de réduire de manière efficace la charge bactérienne initialement présente sur

les crevettes crues. La microflore d'altération des crevettes cuites a donné lieu à très peu d'études, à part quelques travaux publiés sur les crevettes nordiques. Ces études ont notamment montré que la microflore présente sur les crevettes après la cuisson était dominée par des bactéries à Gram positif comme *Brochothrix thermosphacta* et des bactéries lactiques avec les genres *Carnobacterium*, *Enterococcus* et *Lactobacillus* (Dalgaard *et al.*, 2003 ; Mejlholm *et al.*, 2005 ; Mejlholm *et al.*, 2008).

2.1 Taxonomie et physiologie des principales bactéries isolées de la crevette cuite

2.1.1 *Brochothrix thermosphacta*

Brochothrix thermosphacta a été isolée et décrite pour la première fois par Sulzbacher et McLean (1951) alors qu'ils étudiaient la microbiologie des saucisses de viande de porc. Ces isolats furent d'abord classés dans le genre *Microbacterium* comme nouvelle espèce, *Mb. thermosphactum* (McLean et Sulzbacher, 1953). Cependant, ces mêmes auteurs évoquaient déjà des différences notables entre *Mb. thermosphactum* et d'autres espèces du même genre, notamment au niveau de la morphologie cellulaire. Plus tard, d'autres auteurs ont confirmé non seulement les différences de morphologie mais ont démontré également des différences au niveau des profils protéiques et enzymatiques (Robinson, 1966), de la structure du peptidoglycane (Schleifer, 1970 ; Schleifer et Kandler, 1972) et dans la composition en bases de l'ADN (Collins-Thompson *et al.*, 1972). En conséquence, Sneath et Jones (1976) concluaient que *Mb. thermosphactum* était suffisamment distinct des autres espèces de *Microbacterium* ainsi que de ses plus proches voisins à Gram positif comme *Lactobacillus* et *Listeria* pour constituer un nouveau genre bactérien appelé *Brochothrix*.

2.1.1.1 Les espèces du genre *Brochothrix* et leurs habitats

Le genre *Brochothrix* est très proche sur les plans phénotypique et phylogénétique de *Listeria*. Ces deux genres font d'ailleurs partie de la même famille bactérienne : les *Listeriaceae*. Le dendrogramme ci-dessous (figure 5), établi sur la base des séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr-16S, illustre la parenté phylogénétique de ces deux genres. Actuellement, le genre *Brochothrix* est constitué de deux espèces, *Bt. thermosphacta* et *Bt. campestris*. Ces deux espèces ne partagent pas la même niche écologique. *Brochothrix campestris*, décrit par Talon *et al.* (1988), a été isolée du sol et d'herbe de pelouse. *Brochothrix thermosphacta* est

connue comme étant une bactérie d'altération de la viande de bœuf et de porc (Sakala *et al.*, 2002 ; Bohaychuk et Greer, 2003) et se retrouve également dans la volaille, le saumon et les produits de la mer en général (Rachman *et al.*, 2004a ; Del Rio *et al.*, 2005 ; Mejlholm *et al.*, 2005 ; Hovda *et al.*, 2007b).

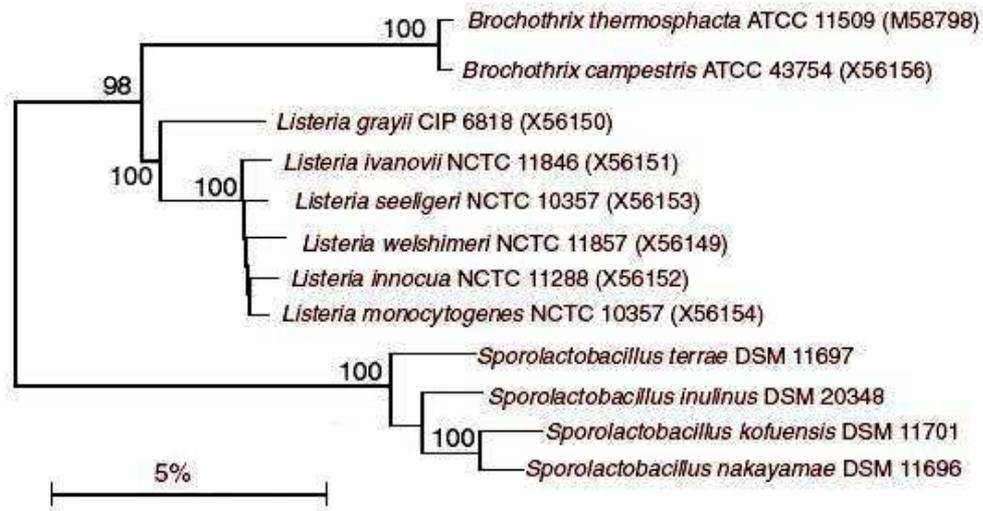


Figure 5 : Dendrogramme représentant les similarités de séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr-16S entre les souches types de *Brochothrix*, *Listeria* et *Sporolactobacillus* (Stackebrandt et Jones, 2006).

2.1.1.2 Caractéristiques physiologiques de *Brochothrix thermosphacta*

Brochothrix thermosphacta est une bactérie à Gram positif qui se présente la plupart du temps sous forme de bâtonnets fins et immobiles (Stackebrandt et Jones, 2006). Elle est anaérobie facultative, non sporulée et produit de la catalase. Psychrotrophe, elle est capable de se développer entre 0 et 30 °C avec un optimum de croissance aux alentours de 25 °C. Le pH optimum de croissance est de 7. D'une façon générale, le métabolisme du glucose de *Bt. thermosphacta* est influencé par la teneur de l'atmosphère en oxygène et en dioxyde de carbone (Pin *et al.*, 2002). Dans des conditions aérobies, *Bt. thermosphacta* produit de l'acétoïne à partir du diacétyle provenant du pyruvate, avec libération d'une molécule d'acétoïne pour une molécule de glucose. En condition anaérobie, le glucose est transformé en

deux molécules d'acide lactique. L'activité lipolytique chez *Bt. thermosphacta* a également été décrite par Papon et Talon (1988). La production de lipase a été observée au cours de la phase exponentielle de croissance et il a été démontré qu'elle était influencée par les conditions de croissance.

2.1.1.3 Rôle de *Brochothrix thermosphacta* dans les aliments

Brochothrix thermosphacta est une bactérie contaminante des viandes réfrigérées (Dainty et Mackey, 1992), elle est non pathogène mais est responsable de la production d'odeurs désagréables. Dans la viande emballée sous vide ou sous atmosphère modifiée, *Bt. thermosphacta* peut devenir prédominante par rapport aux autres genres comme *Carnobacterium*, les *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* (Borch *et al.*, 1996). *Brochothrix thermosphacta* fait partie de la flore de la dinde crue (Samelis *et al.*, 2000), du porc (Bohaychuk et Greer, 2003) et du jambon cuit (Samelis *et al.*, 1998). Pendant la conservation au froid de la viande de bœuf emballée sous vide, la population de *Bt. thermosphacta* peut augmenter jusqu'à 7.10^5 UFC/g au cours des deux premières semaines du stockage pour devenir ensuite indétectable au-delà de cette période (Sakala *et al.*, 2002). Elle a aussi été détectée par DGGE pendant les trois premiers jours de la fermentation de la saucisse (Cocolin *et al.*, 2001). Dans une approche polyphasique d'écologie microbienne, par méthode traditionnelle et par PCR-DGGE, *Bt. thermosphacta* et *Lb. sakei* ont été reconnues comme bactéries dominantes de la saucisse (Cocolin *et al.*, 2004).

Les produits de la mer constituent également un habitat favorable au développement de *Bt. thermosphacta*. Nickelson *et al.* (1980) ont isolé cette bactérie de la chair de poissons hachés, à différents stades de production. D'autres auteurs comme Lannelongue *et al.* (1982) ont isolé *Bt. thermosphacta* de poissons (*Archosargus probatocephalus*) emballés sous CO₂, ou de poissons congelés comme le cabillaud (Gardner, 1981). Sur du thon blanc emballé sous atmosphère modifiée, il a été démontré que la croissance de *Bt. thermosphacta* n'était pas affectée par la présence de CO₂, lorsque l'atmosphère contenait également de l'O₂, en concentration supérieure à 0,2 % (Lopez-Galves *et al.*, 1995). Joffraud *et al.* (2001) et Stohr *et al.* (2001) ont montré que la présence de *Bt. thermosphacta* dans le saumon fumé était à l'origine de la production d'odeurs de beurre, plastique et de fromage bleu associées à l'altération de ce produit. En effet, *Bt. thermosphacta* produit une quantité importante de 2-heptanone et 2-hexanone qui seraient responsables de l'apparition de cette odeur fromage bleu.

2.1.2 *Carnobacterium*

Le genre *Carnobacterium* appartient au groupe des bactéries lactiques. Il a été proposé par Collins *et al.* (1987) à la suite d'une étude taxonomique basée sur l'hybridation ADN-ADN concernant certaines espèces classées antérieurement dans le genre *Lactobacillus* : *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus divergens* et *Lactobacillus piscicola* ainsi que d'autres souches ressemblant à des lactobacilles et isolées de viande de volailles par Thornley (1957).

2.1.2.1 Les espèces du genre *Carnobacterium* et leurs habitats

En 1987, Collins *et al.* ont distingué quatre espèces : *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium gallinarum* et *Carnobacterium mobile*. Ces bactéries ont été isolées essentiellement des produits carnés (Barakat *et al.*, 2000 ; Sakala *et al.*, 2002), des produits de la mer (Ringo *et al.*, 2000 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Paarup *et al.*, 2002 ; Dalgaard *et al.*, 2003) mais aussi de produits laitiers (Millière *et al.*, 1994). En 1991, Franzmann *et al.* ont mis en évidence deux nouvelles espèces du genre *Carnobacterium* (*Cb. funditum* et *Cb. alterfunditum*) qui ont été isolées des eaux du lac Ace en Antarctique. En 2003, Mora *et al.* montrent que *Carnobacterium piscicola* et *Lactobacillus maltaromaticus* sont des synonymes hétérotypiques (ces deux taxons sont identiques mais ont des souches types différentes). L'épithète spécifique *maltaromaticus* ayant priorité sur celle de *piscicola*, les auteurs valident pour ce taxon la nomenclature de *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. Actuellement, les huit espèces constituant le genre *Carnobacterium* sont *Cb. maltaromaticum*, *Cb. divergens*, *Cb. gallinarum*, *Cb. mobile*, *Cb. funditum*, *Cb. alterfunditum*, *Cb. inhibens* et *Cb. viridans*. Un arbre phylogénétique à partir des séquences de l'ADNr 16S est présenté dans la figure 6. Il montre la relation de parenté des espèces de *Carnobacterium* ainsi que la distance relativement éloignée de l'unité taxonomique contenant des *Lactobacillus*. L'analyse des séquences du gène codant l'ARNr 16S de *Cb. gallinarum* et *Cb. mobile* a montré 96 à 98 % d'identité avec *Cb. maltaromaticum* et *Cb. divergens* (Wallbanks *et al.*, 1990) et que *Cb. inhibens* est phylogénétiquement proche de *Cb. alterfunditum* (Rachman *et al.*, 2004b).

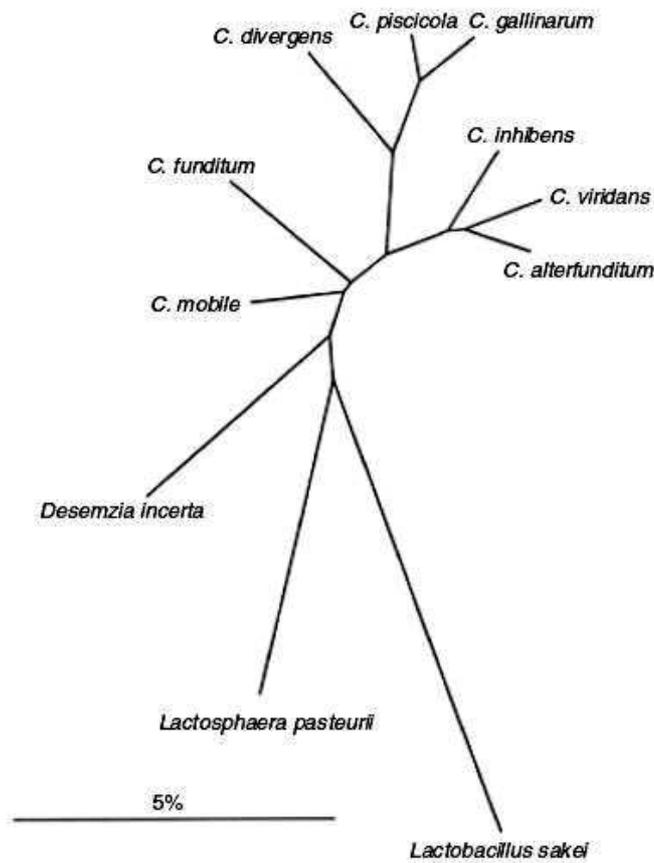


Figure 6 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr-16S pour les espèces des genres *Carnobacterium* et *Lactobacillus* (Hammes et Hertel, 2006).

2.1.2.2 Les caractéristiques physiologiques du genre *Carnobacterium*

Les bactéries appartenant au genre *Carnobacterium* sont des bacilles à Gram positif, isolées ou groupées en chaînettes, mobiles ou immobiles. *Carnobacterium* est une bactérie anaérobie facultative, catalase, oxydase et nitrate réductase négative, psychrotrophe et très faiblement hétérofermentaire (Collins *et al.*, 1987).

Contrairement aux *Lactobacillus*, les *Carnobacterium* sont peu acidifiants. Par ailleurs, trois caractères les distinguent de *Lactobacillus* : l'absence de croissance sur gélose à l'acétate (milieu Rogosa contenant 15 g/L acétate de sodium), la composition en acides gras de la membrane et l'acide *méso*-diaminopimélique qui est l'acide majoritaire du peptidoglycane de la paroi (Hammes et Hertel, 2006). En présence de sucre, le métabolisme de *Carnobacterium*

n'est que très faiblement hétérofermentaire avec une production majoritaire d'acide lactique L(+) (avec un peu de D pour *Cb. maltaromaticum*). Le pourcentage de base azotées Guanine plus Cytosine (G+C) de l'ADN génomique de *Carnobacterium* est compris entre 32 et 37 % (Rachman *et al.*, 2004b).

2.1.2.3 Rôle des espèces de *Carnobacterium* dans les aliments

Plusieurs études mentionnent la présence d'espèces du genre *Carnobacterium* dans les fromages, dont certaines pourraient jouer un rôle bénéfique dans leur texture et leur saveur au cours de l'affinage (Millière *et al.*, 1994). Récemment une méthode de détection et de quantification spécifique du genre *Carnobacterium* par PCR quantitative a été mise au point pour la détection rapide de ce genre dans les fromages ou autres matrices alimentaires (Cailliez-Grimal *et al.*, 2005). *Carnobacterium divergens* et *Carnobacterium maltaromaticum* sont connues pour dominer fréquemment la microflore d'altération de divers produits à base de viande et des produits de la mer, particulièrement les produits emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée (Laursen *et al.*, 2005 ; Leisner *et al.*, 2007 ; Vasilopoulos *et al.*, 2008). Des études ont notamment démontré que ces deux espèces métabolisaient les acides aminés libres ce qui aboutit à la formation de composés volatils spécifiques de l'altération comme l'ammoniac, le diacetyl/acétoïne ou encore le méthylbutanal (Joffraud *et al.*, 2001). A l'opposé, Paludan-Muller *et al.* (1998) ont montré que *Cb. maltaromaticum* inoculée sur du saumon fumé ne semblait pas jouer un rôle dans l'altération du saumon fumé, emballé sous vide ou sous atmosphère modifiée. En revanche, il a été démontré que des souches de *Cb. maltaromaticum* avaient réduit la durée de conservation de la viande de bœuf emballée sous vide (Leisner *et al.*, 1995). Une étude sur le calamar emballé sous vide a montré un rôle d'altération possible de *Carnobacterium* sp., qui est capable de produire de l'ammoniac à partir de l'arginine, présent en quantité importante dans le calamar, ainsi que de la tyramine à partir de la tyrosine (Paarup *et al.*, 2002). La production d'amines biogènes, particulièrement la tyramine par *Cb. divergens* V41 a aussi été étudiée dans le saumon fumé (Connil *et al.*, 2002a ; Connil *et al.*, 2002b). Le gène codant la tyrosine décarboxylase (*tyrDC*) a été déterminé chez *Cb. divergens* (souche 508), il fait partie d'un opéron composé de trois gènes, impliqués dans la production de tyramine (Coton *et al.*, 2004). De plus, *Cb. viridans* est responsable du verdissement de la viande emballée sous vide, observé après ouverture des emballages. Ce verdissement résulte de la production bactérienne de peroxyde d'hydrogène et

de l'exposition de la viande à l'oxygène de l'air qui provoque une oxydation de la myoglobine, avec formation de cholémyoglobine (pigment de couleur verte) (Holley *et al.*, 2002 ; Peirson *et al.*, 2003). Enfin de nombreuses souches de *Carnobacterium* produisent des bactériocines actives contre *Listeria monocytogenes* (Leisner *et al.*, 2007), et certaines d'entre elles ont montré un rôle intéressant dans la biopréservation des aliments (Brillet *et al.*, 2005 ; Edima *et al.*, 2008).

2.1.3 *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus*, qui appartient au groupe des bactéries lactiques, a été séparé du genre *Streptococcus* dans les années 1980 grâce à des études basées sur l'hybridation ADN-ADN et ADN-ARNr (Schleifer *et al.*, 1985 ; Schleifer et Kilpper-Bälz, 1987). Cette séparation a par la suite été confirmée par des analyses de séquences du gène codant l'ARNr-16S qui ont montré que les entérocoques différaient également des lactocoques et des autres coques à Gram positif (Ludwig *et al.*, 1985).

2.1.3.1 Les espèces du genre *Enterococcus* et leurs habitats

Le genre *Enterococcus* compte actuellement 34 espèces (Tanasupawat *et al.*, 2008). Il est phylogénétiquement proche des genres *Melissococcus*, *Vagococcus* et *Carnobacterium* (Cai et Collins, 1994). Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes présentes notamment dans l'intestin de l'homme et des animaux, dans les eaux usées, dans l'eau douce, l'eau de mer, le sol et sur les végétaux. En général, lorsque des espèces du genre *Enterococcus* sont retrouvées dans des écosystèmes autres que l'intestin des hommes ou des animaux, cela témoigne d'une contamination fécale (Flahaut *et al.*, 1997). Plusieurs espèces peuvent cohabiter au sein d'une même niche écologique mais il existe une relative spécificité d'hôte. Ainsi, selon les hôtes, les espèces d'entérocoques les plus fréquemment isolées (Euzéby, 1997 ; Devriese *et al.*, 2006) sont : *Ec. faecalis* et *Ec. faecium* (hommes, chats, chiens, porcs, volailles, plantes, sols et eaux) ; *Ec. durans* (hommes, poulains et volailles) ; *Ec. cecorum* (bovins adultes, porcs et volailles) ; *Ec. canintestini* et *E. canis* (chiens) ; *Ec. hirae* et *Ec. villorum* (porcs) ; *Ec. casseliflavus*, *Ec. haemoperoxidus*, *Ec. moraviensis*, *Ec. mundtii* et *Ec. sulfureus* (plantes, sols et eaux).

2.1.3.2 Les caractéristiques physiologiques des espèces du genre *Enterococcus*

Les entérocoques sont des coques à Gram positif, se présentant de manière isolée, par paires, en courtes chaînes ou en petits amas. Leur morphologie peut varier selon les conditions de culture (Leblanc, 2006). Ce sont des bactéries non sporulées, parfois mobiles (*Ec. casseliflavus*, *Ec. gallinarum*), aéro-anaérobies (anaérobies aérotoleérantes), catalase négative, généralement homofermentaires, se développant avec une température optimale de croissance de 35 °C (Devriese *et al.*, 1993). Les entérocoques possèdent généralement l'antigène du groupe D de Lancefield (DeLisle et Perl, 2003). Les entérocoques sont capables de résister à des conditions hostiles : culture à 10 °C ou à 45 °C, à pH 9,6, en présence de 40 % de bile, de 6.5 % de NaCl, résistance à un chauffage de 60 °C durant 30 minutes ; cependant il existe de nombreuses exceptions (Franz *et al.*, 1999).

2.1.3.3 Rôle des espèces du genre *Enterococcus* dans les aliments

Bien que les entérocoques soient considérés comme des indicateurs de contamination fécale, lorsqu'ils sont retrouvés hors du tractus gastrointestinal humain ou animal, leur présence dans divers aliments (Foulquié Moreno *et al.*, 2006) n'est en revanche pas forcément révélatrice d'une telle contamination. Birollo *et al.* (2001) ont d'ailleurs montré que les entérocoques avaient peu de valeur en tant qu'indicateur d'hygiène dans les industries agro-alimentaires. Néanmoins, ils sont susceptibles de contaminer les aliments comme la viande, le lait et les produits laitiers (Giraffa, 2003 ; Ogier et Serror, 2008), les viandes (Franz *et al.*, 2003 ; Hugas *et al.*, 2003) et les produits de la mer (Dalgaard *et al.*, 2003 ; Mejlholm *et al.*, 2008). *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* peuvent être responsables d'un verdissement des produits carnés (Foulquié Moreno *et al.*, 2006). *Enterococcus faecalis* participe à la maturation des fromages et il est parfois considéré comme un ferment d'arôme contribuant à une saveur prononcée dans les fromages affinés (Ogier et Serror, 2008). Inversement, *Ec. malodoratus* est un agent d'altération organoleptique des fromages (gouda). Dans les produits laitiers et notamment les fromages, certains entérocoques produisent de l'histamine (décarboxylation de l'histidine) et des amines biogènes (monoamines dérivées de la tyrosine, de la phénylalanine ou du tryptophane) qui pourraient être à l'origine de troubles circulatoires, d'hypertension et de migraines (Devriese *et al.*, 2006 ; Leblanc, 2006). La présence d'entérocoques dans les produits de la mer indique souvent que la température de stockage a été trop élevée (> 15 °C) au cours de la distribution de ces produits (Dalgaard *et al.*, 2003).

2.1.4 *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres appartenant au groupe des bactéries lactiques. Il compte en effet près de 110 espèces et environ 15 sous-espèces décrites (Euzéby, 1997 ; Hammes et Hertel, 2006). Ce genre a été proposé en 1901 par Beijerinck, après la découverte en 1896 de l'espèce *Lactobacillus delbrueckii* par Leichmann (Skerman *et al.*, 1980). Les *Lactobacillus* spp. sont très hétérogènes et les diverses espèces présentent des caractères phénotypiques, biochimiques et physiologiques variés.

2.1.4.1 Les espèces du genre *Lactobacillus* et leurs habitats

Les espèces du genre *Lactobacillus* occupent également des niches écologiques très variables et sont très utilisées dans l'industrie alimentaire notamment dans les aliments fermentés tels que les produits carnés fermentés, le yaourt, le fromage, le pain au levain et la choucroute. Certaines espèces telles que *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. alimentarius* et *Lb. farciminis*, sont généralement retrouvées dans les produits carnés (Montel *et al.*, 1991 ; Rantsiou *et al.*, 2006 ; Brooks *et al.*, 2008). Dans le saumon fumé, les espèces les plus fréquemment retrouvées sont *Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. farciminis* et *Lb. alimentarius* (Leroi *et al.*, 1998 ; Joffraud *et al.*, 2001 ; Rachman *et al.*, 2004a).

2.1.4.2 Les caractéristiques physiologiques des espèces du genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif. Généralement les cellules se présentent sous la forme de bacilles longs et fins, parfois incurvés, ou de coccobacilles (Kandler et Weiss, 1986). Les lactobacilles sont non sporulées, généralement immobiles, micro-aérophiles mais certaines souches sont anaérobies strictes à l'isolement, catalase négative, généralement nitrate-réductase négative. Elles possèdent un métabolisme fermentatif produisant de l'acide lactique représentant au moins 50 % des produits de fermentation, et elles présentent des exigences nutritionnelles complexes (Rodas *et al.*, 2005). La classification de Orla-Jensen, datant de 1919, est toujours utilisée en pratique pour illustrer les caractéristiques de la fermentation des sucres par les lactobacilles. Ainsi selon le caractère fermentatif on distingue trois groupes de lactobacilles :

- Les lactobacilles homofermentaires stricts qui dégradent les hexoses en acide lactique (exclusivement par la voie homofermentaire d'Embden Meyerhof), qui ne dégradent pas les

pentoses et qui ne produisent pas de dioxyde de carbone lors de la fermentation du glucose ou du gluconate.

- Les lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase / phosphocétolase) en acide lactique, acide acétique ou éthanol et dioxyde de carbone et qui dégradent les pentoses (voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3-phosphate / pyruvate kinase / lactate déshydrogénase) en acide acétique et en acide lactique. Ces bactéries produisent du dioxyde de carbone lors de la fermentation du glucose et du gluconate.

- Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs qui métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden Meyerhof et qui dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de dioxyde de carbone lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate.

Toutes sont acidophiles avec un pH optimum de croissance variant de 5,5 à 6,2. Les *Lactobacillus* fermentent les pentoses et les hexoses et sont capables de produire des substances aromatiques volatiles. L'hétérogénéité du genre *Lactobacillus* est également reflétée par les valeurs des G + C % qui, selon les espèces, varient de 32 à 53 % (Hammes et Hertel, 2006).

2.1.4.3 Rôle des espèces de *Lactobacillus* dans les aliments

Les *Lactobacillus* sont très utilisés en tant que ferments dans les industries agro alimentaires ; ils sont très intéressants par leur rôle acidifiant qui garantit une stabilité du produit fermenté variable selon la souche et l'aliment. Ainsi *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* est l'une des deux bactéries lactiques présentes dans le yaourt. De même, *Lb. sakei* est très utilisé dans la fermentation des produits à base de viande et *Lb. plantarum* dans les végétaux fermentés comme la choucroute. D'autres espèces appartenant au genre *Lactobacillus* interviennent dans la fermentation de diverses denrées alimentaires.

Cependant certaines espèces du genre *Lactobacillus* jouent un rôle dans l'altération des aliments, comme *Lb. alimentarius* reconnue comme organisme spécifique d'altération dans le hareng mariné (Lyhs *et al.*, 2001) ou plus récemment, les espèces *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* retrouvées également sur du hareng altéré (Lyhs et Bjorkroth, 2008). *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus* a été caractérisée comme l'organisme d'altération de la dinde cuite fumée (Samelis *et al.*, 2000). *Lactobacillus sakei* a également été retrouvée sur de la viande de bœuf

emballée sous atmosphère modifiée, sous différents mélanges gazeux (Ercolini *et al.*, 2006). *Lactobacillus* peut aussi jouer un rôle altérant dans la viande en association avec d'autres bactéries appartenant aux genres *Carnobacterium*, *Weissella*, *Leuconostoc* et *Brochothrix* (Borch *et al.*, 1996). *Lactobacillus curvatus* est connue pour être productrice de tyramine (Masson *et al.*, 1996 ; Burdychova et Komprda, 2007). La production d'amines biogènes par *Lb. curvatus* dans la mayonnaise, la salade de thon et de hareng a été étudiée (Leuschner et Hammes, 1999 ; Pereira *et al.*, 2001). Jorgensen *et al.* (2000b) ont démontré que *Lb. curvatus* était un organisme spécifique de l'altération du saumon fumé. Egalement, selon Stohr *et al.* (2001), *Lb. sakei* serait responsable d'odeurs acides et soufrées après son inoculation dans le saumon fumé. Récemment une méthode fiable d'identification spécifique de *Lb. sakei*, isolée de diverses matrices alimentaires a été mise au point. Elle repose sur l'utilisation d'amorces pour amplification PCR spécifique du gène *katA*, qui code pour une catalase hème-dépendante (Najjari *et al.*, 2008).

2.1.5 Les bactéries à Gram négatif

Les principaux genres de bactéries à Gram négatif rencontrés dans la microflore des produits de la mer sont : *Shewanella*, *Photobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas* et *Aeromonas* (Gram et Huss, 1996 ; Gram et Dalgaard, 2002). Ces bactéries se retrouvent essentiellement dans la microflore des produits de la mer frais, ou en début de conservation pour les produits légèrement préservés comme le saumon fumé. Dans ces produits, cette flore tend ensuite à diminuer au cours de la conservation, en laissant place aux bactéries à Gram positif et notamment aux bactéries lactiques (Truelstrup Hansen *et al.*, 1998 ; Leroi *et al.*, 2001 ; Dalgaard *et al.*, 2003). Néanmoins, certaines espèces de bactéries à Gram négatif comme *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* et *Serratia liquefaciens*, présentent un fort potentiel d'altération des produits de la mer.

Shewanella putrefaciens est une bactérie d'altération spécifique du poisson frais, tel que le cabillaud (Gram et Huss, 1996 ; Vogel *et al.*, 2005 ; Satomi *et al.*, 2006 ; Hovda *et al.*, 2007a), le hareng (Molin et Stenström, 1984), le bar (Papadopoulos *et al.*, 2003), le mullet (Pournis *et al.*, 2005), l'espadon (Pantazi *et al.*, 2008). Elle a aussi été retrouvée dans le cabillaud emballé sous vide (Dalgaard *et al.*, 1993) et dans des poissons fumés tels que le cabillaud et le saumon (Penney *et al.*, 1994 ; Leroi *et al.*, 1998). *Shewanella putrefaciens* est

capable d'utiliser l'oxyde de triméthylamine (OTMA) [(CH₃)₃NO] comme accepteur terminal d'électrons dans une respiration anaérobie et de former de la triméthylamine (TMA) [(CH₃)₃N] provoquant une odeur désagréable (Dalgaard *et al.*, 1993 ; Gram et Huss, 1996). La formation d'odeurs putrides et la production d'H₂S dans divers poissons comme la morue ou le carrelet a été reliée à la présence de *Sw. putrefaciens* (Fonnesbech Vogel *et al.*, 2005). *Shewanella putrefaciens* a également été impliquée dans la production de putrescine dans la crevette entière, fraîche (Benner *et al.*, 2004). Par ailleurs, *Sw. putrefaciens* est sensible à la présence de CO₂ (Dalgaard, 1995a ; Pantazi *et al.*, 2008).

Photobacterium phosphoreum est une bactérie bioluminescente, thermosensible, halophile, psychrotrophe et résistante au CO₂. Elle a été retrouvée dans le poisson emballé sous atmosphère modifiée, dans le poisson légèrement préservé, dans le calamar, et dans des crevettes crues emballées sous atmosphère modifiée (Gram et Huss, 1996 ; López-Caballero *et al.*, 2002 ; Paarup *et al.*, 2002 ; Hovda *et al.*, 2007b). Comme *Sw. putrefaciens*, *Ph. phosphoreum* est une bactérie d'altération car elle provoque la formation d'odeurs désagréables par la production de TMA. Sa production est 10 à 100 fois plus élevée par cellule que celle de *Sw. putrefaciens* (Dalgaard, 1995b ; Gram et Huss, 1996). *Photobacterium phosphoreum* est également une bactérie productrice d'amines biogènes, notamment l'histamine, et est à l'origine d'altération spécifique du saumon fumé (Jorgensen *et al.*, 2000b ; Stohr *et al.*, 2001 ; López-Caballero *et al.*, 2002 ; Joffraud *et al.*, 2006). Enfin, un cas d'intoxication alimentaire par *Ph. phosphoreum*, en raison d'une production importante d'histamine, a été signalé au Japon (Kanki *et al.*, 2004).

Serratia liquefaciens appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle a été retrouvée essentiellement dans le poisson fumé emballé sous vide (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2002 ; Joffraud *et al.*, 2006). Des études par inoculation de cette bactérie sur du saumon fumé ont notamment montré qu'elle était responsable de la production d'amines biogènes et en particulier de putrescine (Jorgensen *et al.*, 2000b). Cette espèce a également été retrouvée sur d'autres matrices alimentaires comme le lait et les produits laitiers (Morales *et al.*, 2004 ; Kagkli *et al.*, 2007), les produits à base d'œuf (Hidalgo *et al.*, 2008), les saucisses de viande de porc (Garcia Fontan *et al.*, 2007).

2.2 Processus d'altération microbienne des produits de la mer

2.2.1 Biochimie de l'altération des produits de la mer

Une des premières formes d'altération décelée sur les produits de la mer après la mort de l'animal est la dégradation des composés reliés à l'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP est dégradé pour former successivement l'adénosine diphosphate (ADP), l'adénosine monophosphate (AMP), l'inosine monophosphate (IMP), l'inosine (INO), l'hypoxanthine (HX) et le ribose (Fraser *et al.*, 1967). La plupart des enzymes concernées par la dégradation de l'ATP en IMP sont considérées dans la plupart des cas comme étant autolytiques alors que les transformations de l'IMP en INO et ensuite en HX sont surtout attribuées aux bactéries d'altération. La dégradation des catabolites de l'ATP s'effectue de la même manière dans la plupart des produits de la mer mais la vitesse de chaque réaction individuelle, d'un catabolite à l'autre, varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Cette dégradation des catabolites de l'ATP n'est pas nécessairement reliée à l'altération de la fraîcheur des produits de la mer. En effet, seule l'HX est considérée avoir un effet direct sur l'arrière-goût amer du poisson altéré (Hughes et Jones, 1966). Au contraire, on considère généralement que l'IMP relève la saveur des produits de la mer.

Les produits de la mer sont des matrices particulièrement favorables au développement microbien. En effet, bien que pauvre en glucides (0,2 à 1,5 % selon les espèces), la chair de poisson est riche en composés azotés non protéiques de faible poids moléculaire rapidement métabolisables par les bactéries (Gram et Huss, 1996 ; Jorgensen *et al.*, 2001). Parmi ces composés, on retrouve les acides aminés libres, la créatine, les nucléotides, l'urée et l'OTMA. Par ailleurs, le pH post-mortem de la chair étant élevé (>6), il permet la croissance rapide de certains germes psychrotrophes altérants, très sensibles au pH, comme *Shewanella putrefaciens*. En anaérobiose et en présence d'un accepteur d'électrons, comme l'OTMA, certains germes sont capables de pratiquer la respiration anaérobie qui aboutit à la production d'acide acétique (Jorgensen *et al.*, 2001). L'OTMA, dont la concentration varie en fonction des produits de la mer, joue un rôle important dans l'altération car il permet la respiration anaérobie de certains micro-organismes comme *Shewanella*, *Photobacterium* et *Aeromonas* (Gram et Dalgaard, 2002). Il est alors réduit en TMA, molécule très malodorante qui donne cette odeur aminée typique du poisson pourri. Bien qu'il soit parfois retrouvé dans certains poissons d'eau douce (Anthoni *et al.*, 1990), l'OTMA est un composé typique des poissons marins (Seibel et Walsh, 2002).

L'urée [(NH₂)₂CO], dont la teneur varie en fonction des espèces de poissons, peut être métabolisée en ammoniac, composé très malodorant. La désamination des acides aminés conduit également à la production d'ammoniac.

La dégradation des acides aminés soufrés dont le poisson est assez riche naturellement, aboutit à la production de sulfure d'hydrogène à partir de la cystéine, de méthylmercaptan et de diméthyl-disulfure à partir de la méthionine. Ces composés sont particulièrement impliqués dans les phénomènes d'altération (Shewan, 1977 ; Lee et Simard, 1984). Certains germes comme *Shewanella*, *Photobacterium* et certaines bactéries lactiques sont capables de cette production, toutefois, on observe une variabilité selon la souche testée (Gram et Huss, 1996). Par ailleurs, la décarboxylation des acides aminés conduit à la formation d'amines biogènes qui, bien que ne possédant pas d'odeurs particulières dans le produit, sont souvent corrélées à l'altération (Veciana-Nogues *et al.*, 1997 ; Jorgensen *et al.*, 2000b). La tyrosine est le précurseur de la tyramine et de la cadavérine. L'arginine peut être dégradée en putrescine par la voie de l'agmatine en présence de l'arginine décarboxylase dans le cas de *Photobacterium phosphoreum* (Jorgensen *et al.*, 2000a). Mais la putrescine peut également être produite par la décarboxylation de l'ornithine par certaines entérobactéries telles que *Hafnia alvei* et *Serratia liquefaciens* (Grimont et Grimont, 1992 ; Sakzaki et Tamura, 1992). Quant à l'histamine, amine biogène issue de la dégradation de l'histidine, elle peut provoquer des réactions de type allergique plus ou moins fortes (rougeurs de la peau, gonflements, maux de tête). Elle est réglementée dans les poissons à forte teneur en histidine (Scombroïdés et Clupéïdés, règlement CE n° 2073/2005). Dans le poisson, les principaux producteurs d'histamine sont les entérobactéries mésophiles comme *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* ou *Klebsiella pneumoniae* (Kim *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2004) mais également des germes psychrotolérants tels que *Photobacterium phosphoreum* (Emborg *et al.*, 2005 ; Dalgaard *et al.*, 2006). Malgré l'utilité des amines biogènes comme indice de la qualité des produits de la mer, ce ne sont pas des composés responsables des mauvaises odeurs caractéristiques de l'altération des produits de la mer (Jorgensen *et al.*, 2001). Ces mauvaises odeurs sont en fait provoquées par des composés chimiques volatils, seuls ou en association, tels que les alcools, les aldéhydes, les esters, les cétones, les composés soufrés, certains hydrocarbures et des composés ammoniacués (Jorgensen *et al.*, 2001 ; Laursen *et al.*, 2006). Plusieurs études ont notamment démontré que ces composés volatils étaient d'origine bactérienne (Joffraud *et al.*, 2001 ; Gram et Dalgaard, 2002 ; Laursen *et al.*, 2006). Le processus de formation de ces composés volatils est peu connu ; il est vraisemblablement le résultat du catabolisme des lipides et des acides aminés par les bactéries (Olafsdottir *et al.*, 2000). Les acides gras insaturés et poly-

insaturés sont facilement oxydables en hydroperoxydes lipidiques, qui sont instables et donc rapidement métabolisés, au cours d'une seconde oxydation, en composés volatils tels que des aldéhydes, des alcools, des cétones, des furanes, des alcanes ou alcènes (Frankel, 2005 ; Nordvi *et al.*, 2007). Le catabolisme des acides aminés est aussi à l'origine de composés volatils comme des sulfures ou des composés aromatiques hétérocycliques comme la pyrazine (Ordonez *et al.*, 1999).

2.2.2 Notion de flores spécifiques d'altération dans les produits de la mer

L'altération sensorielle et le degré de fraîcheur des produits de la mer ne sont pas toujours corrélés avec le nombre total de germes (Huss *et al.*, 1974 ; Huis in 't Veld, 1996). Dans la plupart des produits de la mer, que ce soit dans le poisson frais, le poisson emballé sous vide ou sous atmosphère modifiée, dans les produits légèrement transformés type saumon fumé ou crevette cuite, le rejet organoleptique arrive bien après que la flore totale ait atteint son maximum (Gram et Huss, 1996). Si une flore variée est présente sur le poisson, seuls certains germes, appelés « bactéries spécifiques d'altération », participent réellement à la production de mauvaises odeurs et saveurs. La figure 7 montre qu'en début de stockage, la flore spécifique d'altération représente une fraction minoritaire de la microflore totale des produits de la mer, qui elle est très variée. Après quelques jours de stockage (10 jours dans cet exemple) la flore spécifique d'altération croît significativement, et devient même majoritaire après plusieurs semaines de stockage (environ 25 jours). La production de composés chimiques spécifiques de l'altération microbienne s'accroît également de manière exponentielle au moment où le rejet sensoriel du produit est atteint. Par conséquent, il est possible d'envisager d'utiliser la concentration en composés chimiques comme un indice de la qualité microbiologique des produits de la mer (Dalgaard *et al.*, 1993).

En général, dans le cas des produits de la mer non transformés, les modifications chimiques qui conduisent au rejet sensoriel ne sont dues qu'à une seule espèce bactérienne (Gram et Dalgaard, 2002). Dans les produits transformés en revanche, les mécanismes sont souvent plus complexes car plusieurs groupes microbiens interagissent et peuvent contribuer à la dégradation du produit (Stohr *et al.*, 2001 ; Joffraud *et al.*, 2006). Les flores spécifiques d'altération et les composés chimiques associés ne sont pas les mêmes selon les espèces de poisson, la température de conservation, le mode de conditionnement ou de transformation et même la saison de pêche (Hozbor *et al.*, 2006).

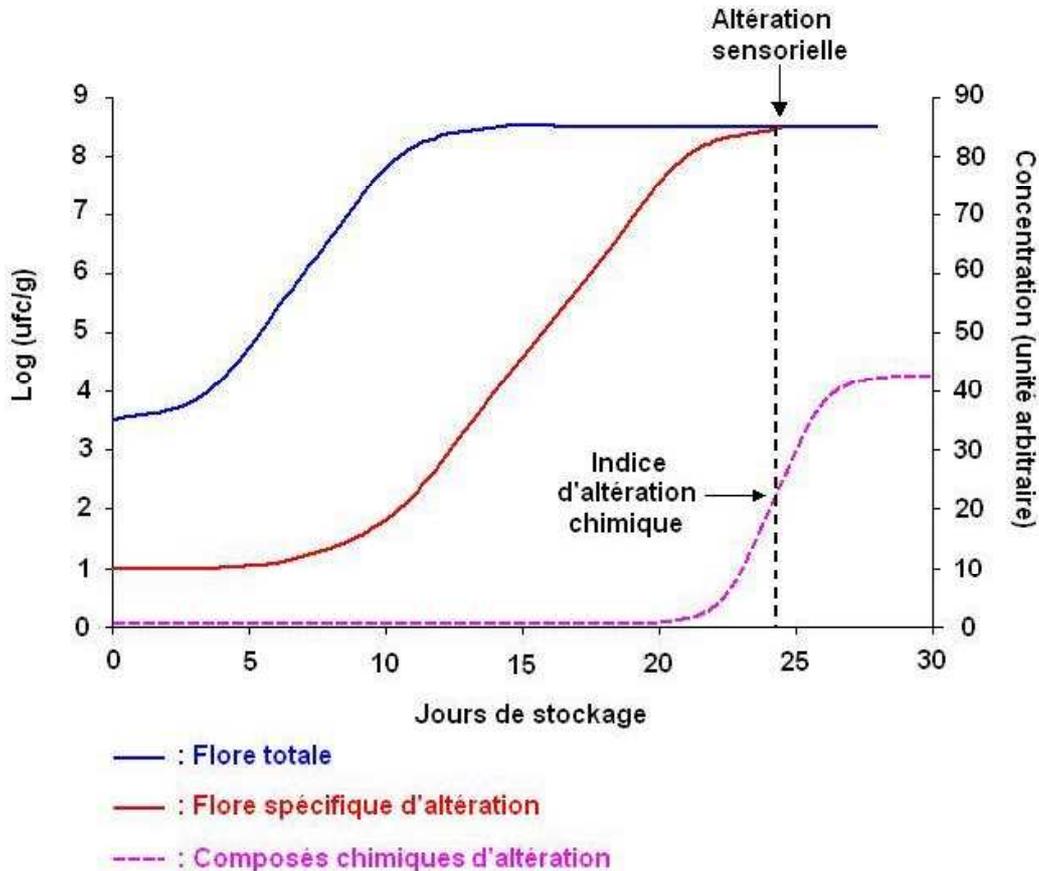


Figure 7 : Evolution de la flore totale, des flores spécifiques d'altération et de l'indice d'altération chimique au cours du stockage (modifiée d'après Gram et Huss, 1996)

2.3 La microflore d'altération de la crevette cuite

Les travaux de recherche actuels sur la microbiologie de la crevette cuite concernent essentiellement la crevette nordique (*Pandalus borealis*) décortiquée, et peu de données sont disponibles sur la microflore des crevettes entières. Néanmoins on peut supposer qu'avec la présence du céphalothorax, la microflore des crevettes entières ainsi que leur altération soient différentes de celles des crevettes décortiquées.

A la suite de la cuisson des crevettes décortiquées (70-80 °C à cœur), réalisée dans le procédé de transformation des crevettes cuites, la flore de la crevette fraîche est fortement réduite et les flores d'altération sont vraisemblablement le résultat d'une recontamination après cuisson par une microflore majoritairement Gram positif issue, soit des équipements de transformation, soit de l'environnement de l'usine (Zapatka et Bartolomeo, 1973 ; Valdimarsson *et al.*, 1998 ; Mejlholm *et al.*, 2005). Les micro-organismes sont ensuite

sélectionnés en fonction des caractéristiques des produits et des conditions d'entreposage. La durée de conservation et le développement de la microflore dépendent surtout de la contamination initiale, des caractéristiques du produit, saumuré ou non par exemple, de la présence ou non de conservateurs, et des conditions de conditionnement et de stockage (atmosphères modifiées, température...). L'effet combiné de ces différents paramètres peut constituer un effet barrière vis-à-vis du développement de la flore microbienne.

2.3.1 La crevette saumurée

Une des premières études sur la crevette nordique en saumure est rapportée par From et Huss (1990). Ils ont montré que la microflore d'altération à 5 °C est dominée par des levures et des bactéries lactiques. Dalgaard et Jørgensen (2000) observent sur des crevettes nordiques (*Pandalus borealis*) et tropicales (*Penaeus* sp.), saumurées/égouttées, emballées sous atmosphère modifiée et entreposées à différentes températures entre 0 et 25 °C, un effet de la température sur la durée de conservation encore plus important que sur d'autres produits de la mer. Par exemple, les lots stockés à 8 °C ont une durée de conservation 15 à 33 fois plus longue que celle observée pour des crevettes stockées à 25 °C. D'autre part, des variations, même faibles, dans la composition du produit peuvent avoir un effet très important sur cette durée. Ainsi, la durée de conservation à 5 °C est supérieure à 3 mois pour les crevettes tropicales contenant 2,3 % de sel en phase aqueuse, et supérieure à 6 mois pour les crevettes nordiques contenant 3,3 % de sel. La majorité de la flore d'altération n'a pas pu être identifiée mais les bactéries lactiques constituent une part importante de la microflore à toutes les températures de stockage sur les deux types de produits (crevettes nordiques et tropicales). La plupart des souches isolées aux différentes températures appartiennent aux genres *Carnobacterium* (*Cb. divergens*) et *Enterococcus* (*Ec. faecalis*) (Dalgaard *et al.*, 2003). *Enterococcus faecalis* est présent sur les produits entreposés à des températures supérieures ou égales à 15 °C, tandis que *Cb. divergens* et *Lb. curvatus* sont isolées sur les produits entreposés à des températures inférieures ou égales à 8 °C.

Mejlholm *et al.* (2008) ont étudié sur la crevette nordique en saumure ou saumurée/égouttée, puis emballée sous atmosphère modifiée, l'effet de l'hygiène du procédé (industriel ou manuel), de la composition de la saumure, et des conditions de stockage (atmosphère et température), sur l'évolution de la microflore de la crevette et la durée de conservation. Différents mélanges d'acides organiques, en tant que conservateurs, ont été ajoutés au bain de

saumure : mélange d'acides benzoïque, citrique, sorbique et mélange d'acides acétique, citrique et lactique. L'effet du diacétate a également été testé. Le pH de ces crevettes saumurées était compris entre 5,6 et 5,8. Cette étude a démontré que la durée de conservation dépend de la nature des acides organiques, de leur concentration, de la température de stockage mais aussi de la contamination initiale. En effet, comparés aux produits élaborés manuellement, les produits industriels sont davantage contaminés, ce qui provoque une diminution de la durée de conservation, et une diversité plus grande de la flore d'altération. Ceci est particulièrement vrai pour les crevettes saumurées/égouttées et emballées sous atmosphère modifiée, dont la durée de conservation à 7 °C est de plus de 75 jours pour les produits élaborés manuellement, alors qu'elle n'est que de 28 à 35 jours pour les produits élaborés sur chaîne industrielle. C'est également le cas pour les crevettes en saumure, constituée d'acides acétique, citrique et lactique dont la durée de conservation à 7 °C est de 69 à 84 jours et 42 à 49 jours pour les produits élaborés manuellement et industriellement, respectivement. L'atmosphère modifiée semble prolonger la durée de conservation, qui passe de 53 à 60 jours pour des crevettes en saumure à plus de 75 jours pour les mêmes crevettes égouttées et emballées sous atmosphère modifiée, mais ceci n'a pas été confirmé sur d'autres essais. La composition de la saumure oriente la nature de la flore se développant sur les produits. Au moment de l'altération, sur les crevettes en saumure composée des acides benzoïque, citrique et sorbique, les espèces *Enterococcus faecalis*-like, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Staphylococcus* à coagulase négative et certaines levures sont retrouvées uniquement sur les produits industriels tandis que sur les deux types de produits, manuels et industriels, les espèces *Pseudomonas fluorescens*, *Enterococcus malodoratus*, *Carnobacterium maltaromaticum* et *Lactobacillus sakei* ont été identifiées. L'addition de diacétate de sodium à la saumure inhibe la croissance de *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus* sp. coagulase négative et *Enterococcus* sp. Lorsque la saumure est constituée d'acides acétique, citrique et lactique, la microflore est constituée exclusivement de levures et de bactéries lactiques dont *Lb. sakei*, à l'origine des mauvaises odeurs aigres et de l'odeur de beurre. La microflore d'altération des crevettes saumurées/égouttées et emballées sous atmosphère modifiée, quelle que soit la composition de la saumure, est dominée par *Lb. sakei*. L'altération du produit élaboré industriellement est marquée par des flaveurs aigres et un dégagement gazeux dans les paquets probablement produits par *Lb. sakei* (Mejlholm *et al.*, (2008).

2.3.2 La crevette non saumurée

Mejlholm *et al.* (2005) ont étudié la microflore de crevettes nordiques cuites décortiquées congelées/décongelées non saumurées et conservées sous atmosphère modifiée (50 % CO₂, 30 % N₂, 20 % O₂). Cent seize isolats ont été prélevés et identifiés dont 60 % de *Cb. maltaromaticum*, 27 % de *Bt. thermosphacta* et 13 % de *Psychrobacter* sp. La présence de *Bt. thermosphacta* a déjà été signalée dans des poissons emballés sous atmosphère modifiée (Rudi *et al.*, 2004). Ce germe a également été décrit comme produisant des odeurs de beurre, de fromage bleu et de pied, lorsqu'il était inoculé sur du saumon fumé (Joffraud *et al.*, 2001 ; Stohr *et al.*, 2001). *Carnobacterium maltaromaticum* a été décrit comme produisant des mauvaises odeurs de chlore sur des crevettes cuites décortiquées non saumurées (Laursen *et al.*, 2006), alors que dans des études précédentes sur du saumon fumé, cette bactérie était décrite comme non altérante et ne produisait que des odeurs de beurre (Joffraud *et al.*, 2001 ; Stohr *et al.*, 2001). *Psychrobacter* sp. ne semble pas jouer de rôle particulier dans l'altération de la crevette cuite.

Sur des crevettes nordiques cuites décortiquées non saumurées et emballées sous atmosphère modifiée, le potentiel d'altération des *Carnobacterium* était variable selon l'espèce et la souche considérée (Laursen *et al.*, 2006). *Carnobacterium divergens* et certaines souches de *Cb. maltaromaticum* produisaient des mauvaises odeurs tandis qu'un autre groupe de souches de *Cb. maltaromaticum* n'était pas altérant. Les germes altérants produisaient de l'ammoniaque, de la tyramine et différents alcools, aldéhydes et cétones. Ces auteurs ont confirmé que *Bt. thermosphacta* et *Cb. maltaromaticum* en co-culture entraînaient certaines mauvaises odeurs (chien mouillé) qui ne sont pas produites lorsque ces espèces se développent séparément. Par contre, cette association ne produit pas de nouveaux métabolites et par conséquent l'odeur de chien mouillé ne provient pas d'un phénomène de métabiose où une bactérie produit un métabolite à partir d'un substrat formé par une autre bactérie. En revanche, *Cb. maltaromaticum* réduit la formation de diacétyl par *Bt. thermosphacta* et ce dernier réduit l'activité de *Cb. maltaromaticum*, qui produit moins de composés volatils qu'en inoculation seule. L'odeur de chien mouillé peut résulter de l'interaction entre les métabolites formés d'une part par *Cb. maltaromaticum*, *Cb. divergens* et dans une certaine mesure par *Cb. mobile* et d'autre part ceux produits par *Bt. thermosphacta*. La présence d'oxygène augmente le potentiel d'altération et le nombre de métabolites produits par *Bt. thermosphacta*. En effet, selon le pourcentage respectif en O₂ et en CO₂, le métabolisme de *Bt. thermosphacta* peut être

aérobie ou anaérobie. Pour réduire son potentiel d'altération dans la crevette, il est recommandé d'utiliser une atmosphère avec moins d'O₂ et plus de CO₂.

3 Les outils d'analyse de la biodiversité et d'identification des communautés microbiennes dans les aliments

3.1 Les méthodes culture-dépendantes

Depuis les débuts de la microbiologie moderne au 19^{ème} siècle, les microbiologistes ont développé et utilisé des milieux de culture pour permettre à la fois l'isolement des micro-organismes, leur énumération et leur identification. Dans les années 1880, Koch fait une avancée cruciale dans l'étude des bactéries en parvenant à les cultiver sur des milieux solides et à les isoler en cultures pures, tout en démontrant que celles-ci possédaient des caractéristiques héréditaires et des propriétés métaboliques qui leur sont propres.

3.1.1 Les outils de microbiologie reposant sur l'étude du phénotype des bactéries

3.1.1.1 Les milieux de culture pour l'énumération des bactéries

En intervenant sur la composition d'un milieu, on peut lui conférer un caractère électif ou sélectif. Ce principe est couramment utilisé pour le dénombrement des bactéries issues d'un écosystème complexe. Celui-ci peut se faire soit en milieu solide, il s'agit alors de dénombrer les UFC (Unités Formant Colonies), soit en milieu liquide, il s'agit alors de la technique NPP (Nombre le Plus Probable). La technique en milieu solide est de loin la plus utilisée en microbiologie alimentaire, car elle permet non seulement de dénombrer les bactéries mais également d'isoler et de collecter les colonies bactériennes en vue d'une caractérisation et identification ultérieure. La méthode classique appliquée à la microbiologie alimentaire consiste à extraire les bactéries de la matrice alimentaire en la broyant et l'homogénéisant dans une solution de tryptone sel, à l'aide d'un broyeur ou homogénéisateur. Une série de dilutions successives de l'homogénat est ensuite réalisée et un volume précis pour chacune des dilutions est ensuite inoculé, en surface ou profondeur, sur un milieu gélosé contenu en boîte de Petri.

Les milieux les plus couramment utilisés pour dénombrer les bactéries des produits de la mer sont : le milieu de Long et Hammer (Van Spreekens, 1974) pour le dénombrement des flores totales psychrothrophes, issues de matrices alimentaires d'origine marine, électif par sa concentration en sel (1 % NaCl). Le milieu Iron-Agar (Gram, 1987) permet de dénombrer les flores productrices d'H₂S qui se retrouvent colorées en noir sur ce milieu. Les milieux de dénombrement des flores lactiques totales sont ELLIKER et N.A.P (Nitrite Actidione Polymyxine) (Davidson et Cronin, 1973). Les lactobacilles sont dénombrés sur la gélose de Rogosa (Rogosa *et al.*, 1951), les *Enterobacteriaceae* sur le milieu VRBG (Mossel et Ratto, 1970), les entérocoques sur la gélose de Slanetz et Bartley (Slanetz et Bartley, 1957), *Brochothrix thermosphacta* sur le milieu STAA (Gardner, 1966), les *Vibrionaceae* sur le milieu TCBS (Kobayashi *et al.*, 1963).

3.1.1.2 L'identification des bactéries fondée sur leurs caractères phénotypiques et biochimiques

Grâce au développement des techniques d'isolement des bactéries sur des milieux solides, le phénotype de nombreuses bactéries a pu être élucidé et décrit, et plusieurs classifications fondées sur des critères morphologiques et biochimiques ont été établies. En 1923 apparaît ainsi la première clé d'identification bactérienne dans le manuel *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Cette clé compilait des observations phénotypiques à la fois sur la morphologie des colonies (couleur, dimension, forme...) et également de la cellule (forme, présence d'endospore, coloration de Gram...). Ce manuel donnera lieu à de nombreuses rééditions. A la fin des années 1950, la taxonomie numérique fait son apparition. Elle est basée sur la comparaison de caractères phénotypiques informatifs et permet de représenter leurs degrés de similitude sous la forme de dendrogrammes (Sneath, 1989 ; Vandamme *et al.*, 1996). De manière schématique, la méthode consiste à étudier pour chaque souche plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, la présence ou l'absence d'un constituant cellulaire particulier, et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables. Cette technique apparaît dans la période à laquelle les techniques analytiques biochimiques vont se développer et permettre d'étudier la physiologie et le métabolisme bactérien avec l'étude des profils de fermentation des sucres, la recherche d'activités enzymatiques ou encore la production de métabolites issus du catabolisme des glucides, des lipides et des acides aminés. Egalement,

des caractères liés à la composition de la cellule bactérienne comme l'analyse des protéines totales, des lipides membranaires, du peptidoglycane de la paroi, ainsi que des études sérologiques, sont utilisées. A l'heure actuelle, ces caractères phénotypiques sont toujours utiles pour l'identification des espèces bactériennes et peuvent être réalisées à l'aide de tests biochimiques miniaturisés et standardisés (galeries API, plaque Biolog) (Busse *et al.*, 1996). Cependant, l'étude de la diversité bactérienne d'un écosystème en se basant uniquement sur des caractères phénotypiques et biochimiques peut présenter certaines limites. En effet, certains caractères comme les morphologies cellulaires des micro-organismes et les aspects des colonies ne sont pas suffisamment discriminants pour permettre de distinguer les espèces bactériennes entre elles (Vandamme *et al.*, 1996). D'autre part, en ce qui concerne les caractères métaboliques et physiologiques, il a été démontré que des souches appartenant à la même espèce n'ont pas forcément le même métabolisme ni la même physiologie et inversement. D'ailleurs, des échanges de plasmides et des transferts horizontaux de gènes existent et peuvent passer la barrière des espèces (Jain *et al.*, 2002). L'avènement des méthodes génotypiques dans les années 1980 telles que l'hybridation ADN/ADN, le pourcentage en base guanine (G) et cytosine (C) de l'ADN ou encore l'étude du polymorphisme de l'ADN avec la recherche de similarité de séquences de certains gènes d'intérêt ont permis de s'affranchir d'une partie de ces limites. Depuis les années 1990, une nouvelle approche largement utilisée en systématique bactérienne est apparue, il s'agit de la taxonomie polyphasique qui intègre les données phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques pour la description des espèces nouvelles (Vandamme *et al.*, 1996 ; Rossello-Mora et Amann, 2001).

3.1.2 Les outils de microbiologie reposant sur l'étude du génotype des bactéries

3.1.2.1 L'hybridation ADN/ADN

La technique d'hybridation ADN/ADN avec le séquençage du gène codant l'ARNr-16S sont des méthodes de référence pour l'identification des bactéries (Busse *et al.*, 1996). Les méthodes d'hybridation ADN/ADN sont basées sur le principe que deux molécules d'ADN dénaturées peuvent se réassocier à condition de présenter une homologie de leur séquence nucléotidique. L'hybridation ADN/ADN consiste donc en la dénaturation de molécules d'ADN totaux, appartenant à deux souches bactériennes, puis à leur réappariement. La

formation d'hétéroduplex, avec les simples brins d'ADN dénaturés de chaque souche, sera gouvernée par le degré d'homologie des deux génomes. En fonction des similitudes de séquence, deux types de duplex hétérologues peuvent se former. Si les ADN des deux bactéries présentent des homologies importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex se complète de proche en proche comme dans le cas d'une fermeture à glissière. Au contraire, si les ADN des deux bactéries ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses. La solidité et donc la spécificité des hybrides est appréciée par la mesure de la stabilité thermique ; elle permet de mesurer le degré de mauvais réappariement au sein de l'hétéroduplex. Le pourcentage de réassociations hétérologues est ensuite calculé. Il est généralement admis qu'au dessus de 70 % d'homologie, deux souches font partie de la même espèce (Wayne *et al.*, 1987). Néanmoins, le niveau exact permettant d'affirmer que deux bactéries sont d'espèces différentes peut varier selon le genre bactérien (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 1988). La technique d'hybridation ADN/ADN n'est pas utilisable en routine car elle est lourde et délicate à mettre en œuvre.

3.1.2.2 Le séquençage du gène codant l'ARNr-16S

Zuckerlandl et Pauling (1965) ont été les premiers à proposer l'utilisation des séquences de gènes comme système « d'horloge moléculaire » permettant d'élucider les relations phylogénétiques entre les êtres vivants. Woese dans les années 1970, a dans cette intention introduit l'utilisation des gènes codant les ARN ribosomiques (ARNr), qui ont servi plus tard de base pour la construction de l'arbre phylogénétique universel du vivant, comprenant les trois domaines : *Eubacteria*, *Archaea*, *Eucarya* (Woese, 1987). L'ARNr est le constituant principal des ribosomes auxquels il donne leur nom (ribosome, particule contenant de l'acide ribonucléique). Les ARNr s'associent à des protéines pour former les ribosomes qui, chez les procaryotes, sont constitués d'une sous-unité 30S (30 Svedberg) et d'une sous-unité 50S. La sous-unité 30S d'un ribosome contient de l'ARNr 16S (environ 1500 nucléotides, figure 8) et la sous-unité 50S contient de l'ARNr 5S (environ 120 nucléotides) et de l'ARNr 23S (environ 2900 nucléotides).

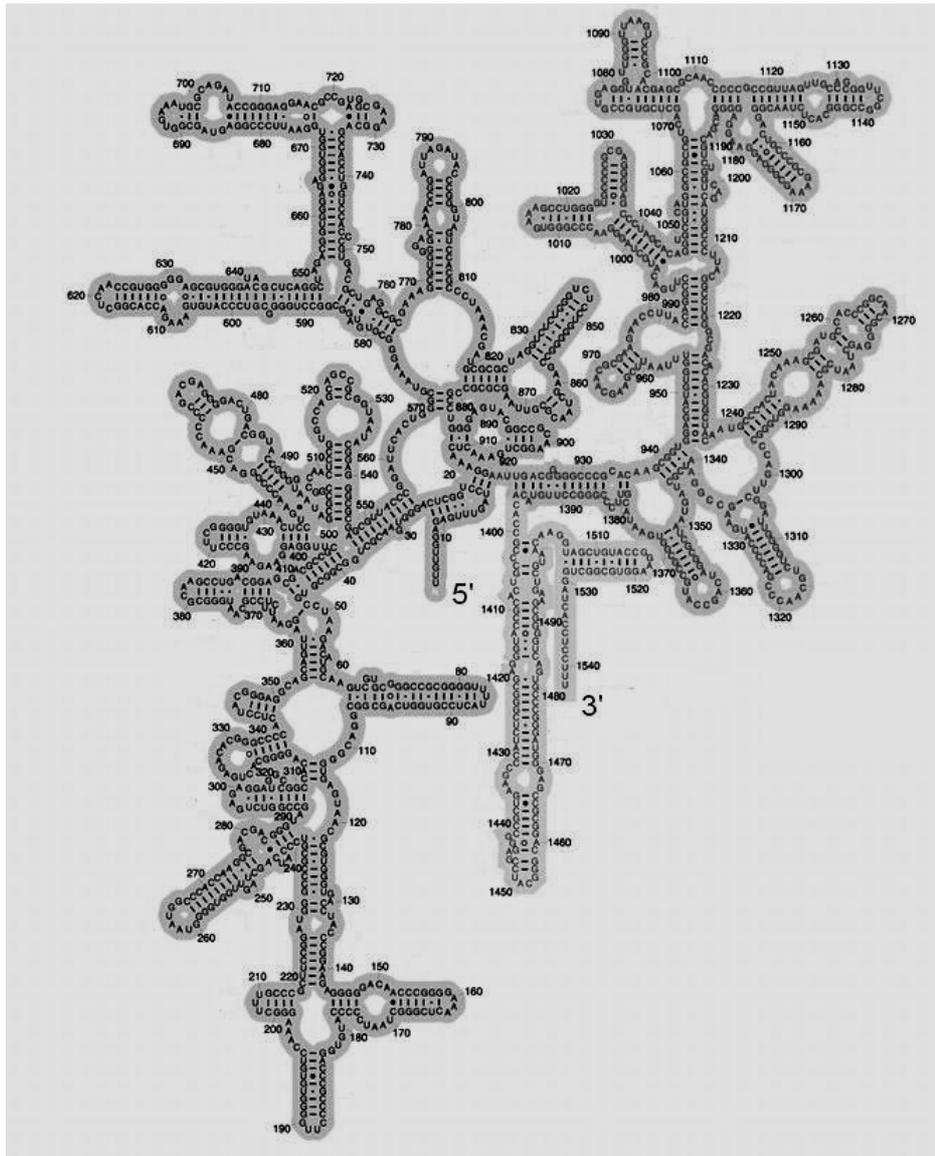


Figure 8 : Structure secondaire de l'ARNr 16S de *Escherichia coli* (modifiée d'après Case *et al.*, 2007)

Tous les ARNr sont monocaténaire (simple brin) sauf dans quelques régions où se forment des structures bidimensionnelles appelées boucles ou tige-boucles, par appariement de bases complémentaires situées sur le même brin (figure 8). Dans le ribosome, les ARNr sont repliés sur eux-mêmes, formant une structure tridimensionnelle compacte. Cette structure protège les ARNr qui sont très stables.

Les ARNr sont synthétisés à partir de gènes contenus dans l'ADN chromosomique (ADNr 16S) des bactéries. La caractérisation des gènes codant pour l'ARNr 16S est bien établie en tant que méthode moléculaire de référence pour l'identification de bactéries au niveau de l'espèce, du genre et de la famille (Case *et al.*, 2007). L'ADNr 16S est utile à la classification

phylogénétique et à l'identification bactérienne puisqu'il est présent dans toutes les bactéries. Il comporte des séquences conservées communes à des unités de taxon élevées et des séquences variables spécifiques d'espèces, qui sont au nombre de huit et sont numérotées de V1 à V8 (tableau 9).

Tableau 9 : Régions variables de l'ADNr 16S (Schmalenberger *et al.*, 2001 ; Coenye et Vandamme, 2003)

Région	Position sur l'ADNr 16S (numérotation d' <i>Escherichia coli</i>)
V1	1-100
V2	101-120
V3	518-537
V4	519-536
V5	907-926
V6	968-984
V7	1101-1200
V8	1330-1346

La variabilité de séquences de ces régions permet donc de différencier les bactéries entre elles. La région V6-V8 permet de différencier les *Eubacteria* des *Archaea* ou *Eucarya* (Schmalenberger *et al.*, 2001). Le nombre d'espèces obtenues par amplification de la région V4-V5 et V6-V8 est plus important que celui obtenu à partir de la région V2-V3 (Schmalenberger *et al.* 2001). Cependant, le gène codant l'ARNr 16S peut être présent en plusieurs copies dans le génome des bactéries, et ces copies peuvent présenter une hétérogénéité de séquence au niveau de leurs régions variables, c'est ce qu'on appelle l'hétérogénéité intraspécifique. Cette hétérogénéité intraspécifique est principalement rencontrée au niveau des régions variables V1, V2 et V6 (Coenye et Vandamme, 2003). Concernant l'étude des bactéries, les régions variables couramment ciblées sont les régions V1 (L. Cocolin *et al.*, 2004), V3 (Ogier *et al.*, 2002) et V6 et V8 (Lopez *et al.*, 2003). La région V3 convient bien à l'analyse des communautés microbiennes issues d'un écosystème complexe, car elle ne présente pas beaucoup d'hétérogénéités intraspécifiques (Ercolini *et al.*, 2001a).

L'ADNr 16S est facile à séquencer grâce à sa taille d'environ 1500 pb (Coenye et Vandamme, 2003). Une paire d'amorces, fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') a été construite par Weisburg *et al.* (1991). Ces

amorces permettent d'amplifier l'ADNr 16S par PCR (Polymerase Chain Reaction ou en français : amplification en chaîne par polymérisation) quasiment dans sa totalité, pour presque toutes les eubactéries. Près de 100 000 séquences d'ARNr-16S ou du gène qui le code (ADNr 16S) sont disponibles sur le réseau internet (Dauga *et al.*, 2005), dans des bases de données généralistes comme GenBank/EMBL/DDBJ ou des bases de données spécialisées comme le Ribosomal Database Project (RDP). Les programmes FASTA et BLAST permettent de comparer une séquence nucléotidique d'une souche inconnue avec les séquences déposées en banque et retiennent les séquences les plus proches. Il est admis qu'en dessous de 98,7 % d'identité, deux bactéries n'appartiennent pas à la même espèce (Stackebrandt et Ebers, 2006). Si le pourcentage d'homologie est supérieure à 98,7 %, le classement de deux souches dans une même espèce ou pas, repose sur les résultats de l'hybridation ADN/ADN. Cependant, deux espèces, considérées comme différentes sur la base de l'hybridation ADN/ADN, peuvent avoir des séquences ADNr 16S très proches (Pikuta *et al.*, 2005).

Des gènes autres que ceux codant pour les ARNr 16S peuvent être séquencés. Le séquençage d'un gène dit « de ménage » (housekeeping gene), qui assure les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules, ou de plusieurs « gènes de ménage » dans le cadre d'une approche MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) (Thompson *et al.*, 2005), a été largement utilisé pour certains genres bactériens comme les *Vibrio*. C'est le cas du gène *rpoB*, codant pour la sous-unité beta de l'ARN polymérase (Dahllof *et al.*, 2000 ; Case *et al.*, 2007) ou encore des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant respectivement pour la sous-unité alpha et beta de l'ADN gyrase (Le Roux *et al.*, 2005). L'utilisation du séquençage ne se justifie pas pour l'identification de chaque germe isolé, car c'est une technique assez coûteuse pour l'analyse de routine. D'autres techniques d'identification moléculaire, reposant sur le principe de la PCR, et ne nécessitant pas le séquençage de gène peuvent être employées.

3.1.2.3 Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

L'ARDRA est une technique analogue à l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) mais est appliquée au gène codant l'ARNr-16S (Vanechoutte *et al.*, 1992). Le principe de l'ARDRA est d'amplifier l'ADNr 16S puis de digérer le produit d'amplification obtenu par une ou plusieurs enzymes de restriction qui vont couper l'ADN au niveau d'une séquence nucléotidique, ou site de restriction, qui leur est spécifique. Si deux espèces bactériennes diffèrent par un ou plusieurs

sites ou, par la distance séparant deux sites identiques consécutifs, il se crée une différence dans la longueur des fragments générés par les enzymes de restriction. La migration des fragments de restriction dans un gel d'agarose, permet d'obtenir des profils électrophorétiques différents. Cette technique ne nécessite pas obligatoirement de cultiver les bactéries étudiées (Diaz Ruiz et Wachter-Rodarte, 2003). Plusieurs applications sur des bactéries isolées des aliments comme le saumon fumé ont été décrites (Cambon-Bonavita *et al.*, 2001).

3.1.2.4 Polymorphisme de la région intergénique 16S-23S de l'ADNr

Chez les eubactéries, les gènes ribosomiques sont en général organisés en opérons (Gürtler et Stanisich, 1996). L'organisation classique des gènes de l'opéron ribosomique, aussi appelé *rrn*, est présentée sur la figure 9. Les gènes ribosomiques sont séparés les uns des autres par une région intergénique appelée ITS pour « Internal Transcribed Spacer » ou ISR pour « Intergenic Spacer Région ».

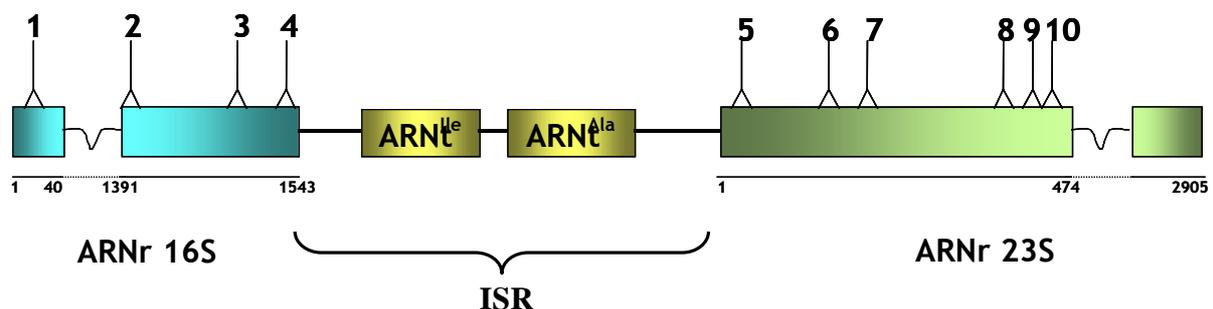


Figure 9 : Schéma de la région codant pour l'ARNr 16S, la région intergénique (ISR) 16S-23S et la région codant pour l'ARNr 23S chez *Escherichia coli* (modifiée d'après Gürtler et Stanisich, 1996).

Les positions des régions conservées de l'ADNr 16S sont numérotées de 1 à 4, et celles de l'ADNr 23S sont numérotées de 5 à 10. La ligne noire représente la région intergénique qui sépare les ARNr 16S et 23S. Cette région contient les deux gènes d'ARNt (ARNt^{Ile} et ARNt^{Ala}).

Deux séquences intergéniques sont généralement présentes au sein de l'opéron ribosomique : celle séparant les gènes 16S et 23S et celle séparant les gènes 23S et 5S. Contrairement aux unités de transcription des ARN ribosomiques qui présentent essentiellement un polymorphisme de séquence entre les espèces bactériennes, il existe au sein des régions ISR à la fois un polymorphisme de longueur et de séquence. En effet, la région intergénique 16S-

23S peut parfois contenir des gènes codant pour des ARN de transfert (ARNt), ce qui explique le polymorphisme de longueur et de séquence de cette région. En outre, le nombre d'opérons ribosomiques dans le génome des bactéries peut varier d'une espèce à l'autre, et au sein d'une même espèce, les régions ISR peuvent également présenter un polymorphisme de longueur et de séquence d'un opéron à l'autre.

La méthode la plus rapide pour étudier le polymorphisme de la région intergénique 16S-23S, est d'amplifier cette région par PCR, en utilisant des amorces construites à partir des séquences conservées dans les gènes codant pour l'ARNr 16S et 23S. La migration électrophorétique, dans un gel d'agarose, des fragments ISR 16S-23S amplifiés, permet ensuite de différencier des genres bactériens grâce au polymorphisme de cette région. Par exemple, deux genres bactériens très proches tels que *Lactobacillus* et *Carnobacterium*, ont pu être différenciés par leurs profils ISR 16S-23S de l'ADNr (Kabadjova *et al.*, 2002 ; Rachman, 2004). Egalement, chez *Carnobacterium* le polymorphisme de l'ISR 16S-23S a permis la différenciation de plusieurs espèces de ce genre en deux groupes, en fonction du profil électrophorétique de leurs fragments ISR 16S-23S amplifiés (Rachman *et al.*, 2004b). Tout d'abord le groupe de *Carnobacterium divergens*, *Cb. mobile*, *Cb. funditum*, *Cb. alterfunditum*, *Cb. inhibens*, et *Cb. viridans* qui présente un profil identique, et le groupe de *Cb. maltaromaticum* et *Cb. gallinarum* qui présente un autre profil.

3.2 Les méthodes culture-indépendantes

La connaissance de la biodiversité au sein des écosystèmes microbiens complexes qu'ils soient d'origines humaines, environnementales ou alimentaires, s'est considérablement améliorée ces dernières années grâce aux apports de la biologie moléculaire et de la phylogénie (Giraffa et Neviani, 2001). Les techniques moléculaires constituent des outils performants pour la détection, l'identification et la caractérisation des micro-organismes impliqués dans les variations de ces écosystèmes. Cependant, la biodiversité microbienne est très souvent sous-estimée lorsque son étude passe par la culture des bactéries. En effet, une majorité considérable des micro-organismes observés dans la nature, de l'ordre de 95 à 99 %, ne serait pas cultivable par la mise en œuvre des techniques culturales standards (Amann *et al.*, 1995). Pour remédier à ce biais méthodologique et pour s'affranchir de l'utilisation des milieux de cultures, des techniques dite culture-indépendantes ont été développées (Giraffa et Neviani, 2001). Parmi ces techniques, certaines sont maintenant largement répandues en

écologie microbienne. C'est le cas des techniques basées sur la séparation électrophorétique, en condition dénaturante, de fragments d'ADN générés par PCR comme la Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) ou la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer, 1999). Plus récemment, une technique automatisée à haut débit d'analyse, basée sur la séparation chromatographique en condition dénaturante, a été mise au point pour l'analyse des communautés microbiennes sans culture préalable, il s'agit de la Denaturing High Performance liquid Chromatography (DHPLC) (Domann *et al.*, 2003).

3.2.1 Electrophorèse en condition dénaturante : TTGE, DGGE

3.2.1.1 Principe de ces techniques

La DGGE a tout d'abord été développée afin de détecter des mutations génétiques comme la substitution d'une seule paire de bases dans un fragment d'ADN (Myers *et al.*, 1985a). En effet, des fragments d'ADN amplifiés par PCR, de même taille mais de séquences différentes, peuvent être séparés par migration dans un gel de polyacrylamide, contenant un gradient linéaire d'agents chimiques dénaturants (urée et formamide). Cette méthode permet donc d'étudier le polymorphisme de séquence de l'ADN. La migration électrophorétique des fragments, en condition dénaturante, va dépendre de leur séquence nucléotidique donc de leur melting temperature (T_m) ou température de fusion de l'ADN. La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) et la TTGE sont des méthodes similaires à la DGGE, où un gradient de température est appliqué au lieu du gradient chimique. Il est à noter cependant qu'un agent chimique dénaturant (urée) est également ajouté en concentration constante dans le gel de polyacrylamide dans le cas de la TGGE et TTGE.

En TGGE, le gradient de température est appliqué tout au long du gel ce qui signifie que la température varie d'un point à l'autre du gel. Dans le cas de la TTGE, la température est la même quelle que soit la position sur le gel, mais elle change en fonction du temps (temporal temperature) (Wartell *et al.*, 1998). La DGGE, la TGGE et la TTGE sont applicables à des fragments de plusieurs centaines de paires de bases et ne nécessitent pas une connaissance préalable du site polymorphe. Plusieurs fragments de T_m différente peuvent donc être séparés sur un même gel.

Parmi ces trois techniques, la TTGE est la plus simple à mettre en œuvre, car l'élaboration du gradient thermique en fonction du temps est plus facile à maîtriser et est plus reproductible qu'un gradient thermique ou chimique, variant le long du gel comme dans le cas de la TGGE et DGGE, respectivement.

Au cours de l'électrophorèse, l'ADN migre d'abord à l'état double brin, puis rencontre des conditions qui dénaturent le domaine de fusion le moins stable de la molécule, riche en adénine (A) et thymine (T), formant une structure partiellement simple brin, dite ramifiée. Cette structure est formée grâce à l'utilisation d'un « GC clamp », c'est-à-dire d'une séquence de guanines (G) et cytosines (C) de 30 à 50 nucléotides, ajoutée et attachée à l'extrémité 5' d'une des deux amorces utilisées (Myers *et al.*, 1985b). Cette séquence co-amplifiée et introduite dans les fragments amplifiés empêche la dénaturation complète (figure 10).

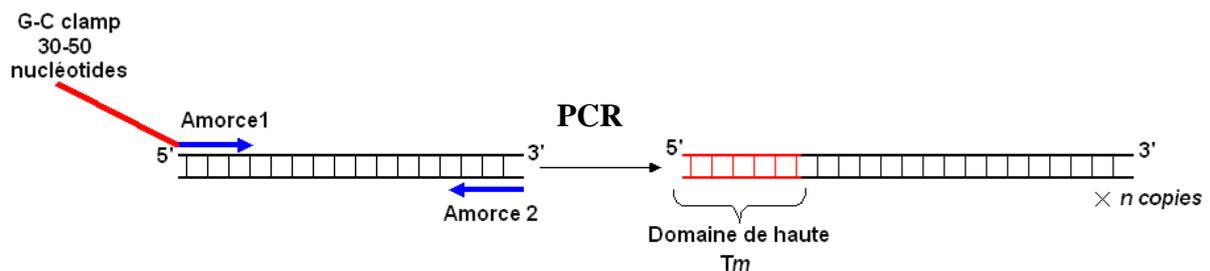


Figure 10 : Insertion du GC-clamp dans le fragment d'ADN amplifié par PCR

La dénaturation partielle des fragments amplifiés entraîne une réduction de leur mobilité électrophorétique de sorte que leur position finale dans le gel dépend exclusivement de la T_m du domaine le moins stable et donc de la séquence nucléotidique de ces derniers (figure 11). Ainsi, environ 95 % des variations de séquence, même ponctuelles, du domaine de fusion le moins stable sont estimées détectables par des différences de migration électrophorétique. La révélation des fragments sous UV est réalisée en général en utilisant le SYBR Green I comme colorant (agent intercalant) (Muyzer, 1999).

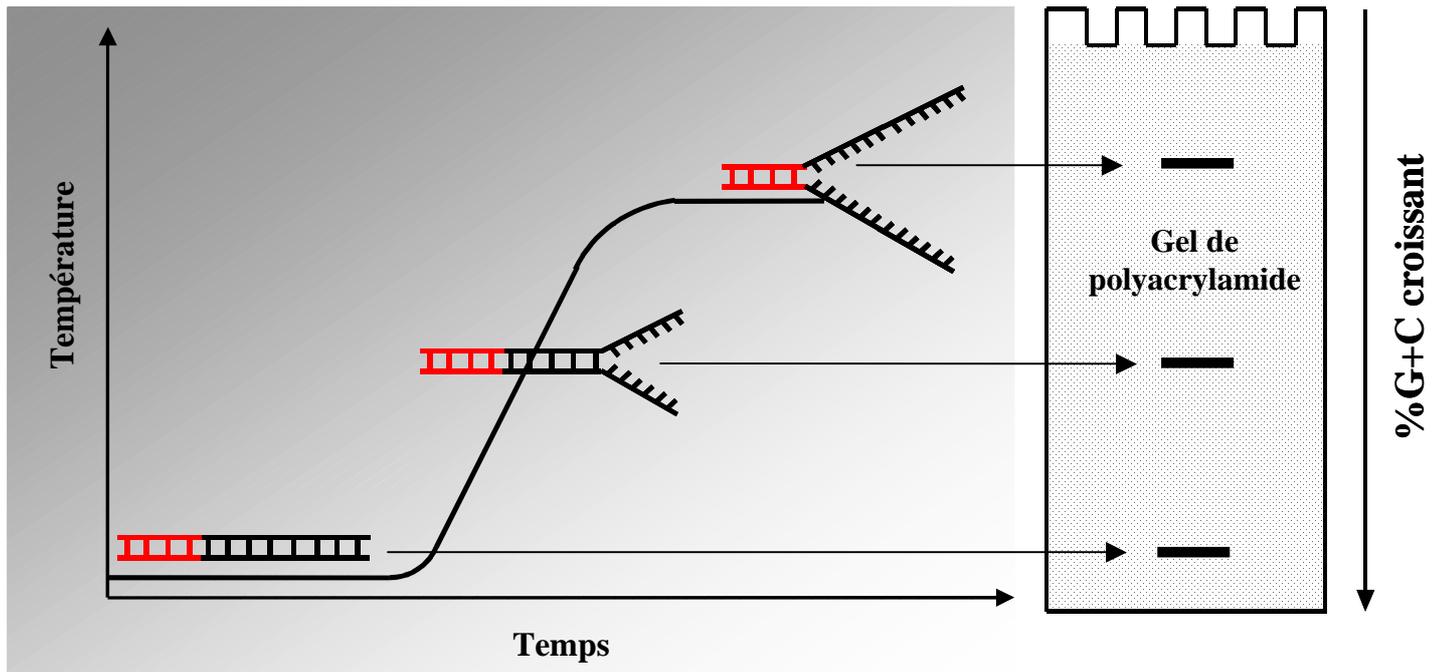


Figure 11 : Courbe de dénaturation des fragments amplifiés et position relative de leur bande de migration respective, sur un gel de polyacrylamide après migration électrophorétique en condition de dénaturation thermique (TTGE)

Ces techniques ont été utilisées dans le but d'étudier l'écologie microbienne de divers écosystèmes et notamment alimentaires (Juste *et al.*, 2008). L'ADN bactérien extrait directement à partir de la matrice à analyser, est amplifié par PCR et analysé par DGGE ou TTGE. Les fragments obtenus correspondant aux amplicons des bactéries recherchées peuvent être récupérés sur le gel et séquencés afin de confirmer leur identité. Les techniques TTGE et DGGE permettent donc d'obtenir des empreintes électrophorétiques génétiques, d'un écosystème microbien. Ces étapes sont présentées sur la figure 12.

En revanche, la DGGE et la TTGE possèdent certaines limites. La taille des fragments séparés est petite (de 300 à 500 pb environ). L'information obtenue pour établir un arbre phylogénétique est donc limitée. De plus, l'apparition d'un deuxième fragment ou plus, au lieu d'un seul pour une bactérie, en raison de la présence de différents opérons ribosomiques dans le génome, peut conduire à la surestimation de cette population (Dahllof *et al.*, 2000 ; Coenye et Vandamme, 2003). De même, des phénomènes de co-migration peuvent avoir lieu,

c'est-à-dire que deux fragments d'ADN amplifiés appartenant à deux espèces différentes et présentant une séquence nucléotidique différente, peuvent néanmoins avoir une T_m identique entraînant une même distance de migration. Leurs empreintes dans le gel ne seront donc pas séparées (Murray *et al.*, 1996 ; Ogier *et al.*, 2002).

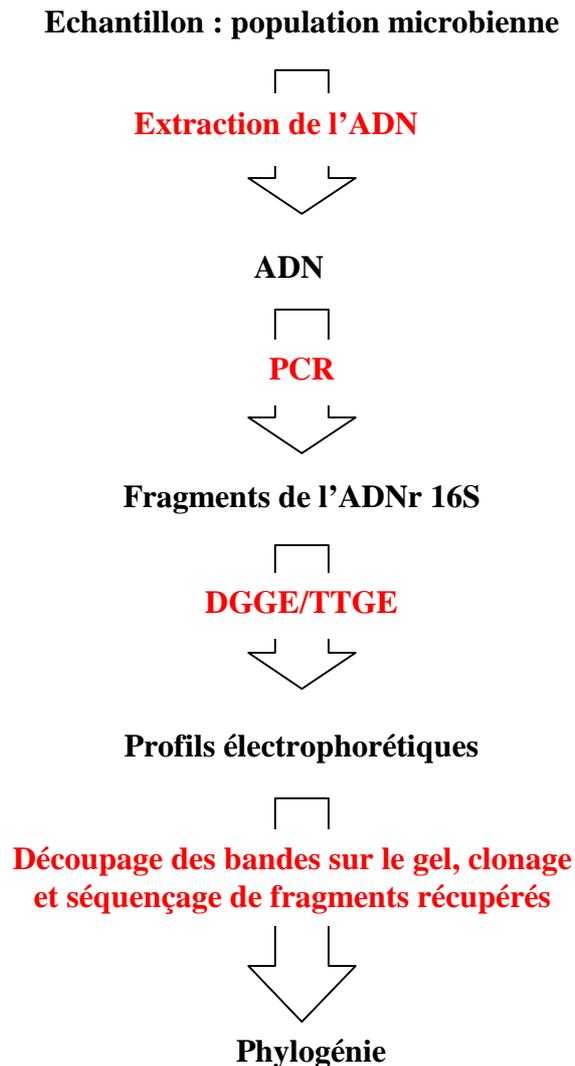


Figure 12 : Les différentes étapes dans l'analyse d'une population microbienne par PCR-DGGE/TTGE (modifiée d'après Muyzer, 1999)

3.2.1.2 Applications de ces techniques dans les aliments : identification des bactéries sans culture préalable

La DGGE a été appliquée pour étudier la diversité, la dynamique et l'activité des communautés microbiennes dans divers produits alimentaires (Ercolini, 2004 ; Cocolin *et al.*, 2007 ; Juste *et al.*, 2008). C'est le cas notamment dans les produits laitiers (Jany et Barbier, 2008) tels que les fromages comme la Mozzarella (Ercolini *et al.*, 2004), les fromages siciliens (Randazzo *et al.*, 2002 ; Randazzo *et al.*, 2006), la Feta (Rantsiou *et al.*, 2008) ou encore le Cabrales espagnol (Flórez et Mayo, 2006). Les produits fermentés, où les bactéries lactiques sont prédominantes, ont également fait l'objet d'un suivi de ces flores par DGGE, c'est le cas des levains de panification (Meroth *et al.*, 2003a ; Garofalo *et al.*, 2008), des boissons alcoolisées comme le malt de whisky (Van Beek et Priest, 2002), le vin (Renouf *et al.*, 2006 ; Renouf *et al.*, 2007) ou plus récemment l'alcool de riz traditionnel vietnamien (Thanh *et al.*, 2008). La microflore des produits à base de viande de bœuf (Ercolini *et al.*, 2006), de viande de porc (Li *et al.*, 2006) et les produits de charcuterie comme le salami (Aquilanti *et al.*, 2007) ou la saucisse (Diez *et al.*, 2008), a été également étudiée avec la DGGE tout comme certains produits de la mer tels que la morue ou le flétan (Hovda *et al.*, 2007a ; Hovda *et al.*, 2007b). Une des dernières applications en date de la DGGE sur les aliments concerne l'étude de la diversité microbienne sur les feuilles de salade (Randazzo *et al.*, 2008 ; Zwielehner *et al.*, 2008).

La TTGE est également largement utilisée dans le domaine de l'écologie microbienne du lait (Ogier *et al.*, 2002 ; Lafarge *et al.*, 2004 ; Ogier *et al.*, 2004 ; El-Baradei *et al.*, 2008) et des produits laitiers comme les fromages (El-Baradei *et al.*, 2007 ; Parayre *et al.*, 2007 ; Abriouel *et al.*, 2008). D'autres produits fermentés ont également fait l'objet d'un suivi de leur microflore par la TTGE, comme les câpres (Perez Pulido *et al.*, 2005), les boissons traditionnelles africaines à base de céréales fermentées (Abriouel *et al.*, 2006) ou encore les levains de panification (Ferchichi *et al.*, 2007). Les bactéries constituant la microflore du saumon fumé ont également été différenciées en utilisant la TTGE (Giacomazzi *et al.*, 2004). Dans cette étude, le gène *rpoB* avait été choisi comme cible car il existe en une seule copie dans le génome et permet donc l'obtention d'un seul fragment par espèce bactérienne. La stratégie de nested PCR a été adoptée, où deux PCR successives ont été réalisées. Les profils TTGE obtenus ont permis de différencier *Lactobacillus alimentarius*, *Lb. farciminis*, *Lb. sakei*, *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium piscicola*, *Photobacterium phosphoreum*, *Serratia proteomaculans* et *Shewanella putrefaciens* en cultures pures. Rachman *et al.*

(2004a) ont pu, en ciblant la région V6-V8, mettre en évidence l'évolution des flores du saumon fumé au cours de sa conservation.

3.2.2 La DHPLC

3.2.2.1 Principe de cette technique

La DHPLC est une technique de chromatographie liquide haute performance (ou en anglais high performance liquid chromatography, HPLC) en condition dénaturante, qui permet la séparation de fragments d'ADN double brin, en mettant en oeuvre une séparation chromatographique en phase inverse avec couplage d'ions (Underhill *et al.*, 1996 ; Underhill *et al.*, 1997). La DHPLC utilise une colonne greffée d'une phase stationnaire non poreuse composée de billes de 2 nanomètres de diamètre en polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) sur lesquelles sont greffés des groupements alkyles C18. Cette phase stationnaire est électriquement neutre et hydrophobe. L'ADN étant chargé négativement au niveau de ses groupements phosphates, il ne peut donc pas s'adsorber de lui-même au niveau de la colonne. Afin de rendre l'adsorption possible, on utilise de l'acétate de triéthylammonium (TEA^+) (figure 13).

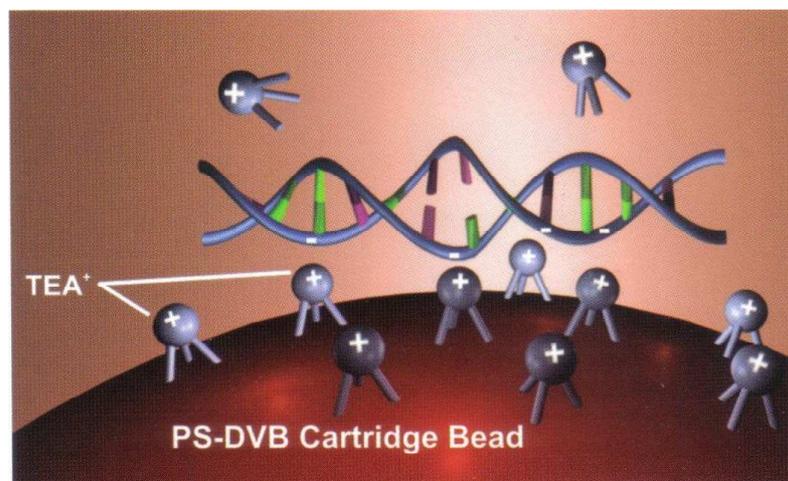


Figure 13 : Rétention de l'ADN dans une colonne de DHPLC (modifiée d'après Transgenomics®)

Les ions ammonium chargés positivement de ces molécules interagissent avec l'ADN chargé négativement et les chaînes alkyl du TEA⁺, avec la surface hydrophobe de la phase stationnaire (figure 13). La phase mobile contient de l'acétate de triéthylammonium et de l'acétonitrile (ACN). L'acétonitrile est un solvant organique très hydrophobe qui entre en compétition avec le TEA⁺ pour interagir avec la phase stationnaire. Le mélange de ces deux réactifs au niveau de la pompe permet de créer un gradient d'acétonitrile pendant l'analyse.

Avec la DHPLC, la séparation des fragments d'ADN amplifiés par PCR issus d'un mélange, est basée sur l'élution différentielle des fragments partiellement dénaturés (présence d'un GC-clamp) par la chaleur (Barlaan *et al.*, 2005). Les fragments d'ADN amplifiés, qui présentent une hétérogénéité de séquence, vont donc présenter des niveaux de dénaturation différents. Plus les fragments seront dénaturés, plus leurs temps d'élution seront courts. En effet, les différences de temps de rétention sont attribuées aux charges négatives qui sont moins disponibles dans les portions simples brins des fragments d'ADN comparées aux doubles brins. Par conséquent, plus un fragment d'ADN est dénaturé moins il a de charges négatives disponibles pour son adsorption à la phase stationnaire par l'intermédiaire du TEA⁺, donc plus vite l'acétonitrile parviendra à décrocher les interactions hydrophobes entre le TEA⁺ et la phase stationnaire, permettant ainsi l'élution du fragment. Les fragments d'ADN peuvent être détectés par détection U.V ou par fluorescence. L'empreinte moléculaire d'un mélange est visualisée sous la forme d'un chromatogramme où chaque pic correspond à une espèce donnée ou à un groupe d'espèces (Barlaan *et al.*, 2005).

3.2.2.2 Application de cette technique

La DHPLC est une technique relativement récente qui, initialement, a été mise au point pour détecter des variations dans les séquences d'ADN génomique des cellules eucaryotes, telles que des insertions, des délétions, du polymorphisme de nucléotide simple (ou en anglais single nucleotide polymorphism, SNP) et des microsatellites (Underhill *et al.*, 1997). Cette technique automatisée, à haut débit d'analyse, a été utilisée avec succès dans diverses applications telles que le diagnostic humain (Frueh et Noyer-Weidner, 2003), l'analyse de la méthylation de l'ADN (Couvert *et al.*, 2003) ou encore l'analyse de l'ARN (Azarani et Hecker, 2001). Plus récemment, cette technique a été adaptée pour l'investigation des communautés microbiennes de divers écosystèmes complexes comme le microbiote intestinal humain (Goldenberg *et al.*, 2005 ; Goldenberg *et al.*, 2007), le tractus urinaire (Domann *et al.*,

2003) ou d'échantillons d'eau de mer (Barlaan *et al.*, 2005). Dernièrement, cette technique a également été appliquée pour le suivi de la diversité microbienne dans une matrice en lien avec un produit alimentaire, le lactosérum (Ercolini *et al.*, 2008).

RÉSULTATS

Chapitre I

**Caractérisation de la microflore d'altération de la crevette tropicale
décortiquée cuite**

Chapitre I

Partie 1

**Etude polyphasique de l'écosystème bactérien de la crevette tropicale
décortiquée cuite**

Publication n°1 :

**Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps
using a polyphasic approach**

Jaffrès E., Sohier D., Leroi F., Pilet M.F., Prévost H., Joffraud J.J. and X. Dousset (2008)

International Journal of Food Microbiology (2009), 131(1), 20-29.

Introduction

Les crevettes décortiquées, cuites puis réfrigérées sont considérées comme des denrées alimentaires sensibles au processus d'altération provoqué par le développement de certaines bactéries. En effet, bien que les crevettes subissent une étape de cuisson réduisant leur charge bactérienne initiale, elles peuvent être recontaminées après cuisson, *via* l'environnement, les équipements ou le personnel. Parmi ces bactéries de recontamination, certaines qualifiées de bactéries spécifiques d'altération mettent en œuvre un métabolisme provoquant l'apparition de modifications organoleptiques indésirables (Gram et Dalgaard, 2002). La microflore d'altération des crevettes cuites a donné lieu à très peu d'études et elles concernent essentiellement les crevettes d'origine nordique (Dalgaard *et al.*, 2003 ; Mejlholm *et al.*, 2005 ; Laursen *et al.*, 2006 ; Mejlholm *et al.*, 2008). L'ensemble de ces travaux a été réalisé par des techniques culturales de microbiologie. Or, des travaux antérieurs ont démontré que la biodiversité microbienne d'un écosystème complexe était très souvent sous estimée lorsque son étude reposait sur la culture des bactéries (Giraffa et Neviani, 2001).

Le but de cette étude était de caractériser la microflore de crevettes tropicales cuites par une approche polyphasique, combinant à la fois des techniques culture-dépendantes et indépendantes, permettant ainsi de mettre en évidence les principaux genres et espèces de bactéries présentes dans le produit. Cette recherche a été réalisée sur deux lots A et B de crevettes décortiquées, cuites, conditionnées sous atmosphère modifiée provenant de deux usines, et conservés pendant plusieurs semaines à 5 et 15 °C. Le protocole analytique est détaillé sur la figure 14. Avec les techniques culture-dépendantes, le développement de plusieurs flores a été suivi à l'aide de milieux de culture adaptés et 137 colonies ont été isolées puis identifiées au moyen de tests phénotypiques et moléculaires. L'approche culture indépendante a consisté à mettre en œuvre la technique PCR-TTGE fournissant une empreinte moléculaire de l'ADN bactérien, directement extrait de la matrice crevette, en ciblant la région V3 du gène codant l'ARNr-16S. Le choix de cette cible, plutôt qu'un gène existant en copie unique dans le génome comme le gène *rpoB*, se justifie par le fait que les banques de données de séquences sont beaucoup plus fournies en séquences de l'ADNr 16S. D'autre part, nous avons choisi de cibler la région variable V3 car elle présente moins d'hétérogénéité intraspécifique, comparée à celle d'autres régions variables comme V1, V2 et V6 (Coenye et Vandamme, 2003). En conséquence, l'identification des espèces bactériennes après clonage et séquençage des fragments V3 nous a semblé plus robuste.

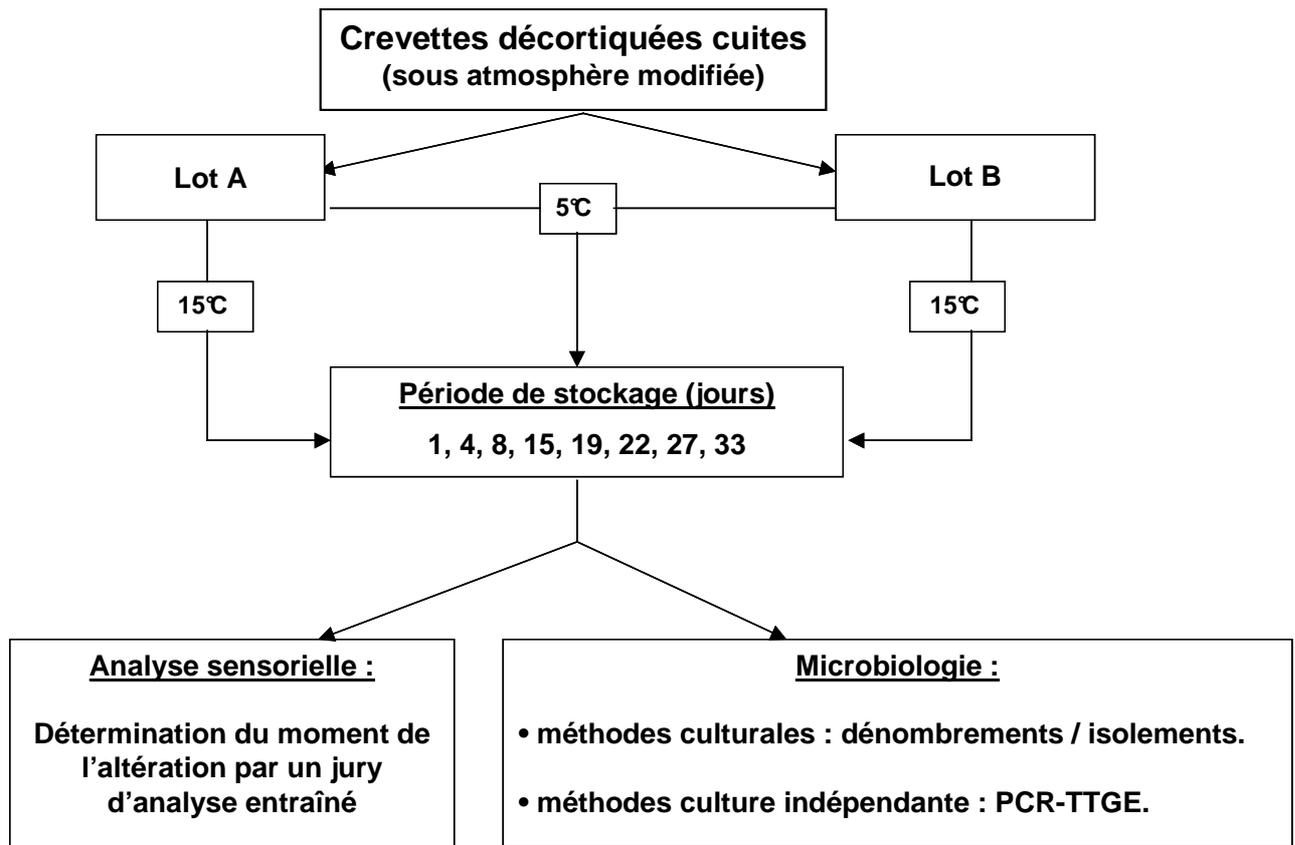


Figure 14 : Protocole de suivi analytique des deux lots de crevettes au cours de leur stockage

Principaux résultats et discussion

Approche culture-dépendante

Le suivi des caractéristiques sensorielles des deux lots de crevettes décortiquées cuites a permis de déterminer le moment du stockage où ils présentaient un niveau significatif d'altération soit 33 et 22 jours pour les lots conservés respectivement à 5 et 15 °C. Une fois ce niveau atteint, 137 colonies ont été isolées et identifiées (tableau 10).

Tableau 10 : Répartition des espèces bactériennes isolées des deux lots de crevettes conservées à 5 °C et 15 °C

Espèce identifiée ^a	Nombre d'isolats	Lots			
		A-5 °C	B-5 °C	A-15 °C	B-15 °C
<i>Cb. divergens</i>	23	4	14	-	5
<i>Cb. maltaromaticum</i>	9	-	-	9	-
<i>Cb. alterfunditum-like</i>	4	1	3	-	-
<i>Cb. inhibens</i>	1	-	1	-	-
<i>Vc. fluvialis</i>	13	-	-	7	6
<i>Vagococcus. sp</i>	13	-	2	-	11
<i>Ec. faecalis</i>	3	-	-	3	-
<i>Ec. faecium</i>	4	-	-	3	1
<i>Ac. viridans</i>	1	-	-	-	1
<i>Bt. thermosphacta</i>	51	21	9	3	18
<i>St. proteamaculans</i>	15	-	-	15	-
Total	137	26	29	40	42

^aAbréviations: *Cb*, *Carnobacterium*; *Vc*, *Vagococcus*; *Ec*, *Enterococcus*; *Ac*, *Aerococcus*; *Bt*, *Brochothrix*; *St*, *Serratia*.

Les isolats sont répartis en trois grands groupes de bactéries. Le premier comprend 71 isolats de bactéries lactiques appartenant aux genres *Carnobacterium* (37 isolats), *Vagococcus* (26 isolats), *Enterococcus* (7 isolats) et *Aerococcus* (1 isolat). Le deuxième groupe est

constitué de 51 isolats identifiés à l'espèce *Brochothrix thermosphacta*, retrouvés sur les lots stockés à 5 °C et 15 °C. Enfin, le dernier comprend 15 isolats issus du lot A stocké à 15 °C appartenant à l'espèce *Serratia proteamaculans*, également connue sous l'appellation *Serratia liquefaciens-like* (Grimont *et al.*, 1982).

Au sein du genre *Carnobacterium*, 3 espèces différentes ont été identifiées : *Cb. divergens* avec 23 isolats, *Cb. maltaromaticum* avec 9 isolats, et enfin un groupe de 5 isolats dont l'identification n'a pas pu être réalisée de façon précise car ils présentaient une identité de séquence similaire (environ 98 %) pour les espèces *Cb. alterfunditum* et *Cb. pleistocenium*. Nous avons choisi de les regrouper sous l'appellation *Carnobacterium alterfunditum-like*. Des travaux ultérieurs ont montré qu'une des souches de ce groupe appartenait à l'espèce *Carnobacterium inhibens*. Les quatre autres souches, regroupées sous l'appellation *Cb. alterfunditum-like*, pourraient correspondre à une nouvelle espèce de *Carnobacterium*. Pour le genre *Vagococcus*, 26 isolats ont été répartis en deux groupes. Le premier groupe, comprenant 13 isolats, a été identifié à l'espèce *Vc. fluvialis*. Pour le deuxième groupe, qui comprenait également 13 isolats, on a pu déterminer la séquence du gène codant l'ARNr 16S pour 5 d'entre eux. Les 5 séquences obtenues présentaient une homologie parfaite entre elles (100 % de similarité de séquence) ; par contre elles présentaient une faible homologie de séquence (≤ 97 %) avec celles des espèces déjà connues du genre *Vagococcus* (*Vc. fluvialis*, *Vc. salmoninarum*, *Vc. fessus*, *Vc. lutrae*, *Vc. carniphilus* et *Vc. elongatus*). Ces résultats semblent indiquer que ces 5 souches pourraient correspondre à une nouvelle espèce au sein du genre *Vagococcus*. Une étude de taxonomie polyphasique a été réalisée pour confirmer ou non cette nouvelle espèce et sera présentée dans le Chapitre II. Enfin, les 7 isolats identifiés au genre *Enterococcus* se répartissent entre deux espèces : *Ec. faecalis* (3 isolats) et *Ec. faecium* (4 isolats).

Approche culture-indépendante

La PCR-TTGE a été utilisée pour suivre l'évolution de l'écosystème bactérien dans les deux lots de crevettes durant toute la période de stockage (figure 15). Cinq espèces bactériennes de référence ont été choisies en fonction des résultats obtenus par l'approche culturale comme profils TTGE standards (pistes 1 à 5). Après migration électrophorétique, les profils TTGE des échantillons de crevettes ont révélé 9 bandes d'intensité majeure (a à i) parmi lesquelles, 5 bandes (a à e) pouvaient être assignées par comparaison de leur position de migration, à une

des bandes des 5 profils standards. Les autres bandes (f à i) ne pouvaient pas être assignées et étaient considérées comme inconnues.

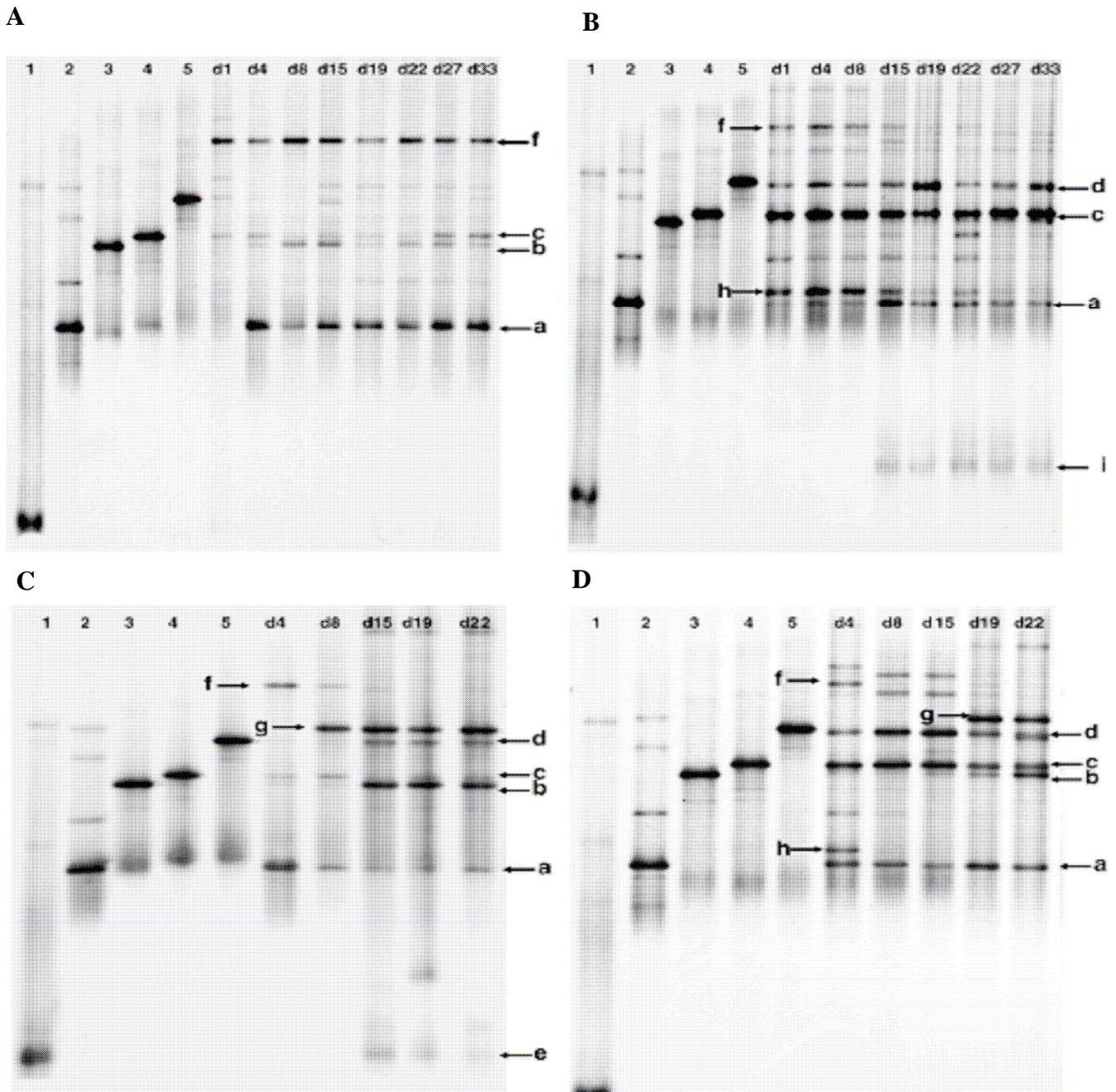


Figure 15 : Profils TTGE de la région V3 du gène codant l'ARNr 16S au cours du stockage des échantillons de crevettes conservés à 5 °C (gel A,B : lot A et B respectivement) et 15 °C (gel C,D : lot A et B respectivement).

Pistes 1 à 5 : espèces bactériennes de référence (souches types). 1, *St. liquefaciens*; 2, *Bt. thermosphacta*; 3, *Ec. faecalis*; 4, *Cb. divergens*; 5, *Cb. maltaromaticum*. Pistes d1 à d33 : profils des écosystèmes microbiens des lots de crevettes pour chaque jour d'analyse. Assignment des bandes des profils de l'ADN bactérien des crevettes à celles des bandes des profils des souches de référence : a, *Bt. thermosphacta*; b, *Ec. faecalis*; c, *Cb. divergens*; d, *Cb. maltaromaticum*; e, *St. liquefaciens* ; f,g,h et i correspondent à des bandes de l'ADN bactérien des crevettes qui n'ont pas pu être assignées et sont considérées comme bandes inconnues.

Toutes les assignations ont été ensuite confirmées par excision des bandes du gel, suivie d'un clonage et du séquençage de la région V3 de leur ADNr 16S. Les bandes inconnues ont été identifiées selon la même méthodologie (f : *Firmicute* non cultivé, g : *Ec. faecium*, h : *Psychrobacter* sp., i : *Citrobacter gilleni*). La technique PCR-TTGE a permis d'obtenir des informations complémentaires à celles obtenues par les méthodes culture dépendantes. En effet, pour les lots stockés à 5 °C (d33, gels A et B) les profils ont permis de mettre en évidence des espèces bactériennes qui n'avaient pas été identifiées par approche culturelle. C'est le cas pour le lot A, avec l'espèce *Enterococcus faecalis* (bande b) qui avait été isolée uniquement à 15 °C et de la bande f (non assignée) qui correspond à un *Firmicute* non cultivé. Il en est de même pour le lot B avec *Citrobacter gellini* (bande i, non isolée sur milieux de culture) et *Cb. maltaromaticum* (bande d). C'est le même constat avec les espèces *Ec. faecalis* et *Cb. maltaromaticum* non retrouvées pour ce lot sur milieu de culture.

Cependant, nous avons aussi pu constater que certaines espèces isolées et identifiées par approche culturelle, n'étaient pas détectables par PCR-TTGE. Ainsi l'espèce *Vc. fluvialis* n'a pas été retrouvée par PCR-TTGE. Toutefois, nous avons observé que le fragment V3 de cette espèce co-migrerait avec celui de l'espèce *Ec. faecalis*, car leur fragments respectifs présentaient des séquences nucléotidiques différentes avec un *Tm* identique. Malgré ce phénomène de co-migration, cette technique a permis de réaliser un suivi dynamique de la diversité microbienne des crevettes au cours du stockage, et de voir à quelle période une espèce bactérienne apparaissait dans la microflore des crevettes. Ainsi, pour le lot B stocké à 5 °C, on peut voir une succession entre l'espèce *Psychrobacter* sp. (bande h, gel B), visible du jour 1 au jour 15 et l'espèce *Bt. thermosphacta* apparaissant à partir du jour 15 et visible jusqu'à la fin du stockage.

Cette étude de microbiologie polyphasique a permis d'identifier les principaux genres et espèces bactériennes présents dans la microflore des crevettes tropicales décortiquées cuites au moment de l'altération organoleptique. Parmi toutes ces espèces, plusieurs dont *Bt. thermosphacta* et *Cb. maltaromaticum* ont déjà été décrites comme étant responsables de l'apparition de mauvaises odeurs caractéristiques de l'altération dans diverses matrices alimentaires. En revanche, certains genres et espèces étaient pour la première fois retrouvés dans un écosystème microbien complexe, en lien avec l'altération d'une matrice alimentaire. Ainsi les espèces *Cb. alterfunditum* et *Cb. pleistocenium*, rencontrées dans cette étude, ont été respectivement isolées d'un lac gelé en antarctique (Franzmann *et al.*, 1991) et d'un permafrost en Alaska (Pikuta *et al.*, 2005). Il en est de même pour le genre *Vagococcus* avec l'espèce *Vc. fluvialis*, qui précédemment avait été isolée de divers prélèvements cliniques

humains (Teixeira *et al.*, 1997). Un certain nombre de souches appartenant aux principales espèces retrouvées dans ces travaux ont été étudiées pour leur potentiel d'altération, étude qui sera présentée dans le chapitre III. Cette recherche a permis de démontrer que la PCR-TTGE était une technique efficace pour suivre la dynamique de la microflore des crevettes cuites au cours de leur stockage, et de mettre en évidence des flores non détectées par les milieux de culture.

L'ensemble de cette étude fait l'objet d'une publication, acceptée dans la revue *International Journal of Food Microbiology*, qui est présentée dans les pages suivantes.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

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

Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach

E. Jaffrès^{a,b}, D. Sohier^c, F. Leroi^b, M.F. Pilet^a, H. Prévost^a, J.J. Joffraud^{b,*}, X. Dousset^a

^a UMR INRA 1014 SECALIM, ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France

^b Ifremer, Département Sciences et Techniques Alimentaires Marines, F-44311 Nantes 03, France

^c ADRIA, Z.A. de Créac'h Gwen, 29196, Quimper cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Tropical cooked shrimp
Spoilage
PCR-TTGE
Lactic acid bacteria

ABSTRACT

The characterization of the microbial ecosystem of cooked tropical shrimps was carried out using a polyphasic approach. First, culture-dependent methods were used for bacterial enumeration and the phenotypic and molecular identification of bacterial isolates. Then, culture-independent methods, including PCR-TTGE (V3 region of the 16S rRNA gene), provided a fingerprinting of bacterial DNA directly extracted from shrimps. Two batches of cooked and peeled tropical shrimps were stored at 5 and 15 °C for 5 and 3 weeks, respectively. Trained panelists carried out a sensory evaluation and microbiological enumerations were performed. When spoilage of samples was perceived, several colonies were isolated from the total viable count media. Thus, 137 bacterial strains were identified by phenotypic and molecular tests. Lactic acid bacteria (LAB) constituted the major group with the most represented genera being *Carnobacterium* (*C. divergens*, *C. maltaromaticum* and indiscernible *C. alterfunditum/pleistocentium*), *Vagococcus* (indiscernible *V. carniphilus/fluvialis*) and *Enterococcus* (*E. faecalis* and *E. faecium*). The other groups corresponded to *Brochothrix thermosphacta* and *Enterobacteriaceae* (*Serratia liquefaciens*). In PCR-TTGE profiles some of DNA fragments were assigned to those of standard strains (*S. liquefaciens*, *B. thermosphacta*, *E. faecalis*, *C. divergens* and *C. maltaromaticum*) or identified isolates from culture-dependent analysis (*E. faecium*). Other additional informations were provided by fragment cloning (*Psychrobacter* sp., *Citrobacter gillenii* and *Firmicute*). In conclusion, TTGE is an excellent tool to monitor the evolution of the microbial ecosystem in seafood products.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Shrimp is the most important seafood product traded in terms of value, accounting for 15 thousand million US\$ of exports in 2006 making 18% of the total seafood trade worldwide. With 360,000 tons imported during the first half of 2007, the European market for shrimp is number one in the world (FAO-CIHEAM, 2007). According to the fishing or farming geographic location, two categories of traded shrimps can be distinguished: nordic shrimps (*Pandalus borealis*) and tropical shrimps (*Penaeus* sp.) (Leung and Engle, 2007). Nordic shrimps are generally cooked after catch then frozen whole or peeled before dispatch to the preparation factories, whereas tropical shrimps are generally frozen raw, whole or peeled before the preparation process, which includes a cooking step (Leung et al., 2007). Raw fresh shrimps are very sensitive to microbial spoilage. In fact, they can be contaminated by bacteria naturally present in the marine environment, such as *Vibrio* sp., *Aeromonas* and *Pseudomonas* (Hanninen et al., 1997; Gopal et al., 2005; Jeyasekaran et al., 2006), or in the

digestive tract, which is not always removed directly after catch (Gomez-Gil et al., 1998; Al-Harbi, 2003). These bacteria can develop very quickly on these products, which are characterized by a neutral pH, a high water activity (A_w) and a high content of low molecular weight compounds such as free amino acids and nucleotides (Jeyasekaran et al., 2006). These compounds are directly usable for the growth and metabolism of specific spoilage bacteria (Chinivasagam et al., 1998). However, the heat treatment that occurs in most shrimp preparation processes constitutes a strong barrier, efficiently reducing the initial microbial content (Harrison and Lee, 1969). Several previous studies have been carried out to investigate the cooked shrimp microbiota, but they were mainly concerned with the nordic shrimp. Such studies demonstrated that the product microbiota was the result of direct recontamination from the processing equipment and environment (Zapatka and Bartolomeo, 1973; Valdimarsson et al., 1998). Dalggaard and Jørgensen (2000) have shown that the shelf life of cooked shrimps is particularly influenced by temperature. Moreover, a modified atmosphere in combination with a low temperature can significantly extend the shelf life (Sivertsvik et al., 1997). Previous studies have also shown that the spoilage microbiota of cooked shrimps appears to be dominated by Gram-positive bacteria such as *Brochothrix thermosphacta* and predominantly by lactic acid bacteria

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40374284; fax: +33 2 40374071.
E-mail address: joffraud@ifremer.fr (J.J. Joffraud).

Table 1
Shrimp sample description.

Characteristics ^a	Batch A	Batch B
Production	Farming	Harvesting
Origin	South America	Indian and Pacific Oceans
Shrimp species	<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Penaeus vannamei</i>
Brine composition	Sodium disulfite, Ascorbic acid, Citric acid, Sodium benzoate	Acetic acid, Citric acid, Lactic acid
MAP composition	50% CO ₂ /50% N ₂	100% CO ₂
Use-by date	22 days	21 days

^a MAP, modified atmosphere packaging. The use-by date was determined by the two different factories.

(LAB) including *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Enterococcus faecalis* (Dalggaard et al., 2003; Mejlholm et al., 2005). The shelf life and sensory characteristics of cooked shrimp products depend on the development of the microbial community. Thus, it seems essential to be able to monitor the evolution of the microbial ecosystem during storage.

For a long time, the study of a natural microbiota ecosystem has consisted of a cultural methodology using different culture media. However, this approach does not necessarily provide reliable information about the composition of microbial communities, which may contain species that would be viable but are not cultivable on current culture media (Duthoit et al., 2003). Thus, molecular methods have been developed to analyze diversity within bacterial communities (Muyzer and Smalla, 1998). In the field of food microbiology, temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) has been applied to study the microbiota of dairy products (Ogier et al., 2002; Lafarge et al., 2004; Ogier et al., 2004; El-Baradei et al., 2007; Parayre et al., 2007), fermented foods such as Caper berries (Perez Pulido et al., 2005), traditional African fermented food from cereal grains (Abriouel et al., 2006), and sourdough (Ferchichi et al., 2007). This technique has also been used on seafood products, especially cold-smoked salmon (Giacomazzi et al., 2004; Rachman et al., 2004).

The present study was undertaken to fill a gap in the knowledge regarding the microbiota of cooked tropical shrimps, widely consumed in our country. The microbial ecosystem of two batches of commercial, cooked, brined, tropical shrimps, packed in a modified atmosphere, from two different European factories were investigated. In contrast with several previous studies that used only cultural methods to study the microbial ecosystem of cooked shrimps, here we have used a polyphasic approach. Culture-dependent and -independent methods have been employed, notably the PCR-TTGE technique, in order to monitor the bacterial population in the shrimp products during storage.

2. Materials and methods

2.1. Shrimp sampling

The study was carried out on two batches, named A and B, of commercial, tropical, cooked, peeled, brined and drained shrimps in

modified atmosphere packaging (MAP) from two production plants (Table 1). Half of the samples were stored at 5 °C and the other half at 15 °C for 5 and 3 weeks, respectively. Twice a week, two series of analyses were carried out including sensory, chemical and polyphasic microbiological analyses with cultural and non-cultural methods.

2.2. Sensory analysis

Fifteen trained panelists, experienced in seafood sensory evaluation, carried out the sensory analysis of the shrimp products. Three packets per batch were opened and repackaged, for each assessor, into 20-g portions in plastic bags to keep the odors intact. Sessions were performed in individual partitioned booths, as described in the procedure NF V-09-105 (AFNOR, 1987), equipped with a computerized system (Fizz, Biosystèmes, Couternon, France). Assessors had to score the sensory profile using a notation (0 to 10) of appropriate descriptors of odor and visual aspect for the products stored at 15 °C and the criteria of odor, visual aspect, taste and texture for those stored at 5 °C. At the end of the evaluation, panelists classified each sample according to its spoilage level (NS: non-spoiled; LS: lightly spoiled; SS: strongly spoiled). The products were considered to be in the spoilage phase when at least 50% of the assessors classified them at the SS level.

2.3. Chemical analysis

The flesh remaining in the bags opened for microbiological analysis was homogenized in a Waring Blender (New Hartford, CO, USA). Total Volatile Basic Nitrogen (TVBN) and Trimethylamine (TMA) were measured in duplicate by the Conway microdiffusion method (Conway and Byrne, 1933). The pH value was measured in the ten-fold-diluted flesh with a pH meter (Mettler Delta, AES, Combourg, France).

2.4. Enumeration of different bacterial groups

For each shrimp sample, three packages were used to produce the homogenized analysis solution. A 30-g portion of each package was aseptically weighed into 120 ml of sterile physiological saline solution (0.85% NaCl) with 0.1% peptone in a sterile plastic bag and blended with a stomacher 400 (Seward Medical, London, UK) for 2 min. After 30 min at room temperature for bacterial resuscitation, 30 ml of each blend were pooled into a sterile vial and mixed thoroughly by vortexing to constitute the homogenized analysis solution. Several appropriate 10-fold dilutions of the analysis solution were carried out in sterile physiological saline solution and 0.1 ml of each was spread on a plate. The total aerobic viable counts (TAVC) were determined after 7 days at 15 °C on Long and Hammer agar (LH) with 1% NaCl (Van Sproekens, 1974). The total lactic acid bacteria (LAB) were counted after 3 days at 25 °C on nitrite actidione polymyxin agar (NAP) at pH 6.2 in anaerobic jars (20% CO₂, 80% N₂) (Davidson and Cronin, 1973). *B. thermosphacta* were determined after 3 days at 25 °C on streptomycin sulfate thallos acetate agar (STAA) (Gardner, 1966).

Table 2
Sequences of oligonucleotide primers used for PCR amplification and sequencing.

Primer	Position ^a	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Annealing (°C)	Reference
16S-p2	16S rRNA gene, forward (positions 1388 to 1406).	CTTGTACACACGCCCGTC	56	Gurtler and Stanisch (1996)
16S-p4	16S rRNA gene, forward (positions 1526 to 1544).	GCTGGATCACCTCCTTCT	56	Gurtler and Stanisch (1996)
23S-p7	23S rRNA gene, reverse (positions 188 to 208).	GGTACTTAGATGTTTCAGTTC	56	Gurtler and Stanisch (1996)
fD1	16S rRNA gene, forward (positions 8 to 27).	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	56	Weisburg et al. (1991)
rD1	16S rRNA gene, reverse (positions 1525 to 1542).	TAAGGAGGTGATCAGCC	56	Weisburg et al. (1991)
V3P1	16S rRNA gene, forward (positions 340 to 356).	CCTACGGGAGGCAGCAG	62	Parayre et al. (2007)
V3P2	16S rRNA gene, forward (positions 517 to 533).	ATTACCGCGGCTGCTGG	62	Parayre et al. (2007)
V3P3	16S rRNA gene, forward (positions 340 to 356) with GC clamp.	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGG GGCACGGGGG GCCTACGGGAGGCAGCAG	62	Parayre et al. (2007)

^a Positioning primers are based on *Escherichia coli* numbering of 16S rDNA (GenBank accession number J01859) and 23S rDNA (GenBank accession number V00331).

Table 3
Sensory classification of samples according to spoilage category, during storage at 5 and 15 °C.

Day of storage	Batch A at 5 °C			Batch B at 5 °C ^a			Batch A at 15 °C			Batch B at 15 °C ^a		
	NS ^a (%)	LS ^b (%)	SS ^c (%)	NS ^a (%)	LS ^b (%)	SS ^c (%)	NS ^a (%)	LS ^b (%)	SS ^c (%)	NS ^a (%)	LS ^b (%)	SS ^c (%)
1	85	15	0	77	23	0	85	15	0	62	31	8
4	88	13	0	50	50	0	88	13	0	38	63	0
12	100	0	0	82	18	0	45	45	9	45	45	9
15	100	0	0	64	36	0	36	45	18	36	55	9
19	92	8	0	58	33	8	33	67	0	33	58	8
22	92	8	0	8	58	33	25	50	25	17	50	33
27	73	27	0	27	36	36						
33	75	25	0	8	75	17						

^a NS: non-spoiled.
^b LS: lightly spoiled.
^c SS: strongly spoiled.

Furthermore, at the spoilage time the H₂S-producing bacteria were investigated in iron agar (IA) with 0.04% of L-cysteine as described by Gram (1987).

2.5. Identification of bacterial isolates

When shrimp samples were considered as spoiled by the sensory panelists (22 days for batches stored at 15 °C and 33 days for those stored at 5 °C) approximately 25 to 30 isolates (5 °C) and 40 to 45 (15 °C) were randomly selected by picking colonies from LH and IA agar, respectively, of the highest dilution showing growth. Thus, 137 isolates were collected and purified twice on brain heart infusion agar (BHI, Biokar Diagnostic, Beauvais, France). Each isolate was then characterized morphologically by phase contrast microscopy and examined for motility, Gram reaction with KOH (Gregersen, 1978), catalase activity by the 3% H₂O₂ method and cytochrome oxidase production by Bactident Oxidase reagent (Merck, Darmstadt, Germany). In order to characterize the isolates at species or genus level more precisely, several molecular tests based on the PCR principle were used. The chromosomal DNA of the isolated strains was extracted using the Qiagen DNeasy Tissue Kit (Qiagen, S.A., Courtaboeuf, France). All the oligonucleotide PCR primers used in this study were obtained from Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and are listed in Table 2. The PCR amplification of the 16S-23S Intergenic Spacer Regions (ISRs), using the primer pairs 16S-p2/23S-p7 or 16S-p4/23S-p7, was carried out for the molecular identification of the presumptive LAB strains (Gram-positive, catalase- and oxidase-negative isolates). The restriction fragment length polymorphism (RFLP) of amplified 16S rDNA with the restriction endonucleases *Mbo*I and *Hha*I (Cambon-Bonavita et al., 2001) was carried out for the molecular identification of

the presumptive LAB and the presumptive *B. thermosphacta* strains (Gram-positive, catalase-positive isolates). The presumptive *Enterobacteriaceae* strains (Gram-negative, oxidase-negative) were identified using the API 20E system (BioMérieux, Marcy l’Étoile, France) according to the supplier’s instructions. Finally, for each strain or group of strains identified as belonging to a bacterial species or genus by the previous techniques, the 16S rDNA gene was sequenced on 1500 nucleotides for one or several representative strains of each group, depending on the group size. The 16S rDNA were amplified by PCR from chromosomal DNA with primer pairs fD1 and rD1 (Table 2). The PCR mixture (50 µl) contained as final concentrations: 200 µmol l⁻¹ of desoxynucleotide triphosphate mix (Interchim, Montluçon, France), 1x Taq buffer containing (10 mmol l⁻¹ Tris-HCl [pH 9.0], 50 mmol l⁻¹ KCl, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.2 mg/ml BSA), 1.5 U of Taq DNA polymerase (MP Biomedicals, Strasbourg, France), 0.4 µmol l⁻¹ of each primer, and 50 ng of template DNA (estimated by O.D. at 260 nm). PCR amplification was performed in a PTC-100 Thermocycler (MJ Research Inc., Watertown MA, USA) using the following protocol: initial denaturation (94 °C for 5 min), followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 1 min), primer annealing (56 °C for 1 min 15 s) and extension (72 °C for 1 min 15 s). A final extension at 72 °C for 10 min was performed. PCR products were separated in a 1.5% (w/v) agarose gel (MP Biomedicals, Strasbourg, France) containing ethidium bromide (0.5 µg/ml), and were subsequently visualized by UV illumination ImageMaster VDS-CL (Amersham. Pharmacia Biotech, Orsay, France). The PCR product length was evaluated with a DNA Ladder MassRuler™ (Fermentas Life Science, Vilnius, Lithuania). The nucleotide sequence of the amplified 16S rDNA was determined with an ABI 370 automated sequencer using the Taq Dye-Deoxy TM terminator cycle sequencing method (Genome Express Company, Meylan, France). Anticipated errors of sequencing reactions were avoided by sequencing both DNA strands with a set of 5 internal primers (not published) of the 16S rDNA. The 5 resulting sequences were assembled into a unique contig with BioEdit sequence alignment software (Hall, 1999). The contig sequences were then submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The computer program CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) was used for sequence alignment, and the Basic Local Alignment Search Tool 2 program (BLAST) for representation of sequence and similarity searches in the GenBank database. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 4.0. (Tamura et al., 2007).

2.6. TTGE analysis

2.6.1. Direct bacterial DNA extraction from shrimp matrix

The shrimp samples (30 g) were homogenized for 2 min in 270 ml of sterile saline solution (0.85% NaCl; 0.1% peptone; 2% tween 80) using a stomacher 400 (Seward Medical). In order to separate the

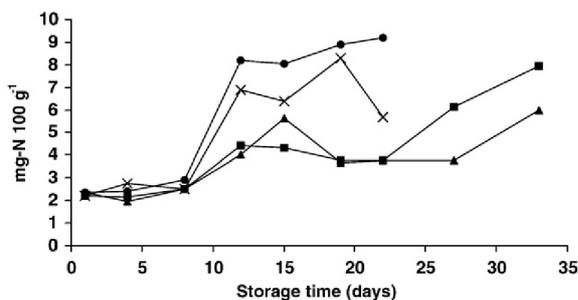


Fig. 1. Trimethylamine (TMA) production (mg-N 100 g⁻¹) in both batches of cooked and peeled shrimps, packed in a modified atmosphere. (▲): batch A stored at 5 °C; (●): batch A stored at 15 °C; (■): batch B stored at 5 °C; (×): batch B stored at 15 °C.

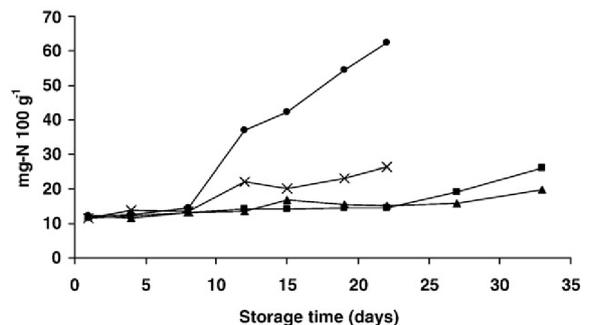


Fig. 2. Total volatile base nitrogen (TVBN) production (mg-N 100 g⁻¹) in both batches of cooked and peeled shrimps, packed in a modified atmosphere. (▲): batch A stored at 5 °C; (●): batch A stored at 15 °C; (■): batch B stored at 5 °C; (×): batch B stored at 15 °C.

eukaryotic cells and DNA of shrimps from the bacterial cells, 10 ml of homogenized suspension was filtered on a Nucleospin Plant L column (Macherey-Nagel, Hoerd, France) by centrifugation at 8500 rpm for 10 min at room temperature. Supernatant was carefully removed and the bacterial cell pellet resuspended in 400 μ l of enzymatic lysis solution (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM sodium EDTA, 1.2% Triton X-100, 20 mg/ml lysozyme, 11.6 U mutanolysine) then transferred into a 2 ml microtube and incubated at 37 °C for 1 h. A mechanical lysis step was then performed by addition of 0.3 g of glass beads (150 to 200 μ m diameter) and shaking during two cycles of 2 min in a bead beater MM200 (30 Hz) (Retsch, Haan, Germany) interspersed by 2 min of storage in ice. Proteins were digested by proteinase K (20 mg/ml) with 200 μ l of AL buffer (DNeasy blood and tissue kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) and incubated at 56 °C for 30 min. To pellet the glass beads, centrifugation at 10,000 rpm for 3 min was carried out and the supernatant was transferred to a 2 ml microtube to perform nucleic acid precipitation by addition of 200 μ l of ice-cold absolute ethanol. DNA purification was carried out using a DNeasy blood and tissue kit as described in the Qiagen instruction manual.

2.6.2. PCR amplification

The V3 region (194 bp) PCR-amplicons were prepared using the primers V3P2 and V3P3-GC-Clamp (Table 2). The PCR mixture (40 μ l) contained as final concentrations: 800 μ mol l⁻¹ of deoxynucleotide triphosphate mix (Interchim, Montluçon, France), 1X Taq buffer containing (10 mmol l⁻¹ Tris-HCl [pH 9.0], 50 mmol l⁻¹ KCl, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.2 mg/ml BSA), 2.5 U of Taq DNA polymerase (MP Biomedicals, Strasbourg, France), 1 μ mol l⁻¹ of each primer, and 10 μ l of template DNA. PCR amplification was performed in a PTC-100 Thermocycler (MJ Research Inc) using the following protocol: initial denaturation (94 °C for 5 min), followed by

40 cycles of denaturation (94 °C for 30 s), primer annealing (62 °C for 30 s) and extension (72 °C for 1 min). A final extension at 72 °C for 30 min was performed. This last step was sufficiently long to prevent the artifactual formation of double bands (Janse et al., 2004). The size and quantity of PCR products were determined in a 1.5% (w/v) agarose gel (MP Biomedicals, Strasbourg, France) against a DNA Ladder MassRuler™ (Fermentas Life Science).

2.6.3. TTGE gel analysis

TTGE was performed using the DCode universal mutation detection system (BioRad, Marne-la-Coquette, France). Polyacrylamide gels, 16 cm by 16 cm by 1 mm, were constructed with two layers including resolving and stacking gels. Resolving gels were prepared with 9.5% (w/v) acrylamide stock solutions (acrylamide-bisacrylamide; 37.5:1) and a final urea concentration of 8 M. Stacking gels were prepared without urea, with 16% (w/v) acrylamide stock solutions (acrylamide-bisacrylamide; 37.5:1). Gels were prepared and run with 1.25X TAE buffer diluted from 50X TAE buffer (2 M Tris base, 1 M glacial acetic acid, 50 mM EDTA). Chemical polymerization of acrylamide gels was initiated by ammonium persulfate and the quaternary amine, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) after pouring into the vertical glass plate sandwich. Following polymerization, gels were left overnight at 4 °C. Before loading the PCR products, the wells were rinsed with 1.25X TAE buffer. 20 μ l of PCR products with 1X of loading buffer were deposited in wells. The electrophoresis run was performed at 50 V for 12h30 with a temperature gradient of 65 °C to 70 °C (rate of 0.4 °C·h⁻¹) under stirring with a magnetic stirrer to mix the buffer and improve the temperature gradient homogeneity (Ogier et al., 2002). After the run, gels were rinsed for 20 min in Milli-Q water (Millipore, Molsheim, France), stained for 30 min in 300 ml of 3X GelRed™ staining solution (FluoProbes®, Interchim, Montluçon,

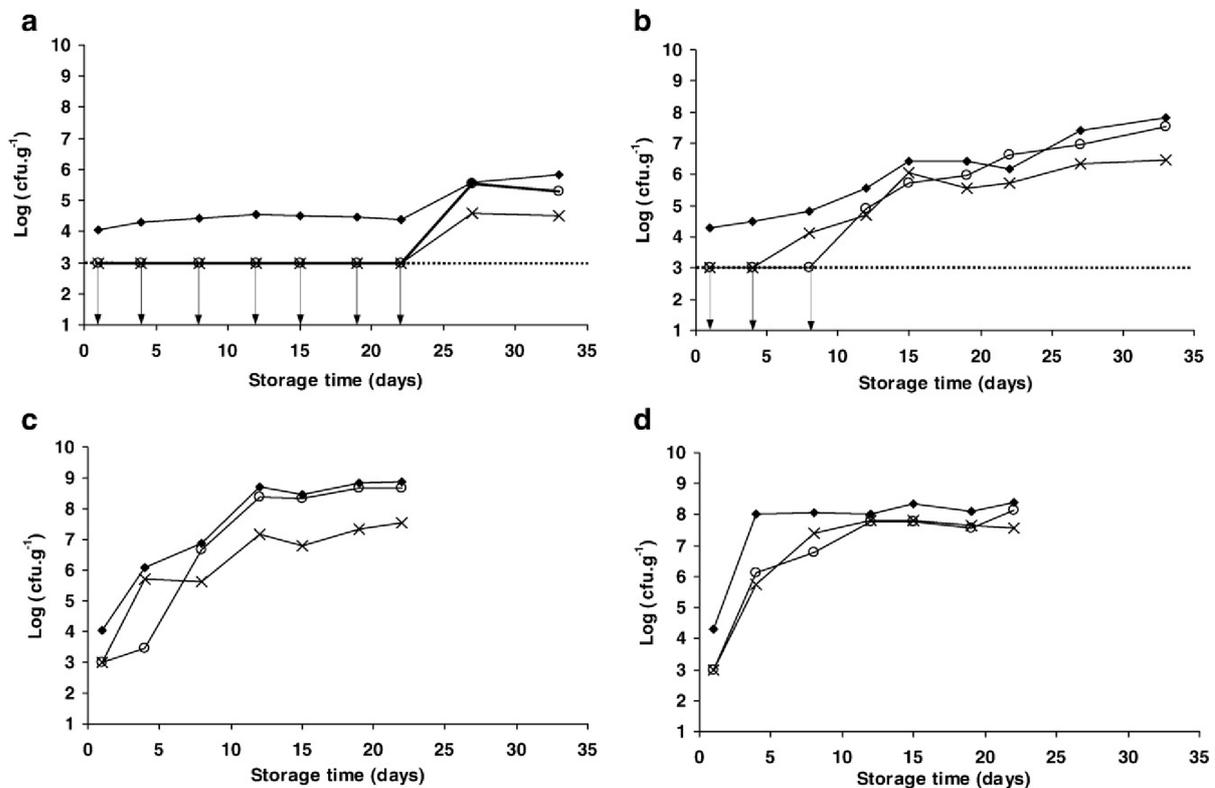


Fig. 3. Bacterial growth evolution in (●): total aerobic viable count (TAVC), (○): lactic acid bacteria (LAB) and (×): *Brochothrix thermosphacta*, of cooked and peeled shrimps packed in a modified atmosphere, stored at 5 °C (a, b: for batch A and B respectively), and 15 °C (c, d: for batch A and B respectively). The symbol "↓" indicates that counts were below the enumeration threshold.

France) in H₂O with 0.1 M NaCl, then rinsed in Milli-Q water and photographed by UV illumination ImageMaster VDS-CL (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France).

2.6.4. TTGE fragment cloning and sequencing

Bands excised from TTGE gels using a sterile blade were eluted in 200 µl of Milli-Q water. The eluted DNA (10 µl) was re-amplified with primers V3P2 and V3P3-GC-Clamp and the amplicons were subjected to TTGE analysis to confirm their relative positions. The eluted DNA was then re-amplified with primers V3P2 and V3P1 (V3P3 lacking the GC clamp). PCR products were then purified with the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) and cloned in the pCR®4-TOPO® vector, then chemically competent *Escherichia coli* DH5α were transformed, using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cloning of the PCR products was necessary because TTGE analysis revealed weak bands in addition to the excised bands after re-amplification (Ogier et al., 2002). Approximately 10 clones were selected for each excised band and they underwent plasmid DNA extraction with a miniprep kit (Qiaprep, Qiagen). A PCR amplification of cloned fragments was then carried out with V3P1 and V3P2 primers and the amplicons were subjected to another TTGE to select the positive clones that contained specifically the V3 fragment corresponding to the excised band without artifact bands. Cloned insert sequencing with M13 reverse and forward primers, sequence comparison and phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted as described above.

3. Results

3.1. Sensory analysis

At 5 °C, batch A stayed in the NS category for 33 days with 75% of votes against 25% for LS (Table 3). Batch B was classified as being LS after

22 days with 58% of votes. At 15 °C, the sensory detection of spoilage progressed more rapidly. In fact, for batch A, after 12 days of storage approximately half of the assessors considered it as being LS with 45% of votes, and this level stayed constant until the end of storage. Batch B at 15 °C showed some similarities with the spoilage profile at 5 °C. However, the distribution in the LS category was slightly higher than at 5 °C. During this sensory analysis, the theoretical spoilage time of shrimps, which corresponds to at least 50% of the assessors classing the product in the SS category, was never reached for any batch. However, after 27 and 19 days of storage for the batches stored at 5 and 15 °C respectively, a swelling of the packets was detected as well as the release of a sulfurous off-odor. At day 33 and day 22 for both batches stored at 5 and 15 °C respectively, the swelling packets and the off-odor production were confirmed. Nevertheless, they were not perceived by the trained panelists due to the initial opening and repackaging operation carried out for the sensory analysis. Taking into account these spoilage characteristics, and that the use-by date had expired (i.e. 22 and 21 days for batch A and B respectively), the spoilage time was fixed at 33 and 22 days for the batches stored at 5 and 15 °C, respectively.

3.2. Chemical analysis

Trimethylamine (TMA) levels did not exceed 3 mg-N TMA 100 g⁻¹ until 5 days of storage for both batches stored at 5 and 15 °C (Fig. 1). Except for batch B stored at 15 °C, the highest production was observed at the end of the storage period, attaining about 6, 9 and 8 mg-N TMA 100 g⁻¹, respectively, for batch A stored at 5 and 15 °C, and batch B stored at 5 °C. The initial TVBN content in both batches was below 15 mg-N TVBN 100 g⁻¹ until 8 days of storage (Fig. 2). For the remaining period, the highest production rate was observed in batch A stored at 15 °C, reaching approximately 60 mg-N TVBN 100 g⁻¹ at the end of the storage time (i.e. 22 days). TVBN production for the other batch was slower and

Table 4

Bacteria isolated during this study, with information about their origin from either batch, stored at 5 and 15 °C, and identification based on molecular tests.

Cluster	Number of isolates	Batch				Molecular tests				Accession no.	
		A- 5 °C	B- 5 °C	A- 15 °C	B- 15 °C	PCR ITS ^a	PCR RFLP	16S rRNA Sequencing			
								No. of sequenced strains	% Identity (Blastn/NCBI)	Significant alignment with type strain (Blastn/NCBI) ^b	
1	23	4	14	-	5	16S ² -23S ⁷	-	1	97*	<i>C. divergens</i> (DSM20623 ¹)	M58816
2	9	-	-	9	-	16S ² -23S ⁷	-	1	98*	<i>C. maltaromaticum</i> (DSM 20342 ¹)	M58825
3	5	1	4	-	-	16S ² -23S ⁷	-	5	98/98 ⁽³⁾	<i>C. alterfunditum</i> (ACAM 313 ¹)/ <i>C. pleistocenicum</i> (FTR1 ¹)	L08623/AF450136
									98/97 ⁽²⁾	<i>C. pleistocenicum</i> (FTR1 ¹)/ <i>C. alterfunditum</i> (ACAM 313 ¹)	L08623/AF450136
4	13	-	-	7	6	16S ² -23S ⁷ 16S ⁴ -23S ⁷	+	4	100/99 ⁽²⁾	<i>V. fluvialis</i> (CCUG 32704 ¹)/ <i>V. carniphilus</i> (ATCC BAA-640 ¹)	Y18098/AY179329
									99/98 ⁽²⁾	<i>V. fluvialis</i> (CCUG 32704 ¹)/ <i>V. carniphilus</i> (ATCC BAA-640 ¹)	Y18098/AY179329
5	13	-	2	-	11	16S ² -23S ⁷ 16S ⁴ -23S ⁷	+	5	97/97 ⁽⁴⁾	<i>V. carniphilus</i> (ATCC BAA-640 ¹)/ <i>V. fluvialis</i> (CCUG 32704 ¹)	AY179329/Y18098
									97/96 ⁽¹⁾	<i>V. carniphilus</i> (ATCC BAA-640 ¹)/ <i>V. fluvialis</i> (CCUG 32704 ¹)	Y18098/AY179329
6	3	-	-	3	-	16S ² -23S ⁷ 16S ⁴ -23S ⁷	+	1	99	<i>E. faecalis</i> . (LMG 7937 ¹)	AJ301831
7	4	-	-	3	1	16S ² -23S ⁷ 16S ⁴ -23S ⁷	+	1	99	<i>E. faecium</i> . (DSM 20477 ¹)	AJ276355
8	1	-	-	-	1	16S ² -23S ⁷ 16S ⁴ -23S ⁷	+	1	99	<i>A. viridans</i> . (ATCC 11563 ¹)	M58797
9	51	21	9	3	18	-	+	3	99 ⁽³⁾	<i>B. thermosphacta</i> (ATCC 11509 ¹)	M58798
10	15	-	-	15	-	-	-	2	99 ⁽²⁾	<i>S. proteamaculans</i> . (DSM 4543 ¹)	AJ233434
Total	137	26	29	40	42						

* indicates a weak sequence homology percentage due to the presence of unidentified nucleotides (N: A, T, G or C) in the sequence. ⁽¹⁾, ⁽²⁾, ⁽³⁾ and ⁽⁴⁾ specify the strain number for each Blastn result.

^a 16S²-23S⁷, 16S⁴-23S⁷: PCR amplification of the 16S-23S Intergenic Spacer Regions (ISRs), using the primer pairs 16S-p2/23S-p7 or 16S-p4/23S-p7.

^b Abbreviations: *C. Carnobacterium*; *V. Vagococcus*; *E. Enterococcus*; *A. Aerococcus*; *B. Brochothrix*; *S. Serratia*. DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; ACAM, Australian Collection of Antarctic Microorganisms, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, Australia; FTR1T (= ATCC BAA-754¹), strain type of *C. pleistocenicum* sp. Nov (Pikuta et al., 2005); CCUG, Culture Collection, University of Göteborg, Sweden; ATCC, American Type Culture Collection, USA; LMG, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium.

more gradual, with a maximum production of approximately 26 mg-N TVBN 100 g^{-1} for batch B stored at 5 °C and 15 °C after 33 and 22 days of storage respectively, while batch A stored at 5 °C displayed a value of approximately 20 mg-N TVBN 100 g^{-1} after 33 days of storage.

3.3. Microbiological analysis by culture-dependent methods

Batch A displayed low microbiota development at 5 °C (Fig. 3a) with TAVC reaching a value of 4 Log cfu g^{-1} after 22 days of storage. In the same period, the LAB and *B. thermosphacta* counts were below the enumeration threshold (<3 Log cfu g^{-1}). After 25 days of storage, the microbiota increased to reach a value of approximately 5 Log cfu g^{-1} for TAVC and LAB and 4 Log cfu g^{-1} for *B. thermosphacta* at the end of the

storage period (i.e. 33 days). The same batch stored at 15 °C (Fig. 3c) showed a greater microbiota development with a growth for TAVC from 4 Log cfu g^{-1} at day 1 to 8.5 Log cfu g^{-1} at day 12. Over the same period, LAB and *B. thermosphacta* grew from 3 to 8.5 and 3 to 7 Log cfu g^{-1} respectively. Then, their respective count stayed constant until the end of storage (i.e. 22 days). Batch B at 5 °C (Fig. 3b) presented a slightly higher microbiota level than the batch A at the same temperature. In fact, after 15 days of storage, the TAVC reached approximately 6.5 Log cfu g^{-1} while LAB and *B. thermosphacta* reached 6 Log cfu g^{-1} . Up to 33 days of storage, growth was perceptible for TAVC and LAB, which reached approximately 7.5 Log cfu g^{-1} , while *B. thermosphacta* level stayed constant. At 15 °C (Fig. 3d), the microbiota increased very quickly with 8 Log cfu g^{-1} for TAVC before 5 days of storage and this value stayed

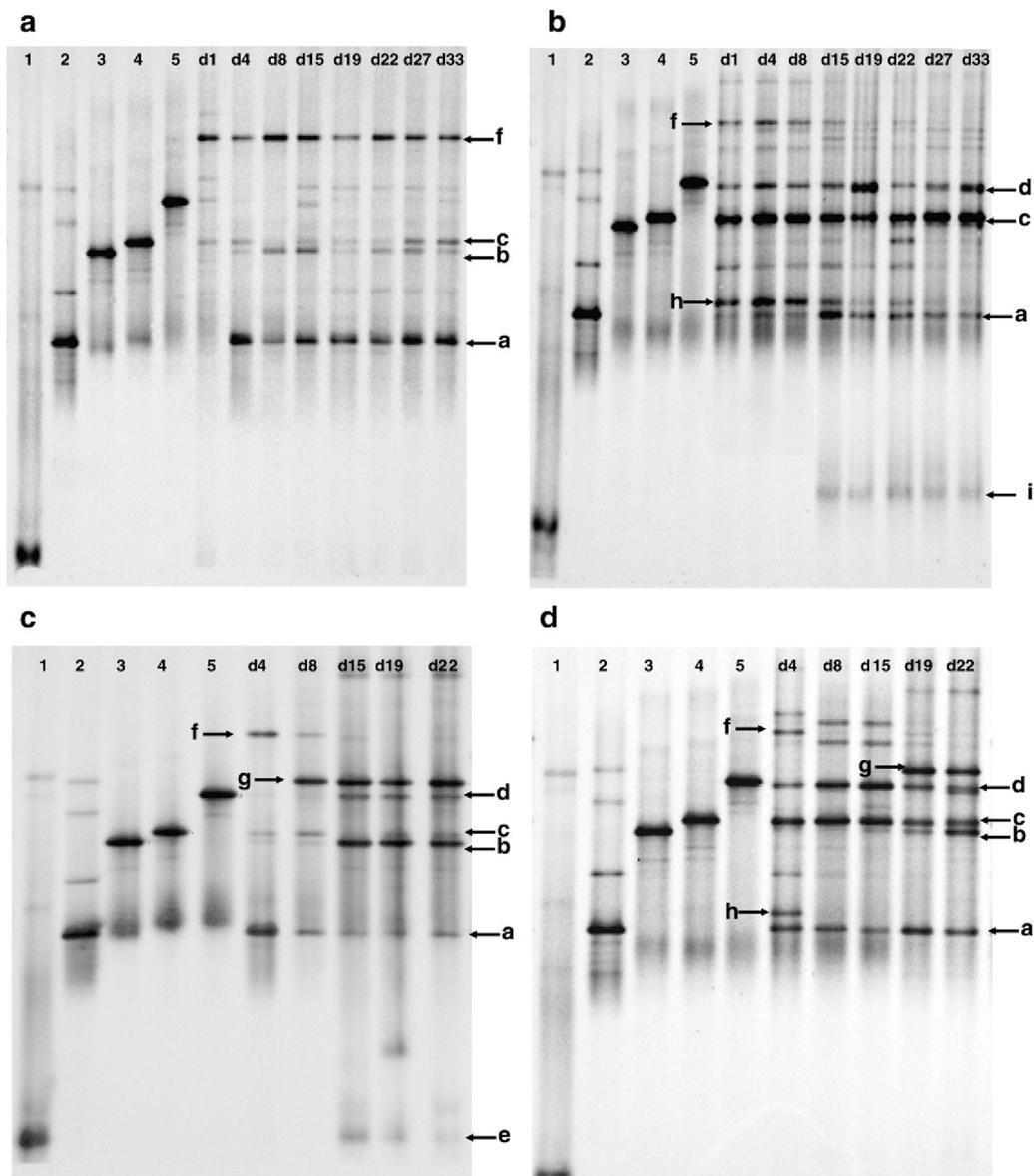


Fig. 4. TTGE profiles of 16S rDNA gene V3 regions obtained by PCR amplification from total bacterial DNA extraction of both shrimp batches stored at 5 °C (a,b: for batch A and B respectively) and 15 °C (c,d: batch A and B respectively). Lanes 1 to 5: bacterial reference strain profiles. 1, *Serratia liquefaciens* (CIP 103238^T); 2, *Brochothrix thermosphacta* (CIP 103251^T); 3, *Enterococcus faecalis* (CIP 103015^T); 4, *Carnobacterium divergens* (CIP 101029^T); 5, *Carnobacterium maltaromaticum* (CIP 103135^T). Lanes d1 to d33: shrimp matrix profiles obtained for each day of analysis. Assignment of bacterial reference strain profiles to PCR-TTGE bands obtained from shrimp matrix: a, *B. thermosphacta*; b, *E. faecalis*; c, *C. divergens*; d, *C. maltaromaticum*; e, *Serratia liquefaciens*; f, g, h and i, unassigned bands with the bacterial reference strain profiles, considered as unknown bands.

constant during the remaining storage period. The LAB and *B. thermosphacta* grew from 3 to 8 Log cfu g⁻¹ between days 1 and 12 respectively. Then, their respective count stayed constant until 22 days.

3.4. Identification of bacterial isolates

The 137 bacterial isolates obtained from both batches of cooked and peeled shrimps stored at 5 and 15 °C were divided into three main groups based on phenotypic tests (Gram reaction, oxidase, catalase). The biggest was the LAB group with 71 isolates, followed by a group with 51 isolates identified as belonging to the *Listeriaceae* family. For the latter, a complementary phenotypic test was conducted on STAA agar to check the growth capacity on this selective medium for *B. thermosphacta*. For all these 51 isolates, positive growth was observed after 24 to 48 h, indicating the presumption of *B. thermosphacta*. The third group of 15 isolates corresponded to the *Enterobacteriaceae* family. Within each group, several molecular tests enabled a more thorough identification (Table 4). For the LAB group, the PCR-ITS 16S-p2/23S-p7 displayed three different clusters corresponding to the *Carnobacterium* genus according to the electrophoresis profiles (Rachman et al., 2004) and a fourth sub-group that was identified, and confirmed by PCR ITS 16s-p4/23S-p7, as being different from *Carnobacterium*. For this latter group, the PCR-RFLP on the 16S rRNA gene revealed 5 different electrophoresis profiles corresponding to clusters 4 to 8. The 16S rRNA gene sequencing allowed the bacterial species corresponding to each cluster to be identified. Cluster 1, the largest, consisted of 23 strains identified as belonging to *C. divergens*. Next came cluster 2, constituted by 9 strains belonging to *C. maltaromaticum*, then cluster 3 with 5 strains showing a very close identification with *C. alterfunditum* and *C. pleistocenium*, for which an identical 16S rDNA sequence identity was obtained (i.e. 98%). The LAB clusters 4 and 5 contained 13 strains each, which were identified as belonging to the *Vagococcus* genus with a very close identification for *V. fluvialis* and *V. carniphilus*. However, for cluster 5, the weak sequence identity (i.e. 97% and 96%) indicated a doubtful identification for these two species. The LAB clusters 6 and 7 were constituted by 3 and 4 strains respectively, identified as being the *E. faecalis* and *E. faecium* species. Cluster 8 consisted of one strain belonging to *Aerococcus viridans*. The presumptive *B. thermosphacta* were gathered in cluster 9 and were identified by PCR-RFLP and 16S rDNA gene sequencing, confirming

this species identification. The last cluster contained the *Enterobacteriaceae* strains, which were characterized by the API 20E system and 16S rDNA gene sequencing as *Serratia proteamaculans*.

3.5. Microbiological analysis by culture-independent methods

TTGE analysis was used to monitor the evolution of the bacterial ecosystem in both batches of cooked and peeled shrimps stored at 5 and 15 °C. Five bacterial species were chosen as references: *Serratia liquefaciens*, *B. thermosphacta*, *E. faecalis*, *C. divergens*, and *C. maltaromaticum* (Fig. 4), depending on the results of the cultural methods. The TTGE profiles of shrimp samples revealed 9 different major bands (a to i) among which 5 could be potentially assigned (a to e) by comparing the band migration position to that of the reference strain profiles. The four other bands (f to i) were unassigned and were considered as unknown bands. These assignments were then confirmed by cloning and sequencing the gel-excised bands as well as the unknown bands in order to identify the bacterial species to which they corresponded (Table 5). Batch A stored at 5 °C (Fig. 4a) revealed a very weak bacterial diversity at the beginning of the analysis, particularly for day 1, which showed a profile constituted by only one major unassigned band. The sequencing investigation identified an uncultured *Firmicute* (band f). From 4 until 33 days of storage, several other bands appeared in the profiles with 3 major bands assigned to and confirmed by sequencing as *B. thermosphacta* (band a), *E. faecalis* (band b) and *C. divergens* (band c). For the same batch stored at 15 °C (Fig. 4c), the TTGE profiles showed some similarities early in storage (i.e. days 4 and 8) with day 33 at 5 °C. However, after 15 days of storage, band f (uncultured *Firmicute*) was absent but 3 other bands were displayed, corresponding to *C. maltaromaticum* (band d) and *S. liquefaciens* (band e). The latter was finally identified by sequencing as being from the *Buttiauxella* genus, with ambiguity about the exact species (Table 5). The third species was an unassigned band identified by sequencing as being the *E. faecium* species (band g). For batch B stored at 5 °C (Fig. 4b), the first half of the storage period, up to day 15, displayed a similar profile with 4 major bands. Two of them were assigned to and confirmed by sequencing as *C. divergens* (band c) and *C. maltaromaticum* (band d). Two other bands corresponded to *Firmicute* (band f) and an unassigned band, which was identified by sequencing as being the *Psychrobacter* genus (band h). In the second period of storage, bands

Table 5
Band identification by cloning and sequencing of V3 fragments excised from TTGE profiles.

Shrimp sample	Band	Assigned species ^a	Number of sequenced clones	% Identity (Blastn/NCBI)	Significant alignment with type strain (Blastn/NCBI) ^a	GenBank accession no.
A5-d4	a	<i>B. thermosphacta</i>	3	99	<i>B. thermosphacta</i> (ATCC 11509 ^T)	M58798
A5-d8	a	<i>B. thermosphacta</i>	1	99	<i>B. thermosphacta</i> (ATCC 11509 ^T)	M58798
A15-d22	b	<i>E. faecalis</i>	1	100	<i>E. faecalis</i> (ATCC 19433 ^T)	DQ411814
A5-d8	c	<i>C. divergens</i>	1	98	<i>C. divergens</i> (NCDO 2763 ^T)	X54270
B5-d1	c	<i>C. divergens</i>	1	98	<i>C. divergens</i> (NCDO 2763 ^T)	X54270
A15-d15	d	<i>C. maltaromaticum</i>	3	99	<i>C. maltaromaticum</i> (DSM 20342 ^T)	M58825
A15-d15	e	<i>S. proteamaculans</i>	2	100	<i>Buttiauxella noackiae</i> (ATCC 51607 ^T)	AJ293689
				100	<i>Bt. agrestis</i> (ATCC 33320 ^T)	AJ293685
				100	<i>Bt. gaviniae</i> (DSM 9393 ^T)	AJ233403
				100	<i>Bt. ferrugutiae</i> (DSM 9390 ^T)	AJ233402
A5-d1	f	Unassigned band	3	98	Uncultured <i>Firmicute</i>	AF434138
A15-d8	g	Unassigned band	3	100	<i>E. faecium</i> (ATCC 19434 ^T)	DQ411813
A15-d15	g	Unassigned band	1	100	<i>E. faecium</i> (ATCC 19434 ^T)	DQ411813
B5-d4	h	Unassigned band	2	100	<i>Psychrobacter aquimaris</i> (DSM 16329 ^T)	AY722804
				100	<i>P. okhotskensis</i> (MD17 ^T = NCIMB 13931 ^T)	AB094794
				100	<i>P. urativorans</i> (DSM 14009 ^T)	AJ609555
				100	<i>P. fozii</i> (LMG 21280 ^T)	AJ430827
				99	<i>P. articus</i> (DSM 17307 ^T)	CP000082
B5-d22	i	Unassigned band	2	100	<i>Citrobacter gillenii</i> (CDC 4693–86 ^T = ATCC 51117 ^T)	AF025367

^a Abbreviations: B, *Brochothrix*; E, *Enterococcus*; C, *Carnobacterium*; Bt, *Buttiauxella*; P, *Psychrobacter*. ATCC, American Type Culture Collection, USA; NCDO National Collection of Dairy Organisms, currently named NCFB, National Collection of Food Bacteria, Aberdeen, Scotland; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; CCUG, Culture Collection, University of Göteborg, Sweden; LMG, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium; NCIMFB, National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria, Aberdeen, Scotland.

f and h were absent and replaced by band a (*B. thermosphacta*) and an unassigned band corresponding to *Citrobacter gillenii* (band i). At 15 °C, batch B (Fig. 4d) showed a similar profile at day 4 as at day 15 at 5 °C except for the band corresponding to *C. gillenii* (band i), which was absent. However, at the end of the storage period (day 19 and day 22), several bands appeared corresponding to *E. faecalis* (band b) and *E. faecium* (band g).

4. Discussion

The interest of the polyphasic approach, combining cultural and non-cultural methods, was to compile as exhaustive an inventory as possible of the microbial diversity of commercial, cooked, tropical shrimp samples studied and to identify the bacteria that make up the spoilage microbiota. However the number of batches is too low to consider this work as representative of this type of ecosystem. In order to conform with previous studies that described the use of low and high storage temperatures to cover a broad range of spoilage bacteria (Dalgaard and Jorgensen, 2000; Dalgaard et al., 2003), 5 °C was chosen as the chill temperature and 15 °C as the abuse temperature leading to the acceleration of the spoilage process. Although the spoilage time was not perceived clearly by the panelists, the swelling of packets and the release of a sulfurous off-odor were indications of spoilage. At 5 °C, these spoilage signs appeared at 27 days of storage for both batches i.e. at maximum microbiota growth. However, some previous studies have shown no direct correlation between the total count of bacteria and the spoilage rate (Huss et al., 1974; Huis in 't Veld, 1996) and in the majority of seafood products, sensory rejection begins several days or weeks after the maximum total count (Truelstrup et al., 1995; Koutsoumanis and Nychas, 1999; Leroi et al., 2001). This was not the case for both batches stored at 5 °C, and in particular for batch A, which showed a restrained level of total count until the end of storage.

The identification of strains collected at the spoilage time shows the prevalence of two bacterial groups i.e. *B. thermosphacta* and *Carnobacterium* with notably *C. divergens* and the closely related *C. alterfunditum/pleistocenium* cluster. *B. thermosphacta* is already known to be responsible for off-odor production (cheese, rank) in red meat and cooked ham (Dainty and Mackey, 1992; Vasileopoulos et al., 2007) and in cold-smoked salmon (blue cheese and butyric acid) (Leroi et al., 1998; Joffraud et al., 2001). *C. divergens* has been shown to produce some spoilage compounds, such as the biogenic amine tyramine (Masson et al., 1996), notably in cold-smoked salmon (Connil et al., 2002). Nevertheless, we have found no previous studies involving *C. alterfunditum* or *C. pleistocenium* in a seafood spoilage process and this is the first identification of these species in a food ecosystem. *C. alterfunditum* has previously been isolated from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica (Franzmann et al., 1991) and *C. pleistocenium* from permafrost in the Fox Tunnel in Alaska (Pikuta et al., 2005). More recently, some studies have shown that the production of off-odors (butter, wet-dog) in cooked and peeled MAP nordic shrimps, was caused by the combined activity of *B. thermosphacta* and *Carnobacterium* species such as *C. maltaromaticum*, *C. divergens* and *C. mobile* (Mejlholm et al., 2005; Laursen et al., 2006). Thus, the off-odor production in both batches stored at 5 °C could be the result of interactions between *B. thermosphacta* and *C. divergens*.

At 15 °C, the spoilage signs were perceptible when the total count had already reached its maximum at day 12 and day 4 for batch A and B respectively. The spoilage microbiota of batch A was dominated by a majority of *S. proteamaculans*, followed by *C. maltaromaticum* and the closely related *V. fluvialis/carniphilus* cluster 4. It is not surprising to identify *S. proteamaculans*, also called *S. liquefaciens*-like (Grimont et al., 1982), in the spoilage microbiota. In fact, they have previously been found to produce specific off-odors/flavors associated with cold-smoked salmon (Stohr et al., 2001; Joffraud et al., 2006). In contrast, this is the first time that the *Vagococcus* genus has been found in a spoilage microbiota. It was established as a separate genus by Collins et al. (1989).

It was described as having a close phylogenetic relationship with the genera *Enterococcus* and *Carnobacterium* (Wallbanks et al., 1990) and is often difficult to differentiate on the basis of conventional phenotypic characteristics. Shewmaker et al. (2004) have isolated *V. carniphilus* species from ground beef and have shown that, on the basis of 16S rDNA, it has a close relationship with *V. fluvialis*. The latter has been recovered from diverse sources, including human clinical specimens such as blood, peritoneal fluid and wounds (Teixeira et al., 1997), and various domestic animals such as chickens, pigs, cattle, horses and cats (Pot et al., 1994). A few species of the *Vagococcus* genus have been related to an aquatic environment; *V. salmoninarum* and *V. fluvialis/carniphilus* have been isolated from diseased salmonid fish (Schmidtke and Carson, 1994; Michel et al., 2007). Other members of the spoilage microbiota of batch A at 15 °C were *E. faecalis* and *E. faecium*. Dalgaard et al. (2003) have already identified *Enterococcus* species, notably *E. faecalis*, in the spoilage microbiota of cooked and brined nordic shrimps stored at temperatures higher than 15 °C. The spoilage microbiota of batch B was constituted by similar bacterial species as batch A with notably *B. thermosphacta*, *C. divergens*, *V. fluvialis/carniphilus* (cluster 4) and a few *Enterococcus*. Moreover, another group of *Vagococcus* species (cluster 5) were identified, which showed a weak 16S rDNA identity percentage (97%) with *V. fluvialis* and *V. carniphilus*, whereas the species identification threshold on the basis of 16S rDNA (over 97% since the beginning of the 1990s) is now established at 98.7% minimum (Stackebrandt and Ebers, 2006). Consequently, we suggest that the strains belonging to cluster 5 could constitute a novel *Vagococcus* species. Several authors have shown that the shrimp microbiota composition at the spoilage time depend on multiple parameters such as temperature, the MAP composition, the presence or absence of brining treatment and the pH and composition of the brine. Thus, Mejlholm et al. (2008) had found *Pseudomonas fluorescens*, *E. faecalis*-like, *Enterococcus malodoratus*, *C. maltaromaticum*, coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and *Lactobacillus sakei* in cooked, brined nordic shrimp microbiota, stored at 7 °C, with a brine composed of benzoic, citric and sorbic acid. While a brine consisting of acetic, citric and lactic acid resulted in a microbiota made up of *L. sakei* and yeast exclusively. Mejlholm et al. (2005) have shown that the spoilage microbiota of cooked peeled nordic shrimps without brining treatment appears to consist of *C. maltaromaticum*, *B. thermosphacta* and *Psychrobacter* spp. However in this present study, it was not possible to discriminate between the MAP, brine or geographic location effects on spoilage microbiota of cooked shrimps, as these three parameters were different between both batches.

The PCR-TTGE technique employed to monitor the microbial ecosystem of these batches has provided further information on the composition of the spoilage microbiota, compared to that obtained from isolate identification alone. In fact, at the spoilage time for batches stored at 5 °C, TTGE profiles displayed some bands corresponding to bacterial species that were not identified among isolates. These species were the uncultured-Firmicute and *E. faecalis* in batch A and *C. maltaromaticum* and *C. gillenii* in batch B. It was similar for batches stored at 15 °C, with a band corresponding to *E. faecalis* and another to *C. maltaromaticum* in batch B. Furthermore, this technique enabled a dynamic monitoring of the microbial diversity during storage because, the moment when a spoilage organism appeared among the dominant species in the ecosystem could be determined. For example, for batch B stored at 5 °C, the turnover between *Psychrobacter* species and *B. thermosphacta* could be observed. In contrast, some species were not displayed by TTGE because they did not correspond to any band in the profiles. This was the case for *V. fluvialis/carniphilus* (clusters 4 and 5) and *C. alterfunditum/pleistocenium* (cluster 3). To investigate this, a TTGE analysis with these species and some reference strains of *Enterococcus* (*E. faecalis* and *E. faecium*) and *Carnobacterium* (*C. divergens* and *C. maltaromaticum*) was conducted. Thus, *V. fluvialis/carniphilus* (clusters 4 and 5) showed a migration distance identical to *E. faecalis* and *E. faecium* respectively and *C. alterfunditum/pleistocenium* to *C. divergens* (data not shown). This highlights one of the limitations of the TTGE technique: the co-migration

phenomenon. In fact, in some cases different species have identical sequences of the target gene, thus making it impossible to distinguish them. In other cases, species with a different sequence of the target gene may possess the same melting temperature (T_m) and thus migrate to the same position (Murray et al., 1996; Ogier et al., 2002). Hence, more discriminating areas are needed to differentiate strains, either in 16S rDNA regions or in other functional genes (Wawer and Muiyzer, 1995; Vasquez et al., 2001). Another limitation of TTGE methods, concerning the detection limit of bacterial species in a complex ecosystem, has also been described. Previous studies have shown that species representing less than 1% of the total community were thought not to be visible in the TTGE profiles of the microbial community (Muiyzer et al., 1993; Ogier et al., 2002). Despite this limitation, compared to cultural methods, TTGE enabled *B. thermosphacta* to be detected in batch A at 5 °C after 4 days of storage, whereas its population level was below the enumeration threshold on STAA agar until 22 days. It is the same observation for *Carnobacterium* species (*C. divergens*, *C. maltaromaticum*) which were detected at days 1, 4 and 8 by TTGE in batch B at 5 °C, whereas its population level was below the enumeration threshold on NAP agar until 8 days.

In conclusion, this polyphasic study has improved our knowledge of the spoilage microbiota of tropical cooked shrimps, and complements previous works devoted to nordic cooked shrimp microbiota. The PCR-TTGE technique is an excellent tool to distinguish species that are difficult to separate by culture-dependent methods. This is the first time that TTGE analysis or another molecular ecology method has been applied to monitor the dynamics of the bacterial community in cooked shrimp products. The use of this molecular approach should therefore allow a more comprehensive and rapid assessment of the shrimp microbiota, and provide a further insight into the dynamic evolution of the biodiversity in this ecosystem. To improve this analytical tool, a reference database of species-specific fingerprints devoted to shrimp microbiota will be developed in future work.

Acknowledgments

This study was carried out as part of the IMBIBOMER program, managed by pôle agronomique ouest (PAO) and financially supported by the regions Bretagne et Pays de La Loire. We are grateful to STAM department members: Frédérique Gigout, Mireille Cardinal, Josiane Cornet and André Daniel for the microbiological analysis, sensory analysis and chemical analysis respectively. UMR SECALIM members: Angélique Fourrier and Sébastien Meunier for the microbiological analysis. We thank Anne-Sophie Le Dizès from ADRIA Développement (Quimper) for their acquaintances in the PCR-TTGE technique.

References

Abriouel, H., Ben Omar, N., Lopez, R.L., Martinez-Canamero, M., Keleke, S., Galvez, A., 2006. Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods poto poto and degue by using three different DNA extraction methods. *International Journal of Food Microbiology* 111, 228–233.

AFNOR, 1987. Normalisation française. Analyse sensorielle. Directives générales pour l'implantation de locaux destinés à l'analyse sensorielle V09-105.

Al-Harbi, A.H., 2003. Bacterial flora of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), cultured in concrete tanks in Saudi Arabia. *Journal of Applied Aquaculture* 14, 113–124.

Cambon-Bonavita, M.A., Lesongeur, F., Menoux, S., Lebourg, A., Barbier, G., 2001. Microbial diversity in smoked salmon examined by a culture-independent molecular approach, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* 70, 179–187.

Chinivasagam, H.N., Bremner, H.A., Wood, A.F., Nottingham, S.M., 1998. Volatile components associated with bacterial spoilage of tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology* 42, 45–55.

Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Williams, A.M., 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequences analysis of *Lactococci* and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 433–437.

Connil, N., Plissoneau, L., Onno, B., Pilet, M.F., Prevost, H., Dousset, X., 2002. Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. *Journal of Food Protection* 65, 333–338.

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

Dainty, R.H., Mackey, B.M., 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* 73, pp. 1035–1145.

Dalgaard, P., Jørgensen, L.V., 2000. Cooked and brined shrimps packed in a modified atmosphere have a shelf-life of >7 months at 0 °C, but spoil in 4–6 days at 25 °C. *International Journal of Food Science & Technology* 35, 431–442.

Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P., Leisner, J.J., 2003. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 degrees C and 25 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 94, 80–89.

Davidson, C.M., Cronin, F., 1973. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Applied Microbiology* 26, 439–440.

Duthoit, F., Godon, J.-J., Montel, M.-C., 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3840–3848.

El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., Ogier, J.C., 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1248–1255.

FAO-CIHEAM, 2007. Conference (November). Seafood production and international trade: Global trends. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM), Zaragoza, Spain.

Ferchichi, M., Valcheva, R., Prevost, H., Onno, B., Dousset, X., 2007. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* 24, 678–686.

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

Gardner, G.A., 1966. A selective medium for the enumeration of *Microbacterium thermosphactum* in meat and meat products. *Journal of Applied Bacteriology* 29, 455–460.

Giacomazzi, S., Leroi, F., L'Henaff, C., Joffraud, J.J., 2004. rpoB-PCR amplified gene and temporal temperature gradient gel electrophoresis: a rapid tool to analyse bacterial strains representative of cold-smoked salmon microflora. *Letters in Applied Microbiology* 38, 130–134.

Gomez-Gil, B., Tron-Mayen, L., Roque, A., Turnbull, J.F., Inglis, V., Guerra-Flores, A.L., 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163, 1–9.

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

Gram, L., 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 4, 65–72.

Gregersen, T., 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 5, 123–127.

Grimont, P.A.D., Grimont, F., Irino, K., 1982. Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* sensu stricto, *Serratia proteamaculans*, and *Serratia grimesii* sp. nov. *Current Microbiology* 7, 69–74.

Gurtler, V., Stanisich, V.A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3–16.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.

Hanninen, M.L., Oivanen, P., Hirvela-Koski, V., 1997. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. *International Journal of Food Microbiology* 34, 17–26.

Harrison, J.M., Lee, J.S., 1969. Microbiological evaluation of Pacific shrimp processing. *Applied Microbiology* 18, 188–192.

Huis in 't Veld, J.H., 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33, 1–18.

Huss, H.H., Dalsgaard, D., Hansen, L., Ladefoged, H., Pedersen, A., Zittan, L., 1974. The influence of hygiene in catch handling on the storage life of iced cod and plaice. *International Journal of Food Science & Technology* 9.

Janse, I., Bok, J., Zwart, G., 2004. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 57, 279–281.

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

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

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

Koutsoumanis, K., Nychas, G.J., 1999. Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (Boops boops) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10 degrees C. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 698–706.

Lafarge, V., Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A., 2004. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5644–5650.

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

- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M., 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 111–121.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M., 2001. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology* 90, 578–587.
- Leung, P.S., Engle, C., 2007. Shrimp culture: economics, market, and trade. World Aquaculture Society ed. Blackwell Publishing, Ames.
- Masson, F., Talon, R., Montel, M.C., 1996. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology* 32, 199–207.
- Mejlholm, O., Boknaes, N., Dalgaard, P., 2005. Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology* 99, 66–76.
- Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M.B., Bøknaes, N., Koort, J., Bjørkroth, J., Dalgaard, P., 2008. Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* 124, 250–259.
- Michel, C., Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D.G., Lautraite, A., Tailliez, P., 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2947–2955.
- Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., Orrego, C., 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2676–2680.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127–141.
- Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.Y., Delacroix-Buchet, A., 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5628–5643.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3691–3701.
- Parayre, S., Falentin, H., Madec, M.N., Sivieri, K., Le Dizes, A.S., Sohler, D., Lortal, S., 2007. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiological Methods* 69, 431–441.
- Perez Pulido, R., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Martinez Canamero, M., Galvez, A., 2005. Microbiological study of lactic acid fermentation of *Caper berries* by molecular and culture-dependent methods. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7872–7879.
- Pikuta, E.V., Marsic, D., Bej, A., Tang, J., Krader, P., Hoover, R.B., 2005. *Carnobacterium pleistocenium* sp. nov., a novel psychrotolerant, facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox Tunnel in Alaska. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 473–478.
- Pot, B., Devriese, L.A., Hommez, J., Miry, C., Vandemeulebroecke, K., Kersters, K., Haesebrouck, F., 1994. Characterization and identification of *Vagococcus fluvialis* strains isolated from domestic animals. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 362–369.
- Rachman, C., Fourrier, A., Sy, A., De La Cochetière, M.F., Prevost, H., Dousset, X., 2004. Monitoring of bacterial evolution and molecular identification of lactic acid bacteria in smoked salmon during storage. *Le Lait* 84, 145–154.
- Schmidtke, L.M., Carson, J., 1994. Characteristics of *Vagococcus salmoninarum* isolated from diseased salmonid fish. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 229–236.
- Shewmaker, P.L., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Carvalho Mda, G., Elliott, J.A., Joyce, K., Barrett, T.J., Teixeira, L.M., Facklam, R.R., 2004. *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1505–1510.
- Sivertsvik, M., Rosnes, J.T., Bergslien, H., 1997. Shelf-life of whole cooked shrimp (*Pandalus borealis*) in CO(2) – enriched atmosphere. In: Lutén, J.B., Børresen, T., Oehlenschläger, J. (Eds.), *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality*, vol. 38. Elsevier, Amsterdam, pp. 221–230.
- Stackebrandt, E., Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 152–155.
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., Leroi, F., 2001. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* 34, 797–806.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599.
- Teixeira, L.M., Carvalho, M.G., Merquior, V.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Facklam, R.R., 1997. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2778–2781.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- Truelstrup Hansen, L., Gill, T., Huss, H.H., 1995. Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Research International* 28, 123–130.
- Valdimarsson, G., Einarsson, H., Gudbjornsdottir, B., Magnusson, H., 1998. Microbiological quality of Icelandic cooked-peeled shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* 45, 157–161.
- Van Spreckens, K.J.A., 1974. The suitability of a modification of Long and Hammer's medium for the enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 25, 213–219.
- Vasilopoulos, C., Ravys, F., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1341–1353.
- Vasquez, A., Ahrne, S., Pettersson, B., Molin, G., 2001. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for identification of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Letters in Applied Microbiology* 32, 215–219.
- Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A., Collins, M.D., 1990. 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 224–230.
- Wawer, C., Muyzer, G., 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2203–2210.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703.
- Zapatka, F.A., Bartolomeo, B., 1973. Microbiological evaluation of cold-water shrimp (*Pandalus borealis*). *Applied Microbiology* 25, 858–861.

Chapitre I

Partie 2

**Empreinte moléculaire de la microflore de la crevette cuite par
Chromatographie Liquide Haute Performance en condition dénaturante**

Publication n°2 :

**Molecular fingerprinting of cooked shrimp microbiota by Denaturing High
Performance Liquid Chromatography (DHPLC)**

Jaffrès E., Guilbaud, M., Goldenberg O., Prévost H., Joffraud J.J. and X.Dousset

**En voie de soumission dans la revue
*Food Microbiology***

Introduction

La première partie de ce chapitre, consacré à l'étude de la microflore des crevettes tropicales décortiquées cuites, a permis de mettre en évidence les principaux genres et espèces de bactéries présents au moment de l'altération par une approche polyphasique. Les bactéries lactiques constituaient la population bactérienne majoritaire, dont les principaux genres étaient *Carnobacterium*, *Vagococcus* et *Enterococcus*, suivis du groupe des *Brochothrix thermosphacta* et *Serratia liquefaciens*-like. La technique PCR-TTGE a permis d'une part de confirmer ces résultats, et d'autre part d'apporter des informations complémentaires sur la composition de la microflore des crevettes, avec notamment la mise en évidence des genres *Citrobacter* et d'un *Firmicute* non cultivé. Cependant, la technique reste délicate à mettre en œuvre, elle peut s'avérer coûteuse en temps, notamment en temps de migration électrophorétique en condition dénaturante par application d'un gradient de température. A titre d'exemple, le temps de migration appliqué au cours de la précédente étude était d'environ 13 heures. En outre, la PCR-TTGE présente certaines limites comme le phénomène de co-migration, qui peut être la cause d'une sous-estimation de la présence de certains genres et espèces au sein d'un écosystème.

Une nouvelle technique d'empreinte moléculaire à haut débit d'analyse, appelée la Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC), est apparue au milieu des années 1990. Cette technique permet la séparation d'ADN double brin en mettant en œuvre un principe de chromatographie en phase inverse et en condition dénaturante. Cette méthode a été initialement mise au point pour étudier le polymorphisme de l'ADN génomique des cellules eucaryotes (Frueh et Noyer-Weidner, 2003), et a ensuite démontré son intérêt pour analyser les communautés bactériennes issues de divers écosystèmes (Barlaan *et al.*, 2005 ; Goldenberg *et al.*, 2007 ; Ercolini *et al.*, 2008). La DHPLC présente plusieurs avantages comparativement aux techniques électrophorétiques (TTGE, DGGE, etc.), notamment par sa rapidité de séparation et d'analyse qui dure environ 30 minutes. Elle offre également un gain de temps au niveau de la prise en charge des échantillons, car elle est équipée d'un injecteur automatique. Enfin, elle permet de collecter les pics chromatographiques après séparation, dans des fractions qui peuvent être réutilisées pour séquencer les fragments d'ADN correspondants.

L'objectif de cette étude était de mettre en œuvre la technique DHPLC, appliquée à l'étude des communautés bactériennes présentes dans l'écosystème des crevettes décortiquées

cuites. Dans ce but, nous avons utilisé les échantillons d'ADN bactérien correspondant au lot A de la précédente étude, directement extraits des crevettes au cours du stockage à 5 et 15 °C, et déjà caractérisés par la PCR-TTGE. L'amplification de la région V3 du gène codant l'ARNr 16S a été réalisée, puis les amplicons générés ont été injectés dans la colonne de la DHPLC. Ceci nous a ensuite permis de pouvoir comparer les chromatogrammes obtenus par la DHPLC pour différents jours du stockage, avec les profils des gels TTGE correspondants.

Principaux résultats et discussion

La DHPLC a été utilisée pour suivre l'évolution des communautés bactériennes dans les crevettes cuites (lot A de la précédente étude), au cours de leur stockage à 5 et 15 °C, au moyen des profils des pics générés sur les chromatogrammes. Ces pics ont été collectés, clonés puis séquencés pour les jours 22 et 33 correspondant à l'altération des crevettes stockées à 15 °C et 5 °C, respectivement. Le but était d'identifier les principaux genres et espèces bactériens présents dans la microflore d'altération des crevettes. La figure 16 présente les chromatogrammes obtenus pour les jours 1, 15 et 33 du stockage à 5 °C, ainsi que les profils TTGE correspondants. Les profils des pics DHPLC présentent une faible diversité bactérienne au début du stockage (figure 16a), avec un seul pic détecté. A partir du jour 15 (figure 16b), un second pic apparaît et finalement au 33^{ème} jour de stockage, 4 pics sont détectés (figure 16c). Par comparaison avec les profils de migration obtenus par TTGE, des analogies sont observées. En effet, une seule bande d'intensité majeure est visible au 1^{er} jour de stockage. Ensuite, plusieurs bandes apparaissent au 15^{ème} jour, et finalement 4 bandes d'intensité majeure sont détectées au 33^{ème} jour. Pour le stockage à 15 °C (figure 17), les profils de pics révèlent une plus grande diversité microbienne dès le début du stockage (figure 17a), avec 4 pics détectés. Ensuite, le nombre de pics augmente encore à partir du 15^{ème} jour (figure 17b) pour atteindre le nombre de 7 à la fin du stockage (figure 17c). Les profils TTGE correspondant présentent également une diversité microbienne, avec 4 bandes visibles au premier jour de stockage. Ensuite, la diversité est encore plus importante puisqu'on observe environ 6 bandes au 15^{ème} et 22^{ème} jour de stockage.

Le clonage et le séquençage des pics obtenus pour les jours 33 et 22, à 5 et 15 °C respectivement, a permis d'identifier les principales bactéries composant l'écosystème microbien des crevettes au moment de l'altération. Le traitement des séquences par analyse BLAST sur NCBI, a permis d'identifier les genres *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Citrobacter* et *Pseudomonas*. Plusieurs séquences correspondaient précisément aux espèces *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Enterococcus faecalis* et *Vagococcus carniphilus*.

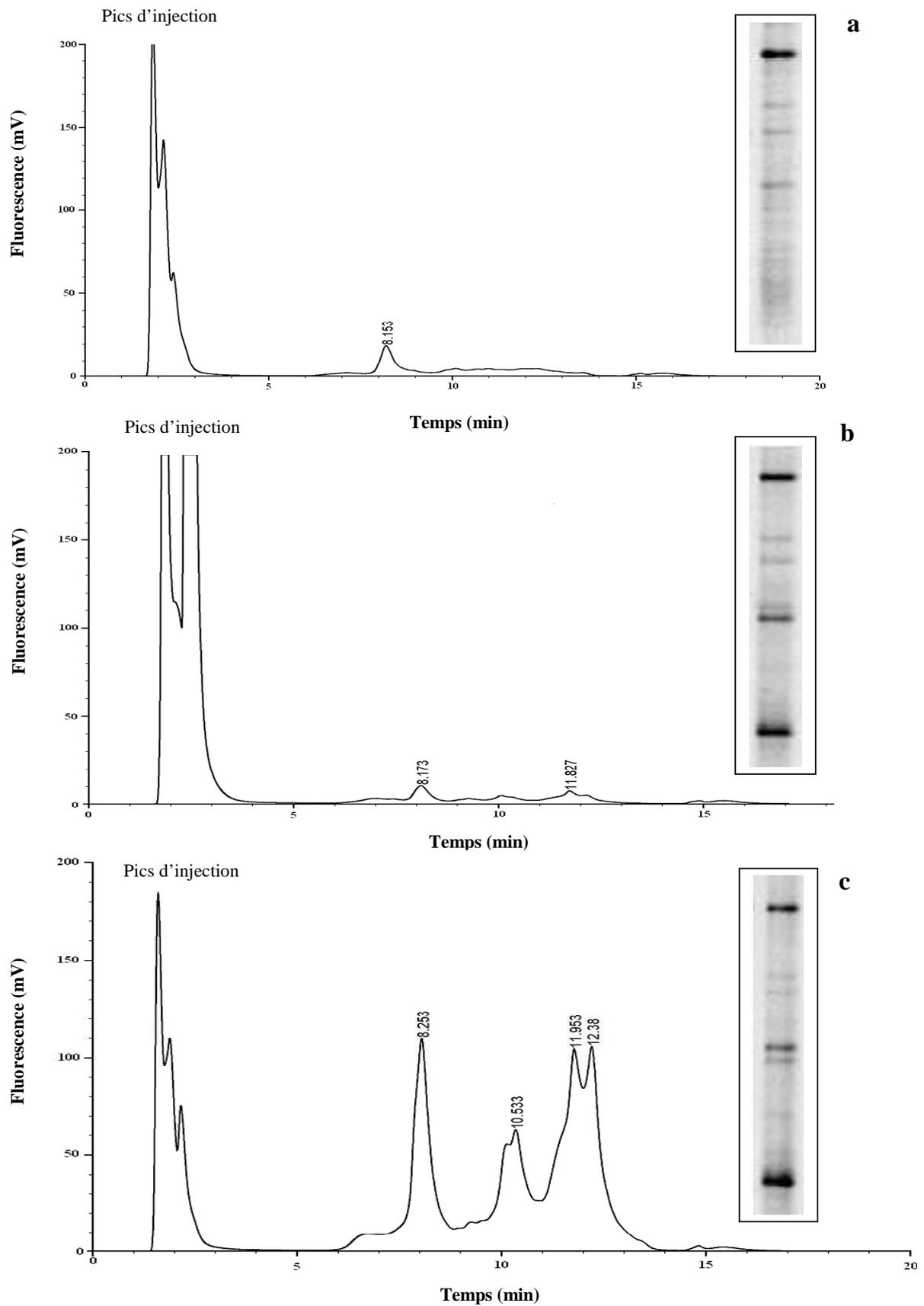


Figure 16 : Chromatogrammes du suivi des communautés bactériennes dans le lot A stocké à 5 °C par la DHPLC, aux jours de stockage 1 (a), 15 (b) et 33 (c)

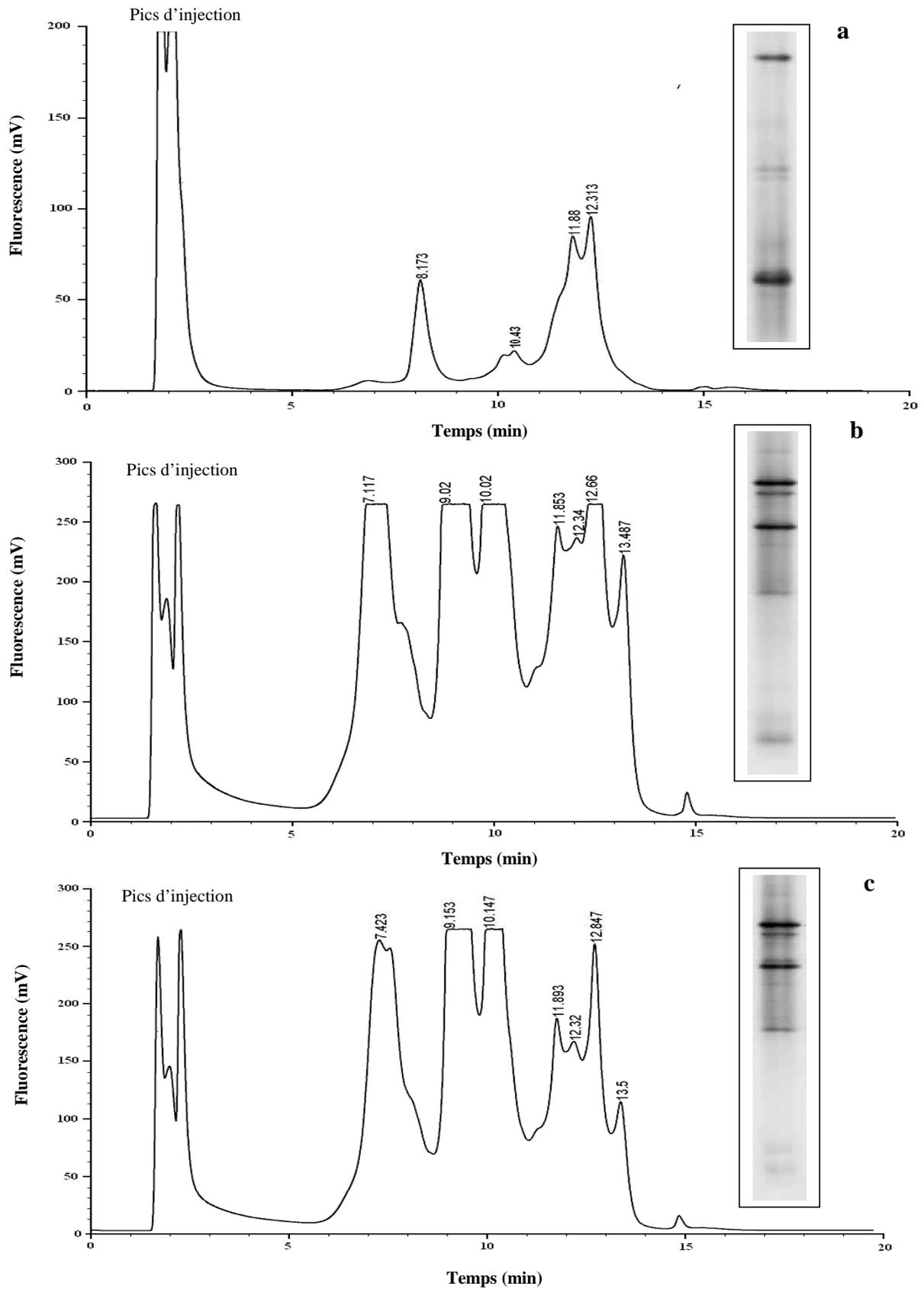


Figure 17 : Chromatogrammes du suivi des communautés bactériennes dans le lot A stocké à 15 °C par la DHPLC, aux jours de stockage 4 (a), 15 (b) et 22 (c)

Le séquençage des pics a permis également de mettre en évidence des différences dans la composition des communautés bactériennes en fonction de la température de stockage. En effet, pour le stockage à 5 °C au 33^{ème} jour de stockage, la microflore est constituée de l'espèce *Brochothrix thermosphacta* et également de plusieurs bactéries non cultivées (uncultured bacteria) ou *Firmicutes*. Pour le stockage à 15 °C au 22^{ème} jour, la microflore est constituée de bactéries lactiques appartenant aux genres *Vagococcus* (*Vc. carniphilus* et *Vagococcus* sp.), *Carnobacterium* (*Cb. maltaromaticum*) et *Enterococcus* (*Enterococcus* sp.). Le genre *Citrobacter* est également identifié dont l'espèce *Ct. gilleni/freundii* ainsi que d'autres entérobactéries et *Brochothrix thermosphacta*. L'ensemble des identifications bactériennes obtenues par séquençage des pics DHPLC est donc relativement en accord avec celles obtenues précédemment par TTGE.

Néanmoins, quelques limites ont pu être également observées au cours de cette étude. En effet, nous avons constaté que certaines espèces étaient identifiées sur plusieurs pics élués à des temps de rétention différents. C'était le cas notamment de *Brochothrix thermosphacta* qui était identifiée majoritairement sur deux pics distincts. Des résultats analogues ont pu être mis en évidence au cours de travaux antérieurs réalisés sur d'autres écosystèmes (Goldenberg *et al.*, 2005 ; Ercolini *et al.*, 2008). Ce phénomène serait en partie attribué à la présence de plusieurs copies de l'opéron ribosomique, donc du gène codant l'ARNr 16S, dans le génome de certaines espèces bactériennes. Ce phénomène était par ailleurs observable également en TTGE où *Bt. thermosphacta* génèrait plusieurs bandes lors de la migration. La solution pour s'affranchir de ce phénomène serait de cibler un gène existant en copie unique dans le génome des bactéries comme le gène *rpoB* (Dahllof *et al.*, 2000 ; Case *et al.*, 2007).

Toutefois, malgré ces limites, la DHPLC s'est révélée être une technique relativement prometteuse pour étudier les communautés microbiennes d'un écosystème complexe comme la crevette décortiquée cuite. Elle a fourni des résultats analogues à ceux qui avaient été obtenus par TTGE dans la précédente étude, mais avec un temps d'analyse environ 60 fois plus rapide que la TTGE. En outre, la DHPLC a permis de mettre en évidence des espèces du genre *Vagococcus* qui n'avaient pas pu être identifiées par la TTGE.

L'ensemble de cette étude fait l'objet d'un projet d'article qui est en voie de soumission dans la revue *Food Microbiology*, et qui est présenté dans les pages suivantes.

Molecular fingerprinting of cooked shrimp microbiota by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC).

Jaffrès, E^{1-2§}, Guilbaud, M^{1§}, Goldenberg, O³, Prévost, H¹, Joffraud, J.J², and Dousset, X^{*-1}

¹ UMR INRA 1014 SECALIM ENVN/ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France.

² Département Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes, Cedex 3, France.

³ Transgenomic Limited, 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, United Kingdom.

§ Both authors contributed equally to this work

* Corresponding author. Tel.: ++33 251 785 525 ; fax: ++ 33 251 785 520.

E-mail address: dousset@enitaa-nantes.fr

ABSTRACT

Seafood products are very sensitive from a microbiological point of view. Their possible contamination by bacteria during the manufacturing process could result in spoilage and reduction of shelf life. In this study, we describe a recent culture-independent method to monitor shrimps products microbiota by using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). This technique enabled the separation of amplified DNA fragments (V3 region of the 16S rRNA gene) from a bacterial DNA directly extracted from shrimp samples stored at 5 and 15°C for 33 and 22 days, respectively. The evolution of bacterial diversity in the shrimp samples during storage was evaluated by DHPLC peak profiles. Fractions collected and sequenced at the end of the storage revealed the presence of *Brochothrix thermosphacta*, some uncultured bacteria and *Firmicute* species for the storage at 5°C. For the samples stored at 15°C, lactic acid bacteria belonging to the *Vagococcus*, *Carnobacterium* and *Enterococcus* genera and also *Enterobacteriaceae* and *Brochothrix thermosphacta* species were found. All of these results are in accordance with those obtained by the PCR-TTGE technique on the same samples. This study confirms that DHPLC is at least as effective as TTGE for monitoring bacterial diversity in a complex food-related ecosystem such as shrimps and that DHPLC is a powerful technique to characterize a food ecosystem rapidly.

Keywords: Cooked shrimp, microbiota, DHPLC, TTGE, 16S rRNA.

INTRODUCTION

Monitoring the microbiota of seafood products is essential because they are generally highly perishable and their shelf life and sensory characteristics depend on the development of microbial communities (Huss *et al.*, 2000). The knowledge of microbial diversity in food ecosystems has significantly increased in the past few years, notably by the use of molecular methods. Non-cultural genetic fingerprinting techniques, such as single strand conformation polymorphism (SSCP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE), have contributed to fill the gap of microorganisms that were not accessible by cultural methods (Amann *et al.*, 1995; Giraffa and Neviani, 2001). SSCP has been applied to characterize food microbial ecosystems such as French Salers cheese (Duthoit *et al.*, 2005; Duthoit *et al.*, 2003) or for the identification of Gram-negative histamine-producing bacteria isolated from fish (Takahashi *et al.*, 2003). DGGE has been applied to study the diversity, dynamics and activity of bacterial communities in several food products (Ercolini, 2004) such as Mozzarella (Coppola *et al.*, 2001; Ercolini *et al.*, 2003; Ercolini *et al.*, 2001) or in malt whisky fermentation (van Beek and Priest, 2002). TTGE has been used to study the microflora of dairy products (El-Baradei *et al.*, 2007; Lafarge *et al.*, 2004; Ogier *et al.*, 2004; Ogier *et al.*, 2002; Parayre *et al.*, 2007) or seafood products, especially cold-smoked salmon (Giacomazzi *et al.*, 2004; Rachman *et al.*, 2004) or cooked shrimps (Jaffres *et al.*, 2008).

In the last decade, a novel high-throughput technique based on a chromatographic principle has been developed for screening variations in genomic DNA. This technique, called denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), was described for the first time by Underhill *et al.* (1996). DHPLC enables the detection of heteroduplexes in PCR products by ion pair reverse phase high performance liquid chromatography on alkylated non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles under partially denaturing conditions. The first applications of this technique consisted in detecting mutations of human DNA (Huber *et al.*, 2001; O'Donovan *et al.*, 1998; Underhill *et al.*, 1997). In addition, the DHPLC technique proved effective in characterizing the microflora of various ecosystems, such as the human intestinal tract (Goldenberg *et al.*, 2005; Goldenberg *et al.*, 2007), urinary tract infections (Domann *et al.*, 2003) and seawater samples (Barlaan *et al.*, 2005) or in improving the taxonomy of several bacterial groups such as the *Bacillus cereus* group (Hurtle *et al.*, 2003) and *Yersinia pestis* (Achtman *et al.*, 2004) and for the molecular analysis of antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (Shi *et al.*, 2006) and *Salmonella enterica* (Eaves *et*

al., 2002). DHPLC has been used more recently in parasitology to detect protist parasites of metazoans, particularly in the crustacean blue crab (Troedsson *et al.*, 2008a; Troedsson *et al.*, 2008b). Lately, this technique has also been employed to profile the microbial diversity in food-related mixed microbial communities, such as natural whey cultures for cheese production, compared to the more traditional PCR-DGGE technique (Ercolini *et al.*, 2008). This study showed that both techniques yielded similar results concerning the microbial diversity in whey ecosystems. Nevertheless, the advantage of DHPLC was its rapidity, notably due to the automatic injection of samples to be analyzed. It also avoided time-consuming in polyacrylamide gel preparation and electrophoresis runs.

The purpose of this study was to apply DHPLC on the WAVE[®] Microbial Analysis System (Transgenomic Ltd., Omaha, NE, USA) in order to characterize and monitor changes in the microbial ecosystem of cooked shrimps by separating amplified 16S rRNA fragments covering the variable region three (V3). We were further interested in comparing DHPLC and PCR-TTGE for monitoring microbial diversity in cooked shrimps. Indeed, the shrimp samples used in this work had already been described in a recent study using a polyphasic approach that employed both culture-dependent and -independent methods, including the PCR-TTGE technique, on the V3 region of the 16S rRNA gene (Jaffres *et al.*, 2008).

MATERIAL AND METHODS

Reference bacterial strains

The bacterial strains used in this study, including 7 different representative Gram-positive and Gram-negative bacterial species of seafood product microbiota under modified atmosphere packaging (MAP), selected as references, are listed in Table 1. *Lactobacillus curvatus* and *Carnobacterium strains* were grown at 30°C in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium (Biokar, Beauvais, France). The brain heart infusion (BHI) medium (Biokar) was used to cultivate *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* (20°C), *Brochothrix thermosphacta* (25°C) and *Enterococcus faecalis* (30°C).

Table 1: Bacterial reference strains used for this study.

Species	Type strain ^a
<i>Carnobacterium divergens</i>	CIP 101029
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	CIP 103135
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CIP 69.13
<i>Shewanella putrefaciens</i>	CIP 69.29
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 103015
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	DSM 20171
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSM 20019

^aAbbreviations: CIP; Collection Institut Pasteur, Paris, France; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany.

Shrimp sampling

A batch of tropical, cooked, peeled, brined and drained MAP shrimps (*Penaeus vannamei*, farming production, South America) from a French production plant was studied. Half of the samples were stored at 5°C and the other half at 15°C for 33 and 22 days, respectively. Several direct bacterial DNA extractions from the shrimp matrix were carried out at days 1, 15 and 33 for the samples stored at 5°C and at days 4, 15 and 22 for those stored at 15°C.

DNA extraction from reference bacterial strains

Two ml samples of an overnight pure culture were centrifuged at 5000 g for 10 min. The supernatant was removed and the pellet was resuspended in 180 µl of enzymatic lysis solution (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM sodium EDTA, 1.2% Triton X-100, 20 mg/ml lysozyme) and incubated at 37°C for 1 h. Proteins were digested by proteinase K (20 mg/ml) with 200 µl of AL buffer (DNeasy blood and tissue kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) and incubated at 56°C for 30 min. Nucleic acid precipitation was performed by addition of 200 µl of ice-cold absolute ethanol. DNA purification was carried out using the Qiagen DNeasy blood and tissue kit.

Direct bacterial DNA extraction from shrimp matrix

Bacterial DNA was directly extracted from each shrimp sample as previously described (Jaffres *et al.*, 2008), with both enzymatic and mechanical lysis steps. DNA purification was carried out using the Qiagen DNeasy blood and tissue kit.

PCR amplification

The 16S rRNA gene V3 region (194 bp) was amplified by performing two successive PCRs using the primers V3P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') and V3P3-GC-Clamp (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGCCTACGGGAGGCA GCAG-3') (Parayre *et al.*, 2007). The PCR mixture contained as final concentrations: 800 µmol/l of deoxynucleotide triphosphate mix (Interchim, Montluçon, France), 1x Taq buffer containing (10 mmol/l Tris-HCl [pH 9.0], 50 mmol/l KCl, 1.5 mmol/l MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.2 mg/ml BSA), 2.5 U of Taq DNA polymerase (MP Biomedicals, Strasbourg, France), 1 µmol/l of each primer, and 10 µl or 1 µl of template DNA for the extracts from the shrimp matrix or from bacterial reference strains, respectively. PCR amplification was performed in a PTC-100 Thermocycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) using the following protocol: initial denaturation (94°C for 5 min), followed by 25 cycles of denaturation (94°C for 30 s), primer annealing (62°C for 30 s) and extension (72°C for 1 min). A final extension at 72°C for 5 min was performed. The second PCR, also called “reconditioning PCR”, was carried out to reduce the number of heteroduplex molecules and artifacts in the amplified fragments formed during the first PCR, as previously described (Goldenberg *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2002). Accordingly, 10 µl or 1 µl for the shrimp matrix or from bacterial reference strains, respectively, was re-amplified in the same conditions as described above, for 5 cycles. The size (234 bp with GC-clamp) of the V3-PCR products was determined in a 1.5% (w/v) agarose gel (MP Biomedicals).

Separation of amplified V3 16S rRNA fragments by DHPLC

The V3-PCR products were separated by DHPLC on a DNASep® HT cartridge (Transgenomic). Optimal separation was achieved using a specifically developed gradient (Table 2) at an oven temperature of 62.2°C and a flow rate of 0.35 ml/min. The gradient was formed by Buffer A (Transgenomic) consisting of an aqueous solution of 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), pH 7,0 ; and Buffer B (Transgenomic) consisting of an aqueous solution of 0.1 M TEAA, pH 7,0, with 25% acetonitrile (v/v). Separated PCR products were detected and visualized either by a UV detector or by an HSX-3500

fluorescence detector using instrument-internal staining with optimized HS staining solution I (Transgenomic). The analysis was accomplished using the Navigator™ software version 1.5.4 (Transgenomic).

Table 2: Gradient conditions for the separation of amplified 16S rRNA V3 fragments by DHPLC on the WAVE system

Gradient	Time (min)	Buffer A (%)	Buffer B (%)
Loading	0	52	48
Start gradient	0.1	45	55
Stop gradient	10.1	39	61
Start clean	11.2	0	100
Stop clean	12.2	0	100
Start equilibrate	11.3	50	50
Stop equilibrate	11.8	50	50

Collection and sequence analysis of separated V3 16S rRNA gene fragments

Distinct fractions corresponding to different separated peaks in the elution profiles were collected at days 33 (5°C) and 22 (15°C) with the DNA fragment collector FCW 200 (Transgenomic). The volume of each fraction varied from 100 to 200 µl depending upon peak size and height. Each fraction was used as a template for re-amplification for 25 cycles in the same conditions as described above, then purified with the MinElute PCR purification Kit (Qiagen) and finally cloned in the pCR®4-TOPO® vector, which was then transformed into chemically competent *Escherichia coli* DH5α, using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Approximately four clones were selected for each collected fraction and then plasmid DNA extraction from these clones was performed using a miniprep kit (Qiaprep, Qiagen). The cloned inserts were sequenced on both strands (Genome Express Company, Meylan, France). Sequences were assembled into a unique contig with BioEdit sequence alignment software (Hall, 1999). The contig sequence was then submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The computer program CLUSTAL W (Thompson *et al.*,

1994) was used for sequence alignment, and the BLAST 2 program (Altschul *et al.*, 1997) for representation of sequence and similarity searches in the GenBank database.

Data analysis

In order to evaluate the quality of the DHPLC peak profiles, we used for comparison the TTGE band profiles from the previous study (Jaffres *et al.*, 2008), corresponding to days 1, 15 and 33 for the shrimp storage at 5°C and days 4, 15 and 22 for the samples stored at 15°C.

Results

DHPLC analysis of bacterial reference species

To evaluate the ability of DHPLC to monitor changes within a seafood microbial ecosystem such as cooked shrimps, we analyzed the V3 region amplicons from the 7 bacterial reference strains representing the main bacterial species encountered in MAP seafood products.

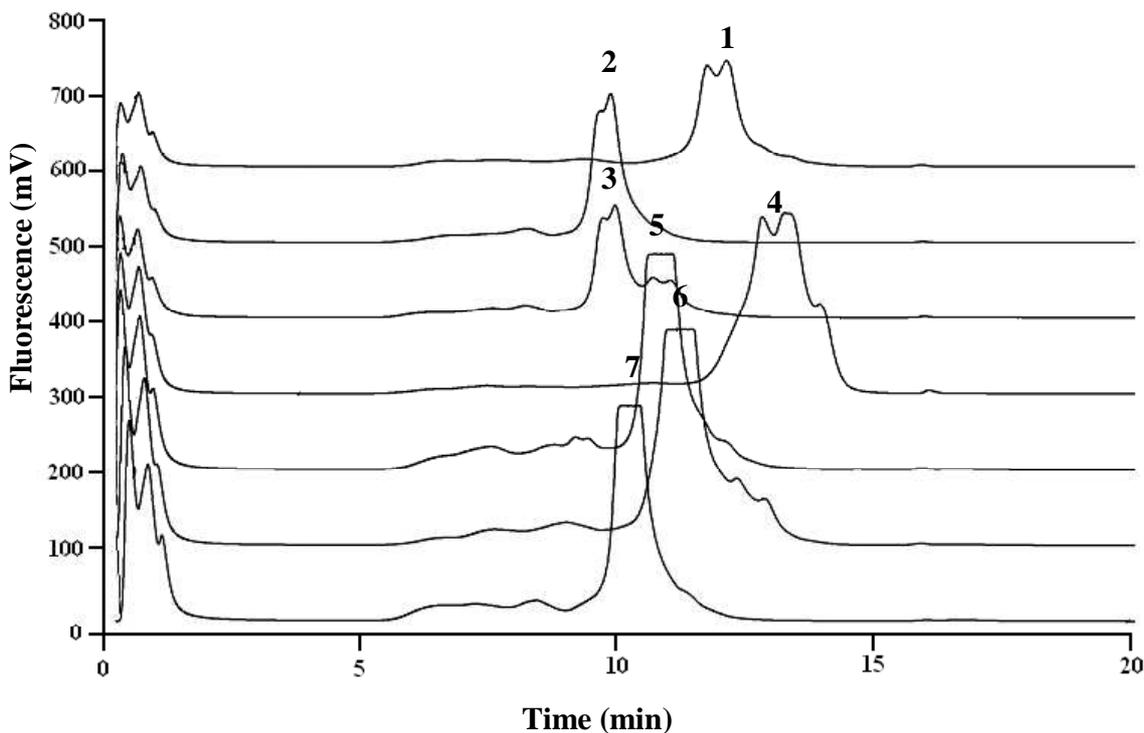


Figure 1. DHPLC peak profiles obtained by analysis of V3 region amplicons from the 16S rDNA gene of seven bacterial reference strains, detected and visualized by fluorescence detector. 1, *Carnobacterium divergens* (NCDO 2763T); 2, *Carnobacterium maltaromaticum* (NCDO 2762T); 3, *Pseudomonas fluorescens* (CIP 69.13T); 4, *Shewanella putrefaciens* (CIP 6929T); 5, *Enterococcus faecalis* (CIP 103015T); 6, *Brochothrix thermosphacta* (DSM 20171T); 7, *Lactobacillus curvatus* (DSM 20019T).

Table 3: Retention times of V3 amplicons from bacterial reference strains obtained by DHPLC analysis under optimized conditions

Peak profiles	Reference strain	Retention time (min)
2	<i>Cb. maltaromaticum</i>	9,81
3	<i>Pm. fluorescens</i>	9,85
7	<i>Lb. curvatus</i>	10,14
5	<i>Ec. faecalis</i>	10,73
6	<i>Bt. thermosphacta</i>	11,05
1	<i>Cb. divergens</i>	11,80
4	<i>Sw. putrefaciens</i>	12,57

The resulting DHPLC peak profiles revealed that, although the peaks were grouped in a short elution period around 2.76 min, the conditions employed (acetonitrile gradient, column temperature, flow rate and fluorescence detector) were suitable for separating the bacterial communities in shrimp microbiota. In fact, each bacterial species exhibited a distinct profile consisting of a unique peak and was separated according to its characteristic retention time, ranging from 9.81 to 12.57 min (Fig. 1, Table 3). Only two species, *Cb. maltaromaticum* and *Pm. fluorescens*, displayed a close retention time of approximately 9.80 min.

DHPLC for monitoring the shrimp microbiota

DHPLC was used to monitor changes in bacterial communities in cooked and peeled shrimps during storage at 5 and 15°C by using the optimal conditions described above. For the storage at 5°C (Fig 2A), the DHPLC peak profiles showed a poor bacterial diversity at the start of storage with notably only one peak eluted at 8.17 min showing a weak intensity at day 1. From day 15, a second peak appeared at 11.82 min and finally, at day 33, approximately four peaks were eluted at 8.25, 10.53, 11.95 and 12.38 min. By comparison with TTGE profiles, we observed some analogies in the results, particularly only one major band being distinguishable at day 1. Then several bands appeared in the profiles to reach approximately 4 bands.

Fig. 2A.

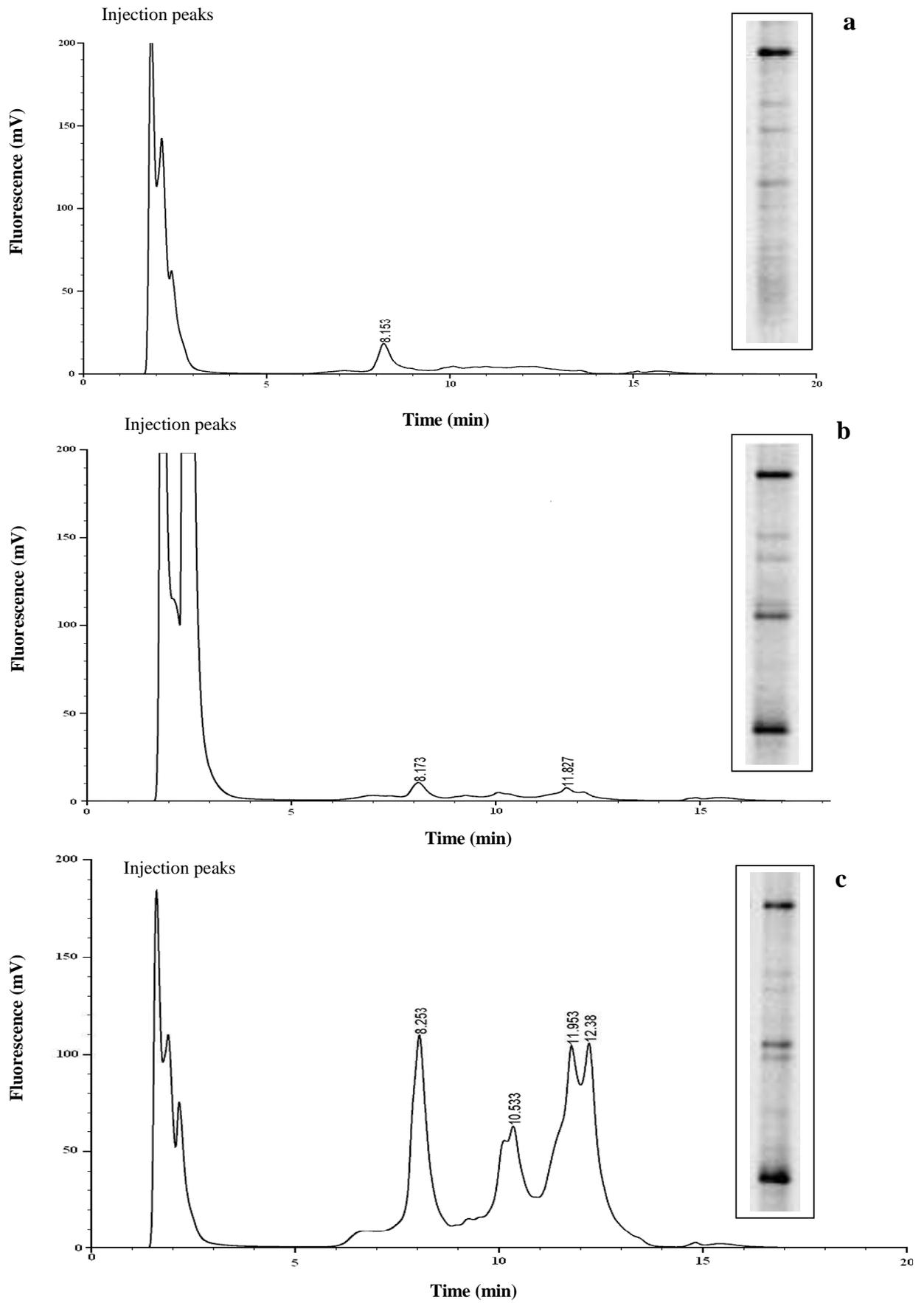


Fig. 2B.

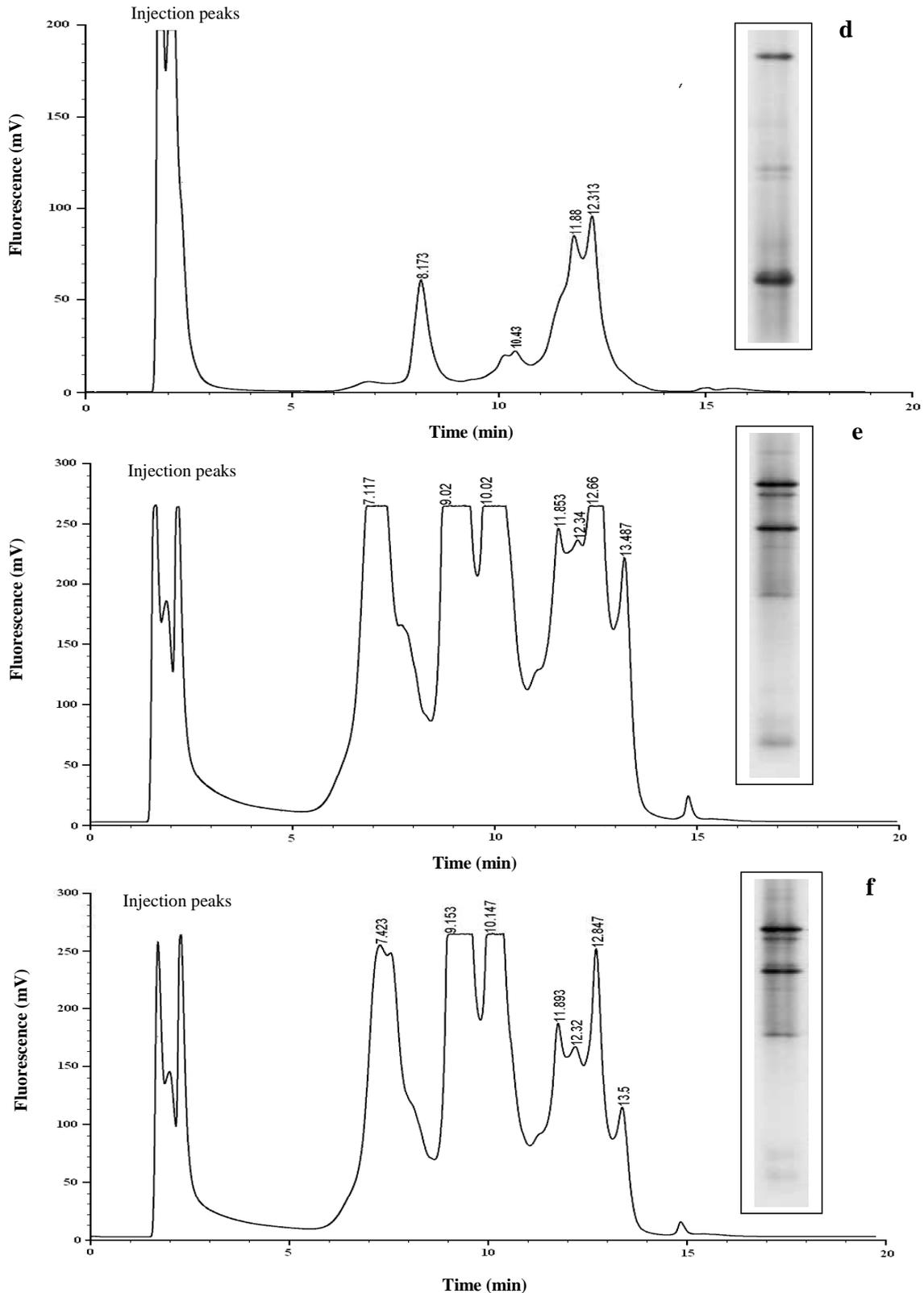


Figure 2. Monitoring of shrimp microbiota by DHPLC during storage at low and high temperatures. Peak profiles of V3 regions obtained from shrimps stored at 5°C (Fig. 2A) and 15°C (Fig. 2B). Days of sampling: a, b, c for days 1, 15 and 33 respectively, and d, e, f for days 4, 15 and 22, respectively. The corresponding V3 region TTGE profile of each bacterial DNA extract is also shown. These profiles come from the previous study (Jaffrès *et al.*, 2008).

For the samples stored at 15°C (Fig 2B), the peak profiles revealed a larger microbial diversity as compared to the storage at 5°C. Interestingly, at day 4 (15°C) we observed a similar peak profile, with regard to the retention times, to that found at the end of storage at day 33 (5°C), composed by 4 intense peaks eluted at 8.17, 10.43, 11.88 and 12.31 min. After 15 days, the microbial diversity increased noticeably. Samples showed 7 peaks, which appeared and stayed constant until the end of the storage (22 days). Only two peaks remained during the whole storage period (eluted around 11.90 and 12.30 min). In parallel, TTGE band profiles exhibited a similar diversity, particularly at day 4 (15°C), also identical to that of day 33 (5°C), with the same four bands. At day 15, the changes in microbial communities were also obvious in the TTGE gels with approximately 6 bands distinguishable, showing different migration distances compared to day 4. To identify the bacterial species responsible for the microbial diversity of the shrimp matrix at the end of storage for both temperatures, the separated peaks of the corresponding DHPLC profiles were collected into distinct fractions. These fractions, containing the V3 region of the 16S rRNA genes, were sequenced after re-amplification and cloning. A total of 13 peaks with different retention times was collected and 4 individual clones for each fraction were sequenced (Fig. 3). Peaks 1 to 5 corresponded to day 33 for storage at 5°C (Fig. 3A). Peaks 6 to 13 corresponded to day 22 for storage at 15°C (Fig. 3B), with for the latter a visualization of the profile by UV detection due to a saturation of the fluorescence signal, which prevented this sample from being discriminated into distinct peaks. The result of the sequence analysis for each clone is presented in Table 4. The identified bacterial genera were *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Citrobacter* and *Pseudomonas*. Some sequences corresponded to the bacterial species *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Enterococcus faecalis* and *Vagococcus carniphilus*. Interestingly, some clones carried sequences assigned to the *Enterobacteriaceae* family. Finally, several sequences belonged to uncultured bacteria and uncultured *Firmicute*. The sequencing of peaks indicated differences in the bacterial communities according to the storage temperature. For example, at day 33 (5°C) the microbiota mainly consisted of *Brochothrix thermosphacta* and also some uncultured bacteria or *Firmicute*. At day 22 (15°C), however, we found some lactic acid bacteria belonging to the *Vagococcus*, *Carnobacterium* and *Enterococcus* genera and also *Enterobacteriaceae* and *Brochothrix thermosphacta*.

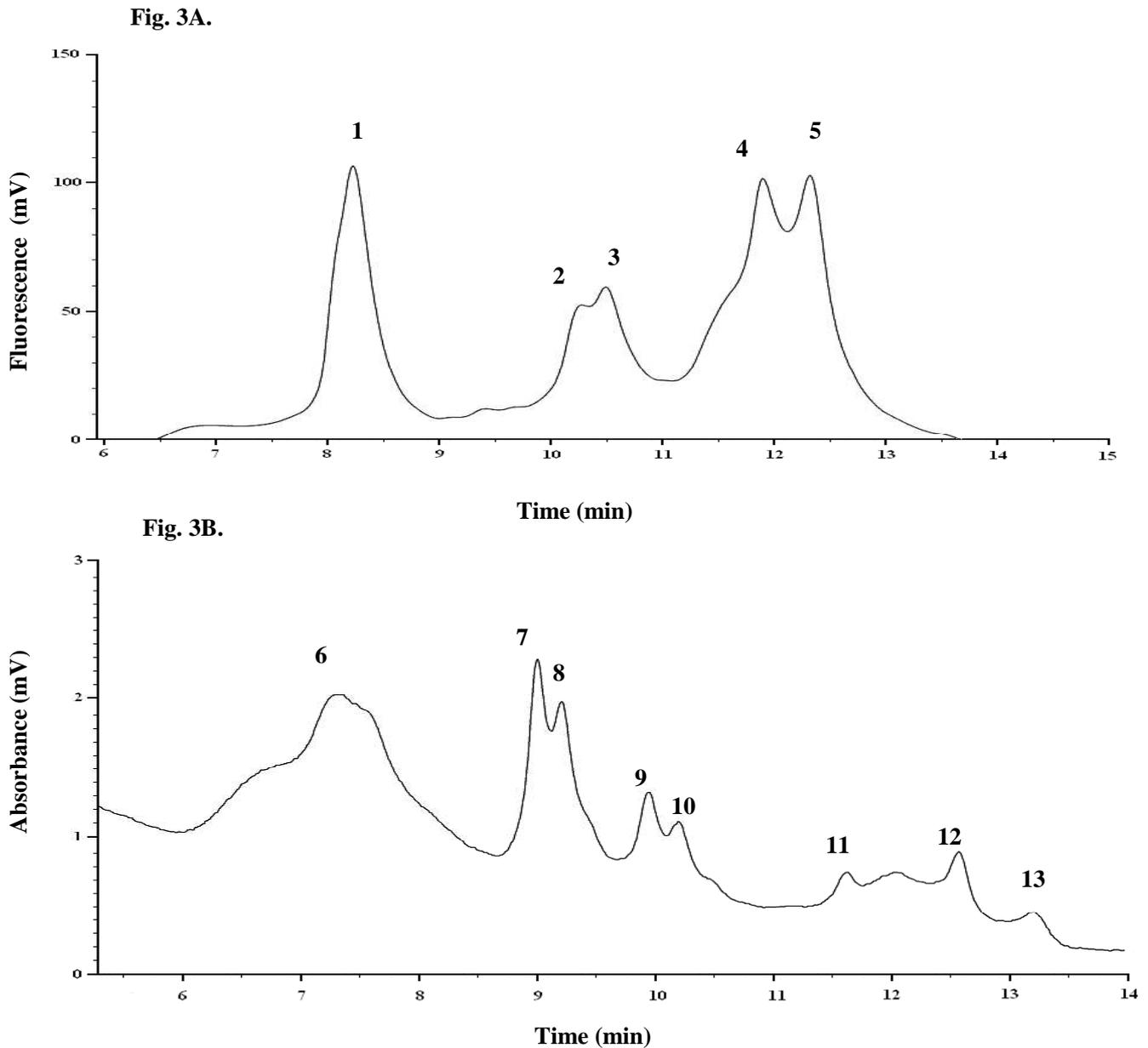


Figure 3. Collecting DHPLC fractions for bacterial species identification by sequencing the V3 region of the 16S rDNA gene. Amplicons eluted at different retention times are represented by individual peaks. Collected V3 fractions are marked by numbers. The sample used for bacterial identification corresponded to day 33 for storage at 5°C with fluorescence detection (A), and to day 22 for storage at 15°C with UV detection (B).

Table 4: Identification of bacteria in collected fractions by cloning and sequencing of V3 fragments.

Sample storage	Peak	Clone	nt	% identity (Blast/NCBI)	Significant alignment (Blastn/NCBI)	GenBank accession no.
A 5°C	1	1	194	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		2	193	98	Uncultured <i>Firmicute</i> clone P2-1-13	AF434138
		3	194	100	<i>Carnobacterium</i> sp LIV10	DQ778093
		4	193	97	Uncultured <i>Firmicute</i> clone P2-1-13	AF434138
	2	1	194	99	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		2	194	99	<i>Pseudomonas</i> sp. MY1106	EU082808
		3	189	94	Uncultured bacterium clone SS1 B04 12	EU050899
		4	194	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
	3	1	189	93	Uncultured bacterium clone N67e 105	EF646138
		2	194	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		3	169	97	Uncultured bacterium clone F2B	DQ860037
		4	189	93	Uncultured bacterium clone N67e 105	EF646138
	4	1	171	95	<i>Halomicronema</i> sp. M5C7	EU024375
		2	194	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		3	194	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		4	194	98	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
	5	1	194	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		2	194	99	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		3	194	98	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		4	194	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
B 15°C	6	1	194	100	<i>Enterococcus</i> sp. MMZ60G	EU157915
		2	194	100	<i>Vagococcus</i> sp. JIP 18-02	AM490372
		3	194	100	<i>Enterococcus</i> sp. MMZ60G	EU157915
		4	194	100	<i>Vagococcus carniphilus</i>	AY179329
	7	1	194	100	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NRIC 0113	AB326602
		2	194	98	<i>Vagococcus</i> sp. JIP 18-02	AM490372
		3	194	96	<i>Carnobacterium</i> sp LIV10	DQ778093
		4	194	99	<i>Enterobacteriaceae</i> sp. KB2CB-1B	EU073808
	8	1	194	100	<i>Citrobacter gillenii/freundii</i>	EF017944/ AJ852071
		2	194	100	<i>Vagococcus</i> sp. JIP 18-02	AM490372
		3	194	99	<i>Enterococcus</i> sp. MMZ60G	EU157915
		4	194	98	<i>Enterococcus</i> sp. MMZ60G	EU157915
	9	1	194	98	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strain CECT	AJ564738
		2	194	99	<i>Vagococcus carniphilus</i>	AY179329
		3	194	99	<i>Enterococcus</i> sp. MMZ60G	EU157915
		4	194	100	<i>Enterobacteriaceae</i> sp. KB2CB-1B	EU073808

Table 4 (continued)

Sample storage	Peak	Clone	nt	% identity (Blast/NCBI)	Significant alignment (Blastn/NCBI)	GenBank accession no.
B 15°C	10	1	194	99	<i>Vagococcus</i> sp. JIP 18-02	AM490372
		2	194	100	<i>Vagococcus</i> sp. JIP 18-02	AM490372
		3	194	100	<i>Vagococcus</i> sp. JIP 18-02	AM490372
		4	194	100	<i>Carnobacterium</i> sp LIV10	DQ778093
	11	1	194	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		2	194	98	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		4	194	99	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024
		3	194	100	<i>Citrobacter gillenii/freundii</i>	EF017944/ AJ852071
	12	1	194	100	<i>Enterobacteriaceae</i> sp. KB2CB-1B	EU073808
		2	194	100	<i>Enterobacteriaceae</i> sp. KB2CB-1B	EU073808
		3	194	100	<i>Enterobacteriaceae</i> sp. KB2CB-1B	EU073808
		4	194	98	<i>Enterobacteriaceae</i> sp. KB2CB-1B	EU073808
	13	direct	194	98	<i>Enterobacteriaceae</i> sp. KB2CB-1B	EU073808

DISCUSSION

The main interest in molecular fingerprinting methods to study a microbial food ecosystem is to avoid culturing bacteria, which can be time-consuming, and to deliver quick results about the microbiota composition (Giraffa and Neviani, 2001). In the field of seafood microbiology, this is highly important particularly for lightly preserved seafood products because, even after heat treatment, they can undergo recontamination by either spoilage bacteria or more seriously pathogenic bacteria during the production process (Valdimarsson *et al.*, 1998; Zapatka and Bartolomeo, 1973). In this study, DHPLC was used to monitor changes in microbial communities of cooked shrimps microbiota during storage at low and high temperatures. First, the discrimination of reference bacterial strains by separated peaks with distinct retention times showed the possibility of extending this technique for the characterization of complex food-related ecosystems. However, for both species *Cb. maltaromaticum* and *Pm. fluorescens*, presenting similar retention times, the DNA V3 region sequencing indicated a poor sequence similarity of approximately 72%, but relatively close melting temperatures (T_m) of 72.92 and 72.80°C, respectively. This co-eluting phenomenon is equivalent to the co-migration observed sometimes in TTGE or DGGE (Murray *et al.*, 1996; Ogier *et al.*, 2002). Thus, the T_m value is sometimes more appropriate for predicting

elution time than the nucleotide sequences between two DNA fragments exhibiting similar length but different nucleotide sequences. Indeed, the T_m value depends on the GC domains of sequences (Lerman and Silverstein, 1987) which are involved in DNA fragment elution through the DHPLC column. Another variable region of the 16S rRNA gene could therefore be more suitable for discriminating between the two species. Conversely, multiple peaks from single species were particularly observed for *Brochothrix thermosphacta* at 5°C. Indeed some clones from different peaks, such as peaks 4 and 5, revealed a V3 sequence corresponding to *Brochothrix thermosphacta*, but with a variable identity percentage (from 98 to 100%) with the V3 sequence of the reference type strain DSMZ 20599. This was also the case for *Enterococcus* and *Vagococcus* at 15°C. Similar results were observed by Goldenberg *et al.* (2007) during the monitoring of intestinal microbiota and we observed an identical phenomenon with the TTGE technique in the previous study, which showed several bands for the reference strain profile of *Brochothrix thermosphacta*. This could partly be explained by the occurrence in some bacteria of multiple heterogeneous copies of the 16S rRNA genes within the genome (Crosby and Criddle, 2003; Dahllöf *et al.*, 2000). To avoid this phenomenon, the use of another housekeeping target gene, such as *rpoB*, existing in a single copy could be envisaged (Case *et al.*, 2007; Dahllöf *et al.*, 2000; Giacomazzi *et al.*, 2004; Peixoto *et al.*, 2002). Interestingly, at 15°C only one peak (peak 11) showed clones that exhibited sequences corresponding to *Brochothrix thermosphacta*. However, with regard to the corresponding chromatogram, we observed a very weak peak between peaks 11 and 12, which was not collected and sequenced but which may correspond to *Brochothrix thermosphacta*. In the natural microbial ecosystem of shrimp samples, DHPLC analysis produced profiles that described the identity of the bacterial species constituting shrimp microbiota, particularly at the end of storage, with the sequencing of fractions. The results are in accordance with those obtained in the previous TTGE-based study that described the microbiota of these samples (Jaffres *et al.*, 2008). Indeed, *Brochothrix thermosphacta* and uncultured *Firmicute*, the predominant bacteria at 5°C, had already been found at the same storage temperature by PCR-TTGE profiling. At 15°C, we obtained the same results with both techniques, which displayed a prevalence of LAB including the genera *Carnobacterium* and *Enterococcus*. In addition, the species *Brochothrix thermosphacta* and some *Enterobacteriaceae* were found. Moreover, DHPLC highlighted another LAB member, the *Vagococcus* genus, which was not identified by PCR-TTGE but by culture-dependent methods from isolated bacteria in the previous study. Several of these bacteria, such as *Brochothrix thermosphacta* and *Carnobacterium* species, have already been described as part

of shrimp microbiota (Laursen *et al.*, 2006; Mejlholm *et al.*, 2005). *Enterococcus* species have also been identified on shrimp products, stored at 25°C (Dalgaard *et al.*, 2003).

In conclusion, DHPLC is a promising novel molecular tool, which efficiently monitored the changes in shrimp microbiota through clear chromatographic profiles, thus confirming and complementing our knowledge about cooked shrimp microbiota. Finally, with this study we have proved that DHPLC and TTGE give similar results for the characterization of a complex food-related ecosystem such as the shrimp matrix. Furthermore, DHPLC has the advantage of providing results in a short time, with a chromatographic run-time of approximately twenty minutes. DHPLC also has a technical advantage concerning the separated peaks collected into distinct fractions, usable for direct sequencing after cloning or not, without the intermediate step of band elution and purification required for the TTGE and DGGE methods.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Françoise Le Vacon, managing director of the laboratory Atlangene®-Silliker (Nantes, France), for welcoming us and for allowing access to the WAVE System (Transgenomic). We thank Marie-France De La Cochetière from the research unit, EA 3826 Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Maladies Infectieuses, University of Nantes (France) for her support in microbial ecology. Emmanuel Jaffrès received a Ph.D grant awarded by Ifremer and ENITIAA.

REFERENCES

- Achtman, M., Morelli, G., Zhu, P., Wirth, T., Diehl, I., Kusecek, B., Vogler, A.J., Wagner, D.M., Allender, C.J., Easterday, W.R., Chenal-Francisque, V., Worsham, P., Thomson, N.R., Parkhill, J., Lindler, L.E., Carniel, E., Keim, P. 2004. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. Proceedings of National Academy Sciences of United States of America 101, 17837-17842.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25, 3389-3402.

- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59, 143-169.
- Barlaan, E.A., Sugimori, M., Furukawa, S., Takeuchi, K. 2005. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* 61, 399-412.
- Case, R.J., Boucher, Y., Dahllorf, I., Holmstrom, C., Doolittle, W.F., Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 278-288.
- Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G. 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* 90, 414-420.
- Crosby, L.D., Criddle, C.S. 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques* 34, 790-794, 796, 798 passim.
- Dahllorf, I., Baillie, H., Kjelleberg, S. 2000. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3376-3380.
- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P., Leisner, J.J. 2003. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 degrees C and 25 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* 94, 80-89.
- Domann, E., Hong, G., Imirzalioglu, C., Turschner, S., Kuhle, J., Watzel, C., Hain, T., Hossain, H., Chakraborty, T. 2003. Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 5500-5510.
- Duthoit, F., Callon, C., Tessier, L., Montel, M.C. 2005. Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in "Registered Designation of Origin" Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology* 103, 259-270.
- Duthoit, F., Godon, J.-J., Montel, M.-C. 2003. Bacterial Community Dynamics during Production of Registered Designation of Origin Salers Cheese as Evaluated by 16S rRNA Gene Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3840-3848.

- Eaves, D.J., Liebana, E., Woodward, M.J., Piddock, L.J. 2002. Detection of *gyrA* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4121-4125.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., Ogier, J.C. 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1248-1255.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56, 297-314.
- Ercolini, D., Frisso, G., Mauriello, G., Salvatore, F., Coppola, S. 2008. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology* 124, 164-170.
- Ercolini, D., Hill, P.J., Dodd, C.E.R. 2003. Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3540-3548.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S. 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Microbiology* 42, 199-202.
- Giacomazzi, S., Leroi, F., L'Henaff, C., Joffraud, J.J. 2004. *rpoB*-PCR amplified gene and temporal temperature gradient gel electrophoresis: a rapid tool to analyse bacterial strains representative of cold-smoked salmon microflora. *Letters in Applied Microbiology* 38, 130-134.
- Giraffa, G., Neviani, E. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 67, 19-34.
- Goldenberg, O., Herrmann, S., Adam, T., Marjoram, G., Hong, G., Gobel, U.B., Graf, B. 2005. Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5912-5915.
- Goldenberg, O., Herrmann, S., Marjoram, G., Noyer-Weidner, M., Hong, G., Bereswill, S., Gobel, U.B. 2007. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* 68, 94-105.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.

- Huber, C.G., Premstaller, A., Xiao, W., Oberacher, H., Bonn, G.K., Oefner, P.J. 2001. Mutation detection by capillary denaturing high-performance liquid chromatography using monolithic columns. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 47, 5-19.
- Hurtle, W., Bode, E., Kaplan, R.S., Garrison, J., Kearney, B., Shoemaker, D., Henchal, E., Norwood, D. 2003. Use of denaturing high-performance liquid chromatography to identify *Bacillus anthracis* by analysis of the 16S-23S rRNA interspacer region and *gyrA* gene. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4758-4766.
- Huss, H.H., Reilly, A., Karim Ben Embarek, P. 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11, 149-156.
- Jaffres, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prevost, H., Joffraud, J.J., Dousset, X. 2008. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*.
- Lafarge, V., Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. 2004. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5644-5650.
- Laursen, B.G., Leisner, J.J., Dalgaard, P. 2006. Carnobacterium Species: Effect of Metabolic Activity and Interaction with *Brochothrix thermosphacta* on Sensory Characteristics of Modified Atmosphere Packed Shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3604-3611.
- Lerman, L.S., Silverstein, K. 1987. Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in enzymology* 155, 482-501.
- Mejlholm, O., Boknaes, N., Dalgaard, P. 2005. Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology* 99, 66-76.
- Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., Orrego, C. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2676-2680.
- O'Donovan, M.C., Oefner, P.J., Roberts, S.C., Austin, J., Hoogendoorn, B., Guy, C., Speight, G., Upadhyaya, M., Sommer, S.S., McGuffin, P. 1998. Blind Analysis of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography as a Tool for Mutation Detection. *Genomics* 52, 44-49.

- Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.Y., Delacroix-Buchet, A. 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5628-5643.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3691-3701.
- Parayre, S., Falentin, H., Madec, M.N., Sivieri, K., Le Dizes, A.S., Sohier, D., Lortal, S. 2007. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiological Methods* 69, 431-441.
- Peixoto, R.S., da Costa Coutinho, H.L., Rumjanek, N.G., Macrae, A., Rosado, A.S. 2002. Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology* 35, 316-320.
- Rachman, C., Fourrier, A., Sy, A., De La Cochetière, M.F., Prévost, H., Dousset, X. 2004. Monitoring of bacterial evolution and molecular identification of lactic acid bacteria in smoked salmon during storage. *Le Lait* 84, 145-154.
- Shi, R., Otomo, K., Yamada, H., Tatsumi, T., Sugawara, I. 2006. Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistant gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. *Microbes and Infection* 8, 128-135.
- Takahashi, H., Kimura, B., Yoshikawa, M., Fujii, T. 2003. Cloning and Sequencing of the Histidine Decarboxylase Genes of Gram-Negative, Histamine-Producing Bacteria and Their Application in Detection and Identification of These Organisms in Fish. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2568-2579.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Thompson, J.R., Marcelino, L.A., Polz, M.F. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research* 30, 2083-2088.
- Troedsson, C., Lee, R.F., Stokes, V., Walters, T.L., Simonelli, P., Frischer, M.E. 2008a. Development of a denaturing high-performance liquid chromatography method for

- detection of protist parasites of metazoans. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4336-4345.
- Troedsson, C., Lee, R.F., Walters, T., Stokes, V., Brinkley, K., Naegele, V., Frischer, M.E. 2008b. Detection and discovery of crustacean parasites in blue crabs (*Callinectes sapidus*) by using 18S rRNA gene-targeted denaturing high-performance liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4346-4353.
- Underhill, P.A., Jin, L., Lin, A.A., Mehdi, S.Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R.W., Cavalli-Sforza, L.L., Oefner, P.J. 1997. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Research* 7, 996-1005.
- Underhill, P.A., Jin, L., Zemans, R., Oefner, P.J., Cavalli-Sforza, L.L. 1996. A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. *Proceedings of National Academy Sciences of United States of America* 93, 196-200.
- Valdimarsson, G., Einarsson, H., Gudbjornsdottir, B., Magnusson, H. 1998. Microbiological quality of Icelandic cooked-peeled shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* 45, 157-161.
- van Beek, S., Priest, F.G. 2002. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 297-305.
- Zapatka, F.A., Bartolomeo, B. 1973. Microbiological evaluation of cold-water shrimp (*Pandalus borealis*). *Applied Microbiology* 25, 858-861.

Chapitre II

**Identification d'une nouvelle espèce du genre *Vagococcus*,
Vagococcus penaei sp. nov., isolée de la microflore de la crevette cuite**

Publication n°3 :

***Vagococcus penaei* sp. nov., isolated from spoilage microbiota of cooked
shrimp (*Penaeus vannamei*).**

Emmanuel Jaffrès, Hervé Prévost, Jean-Jacques Joffraud and Xavier Dousset

Article soumis à
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Introduction

Nous avons consacré le 1^{er} chapitre des résultats à l'identification des principaux genres et espèces de bactéries présentes dans la microflore des crevettes décortiquées cuites, au moment de leur altération. Parmi elles, certaines avaient déjà été décrites comme faisant partie de la microflore d'altération des produits de la mer ou d'autres matrices alimentaires comme *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Enterococcus faecalis* et *Serratia liquefaciens*. En revanche dans cette étude, le genre *Vagococcus* a été mis en évidence pour la première fois dans un écosystème microbien complexe en lien avec l'altération d'une matrice alimentaire.

Le genre *Vagococcus*, qui appartient au groupe des bactéries lactiques, a été ainsi décrit en 1989 par Collins *et al.* (1989) afin d'actualiser la taxonomie des bactéries : coques, Gram positif, de mobilité variable, possédant l'antigène du groupe N de Lancefield, et s'apparentant aux *Streptocoques* et *Lactocoques*. L'étude des séquences du gène codant l'ARNr 16S a permis de reclasser ces bactéries dans un nouveau genre, le genre *Vagococcus*, phylogénétiquement proche des genres *Enterococcus* et *Carnobacterium*. Initialement, le genre *Vagococcus* comprenait une seule espèce, *Vc. fluvialis*, isolée de l'eau de rivière et des fèces de poulets (Collins *et al.*, 1989). Depuis, cette espèce a été identifiée dans divers écosystèmes comme celui d'organes d'animaux (Pot *et al.*, 1994) : bovins, chats, chevaux, porcs et également de divers prélèvements humains (Teixeira *et al.*, 1997) et plus récemment de racines dentaires (Al-Ahmad *et al.*, 2008). Ensuite, cinq nouvelles espèces ont été mises en évidence dans ce genre sur la base d'études phylogénétiques et/ou d'hybridations ADN-ADN. *Vagococcus salmoninarum* isolée de poissons malades (Wallbanks *et al.*, 1990 ; Schmidtke et Carson, 1994 ; Michel *et al.*, 1997 ; Ruiz-Zarzuela *et al.*, 2005 ; Michel *et al.*, 2007). L'espèce *Vc. lutrae* a été uniquement isolée à partir d'organes d'une loutre (*Lutra lutra*) (Lawson *et al.*, 1999). *Vagococcus fessus* a été isolée sur deux espèces de mammifères marins (Hoyles *et al.*, 2000). *Vagococcus carniphilus*, dont neuf souches ont été isolées de viande de bœuf hachée, a été décrite par Shewmaker *et al.* (2004). Cette espèce a également été isolée de saucisses sèches (Ammor *et al.*, 2005).

La dernière espèce décrite à ce jour est *Vc. elongatus* qui a été isolée à partir de lisiers de porcs (Lawson *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, aucune étude n'a impliqué une des six espèces du genre *Vagococcus* dans l'altération d'un aliment. D'ailleurs, seule *Vc. carniphilus* a été isolée de matrices carnées, sans pour autant être à l'origine de l'altération de ces

aliments. En revanche, certaines espèces comme *Vc. salmoninarum* sont considérées comme des pathogènes émergents, affectant des poissons (salmonidés) élevés en fermes aquacoles, avec des taux de mortalité pouvant aller jusqu'à 50% (Michel *et al.*, 1997).

Parmi les souches appartenant au genre *Vagococcus* isolées de la crevette décortiquée cuite, cinq présentaient des caractéristiques phénotypiques et moléculaires indiquant qu'elles correspondaient potentiellement à une nouvelle espèce identifiée au sein de ce genre. Néanmoins, pour confirmer ces résultats, une étude de taxonomie polyphasique plus approfondie a été menée sur une souche représentative de ce groupe (CD276^T), en mettant en œuvre des tests phénotypiques (morphologie cellulaire, mobilité, profil de fermentation des sucres, recherche d'activités enzymatiques), une analyse phylogénétique basée sur les séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr 16S ainsi qu'une analyse génotypique (hybridation ADN-ADN et %G+C).

Principaux résultats et discussion

Analyse phylogénétique du gène codant l'ARNr 16S

La séquence complète du gène codant l'ARNr 16S (1550 paires de base) de la souche CD276^T, a été assemblée avec celles correspondant aux espèces bactériennes les plus proches des genres *Vagococcus* et *Enterococcus* obtenues après analyse BLAST sur la GenBank.

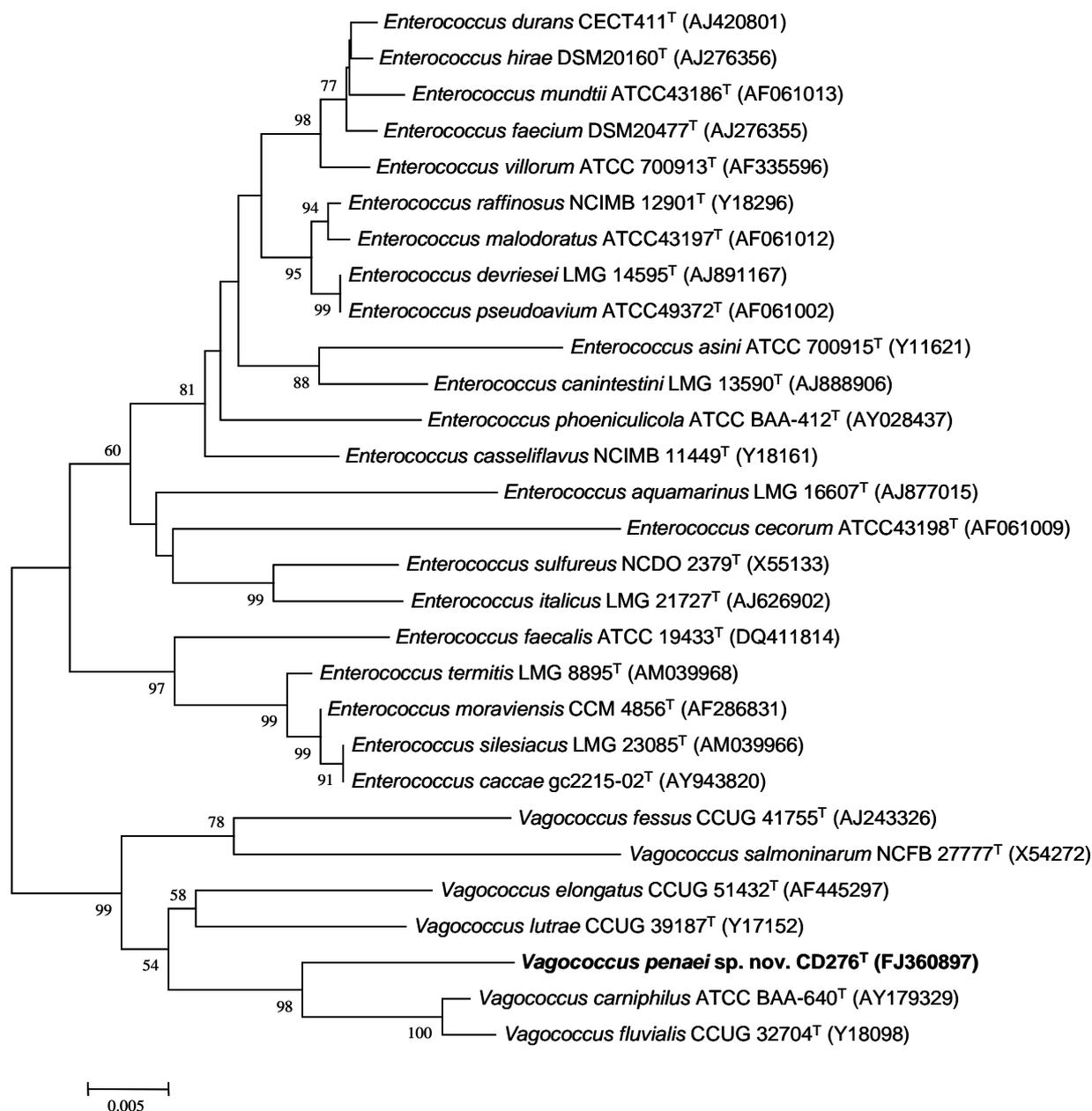


Figure 18 : Arbre phylogénétique non enraciné construit à partir des séquences du gène codant l'ARNr 16S, avec la méthode de neighbour-joining (Kimura 2 paramètres)

Toutes ces séquences ont été ensuite alignées à l'aide du logiciel MEGA 4.0., en utilisant le programme CLUSTAL. A partir de cet alignement, un arbre phylogénétique non enraciné a été construit (figure 18) avec la méthode de neighbour-joining appliquée aux distances à 2 paramètres de Kimura (Gascuel, 1997). La fiabilité de la topologie a été évaluée par la méthode des bootstraps en réalisant 1000 réplicats.

L'analyse topologique de cet arbre phylogénétique non enraciné montrait un assemblage des séquences du gène codant l'ARNr 16S en deux groupes monophylétiques, l'un correspondant aux espèces du genre *Enterococcus* et l'autre aux espèces du genre *Vagococcus*. L'appartenance de la souche CD276^T au genre *Vagococcus* a été confirmée, car sa séquence s'intégrait parfaitement au sein de ce groupe. D'autre part, elle constituait une branche bien distincte dans le groupe des *Vagococcus*, avec un nœud de branchement commun avec les espèces les plus proches : *Vagococcus fluvialis* et *Vagococcus carniphilus*.

Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN est la technique de référence qui permet de confirmer ou non l'identification d'une nouvelle espèce bactérienne. Celle-ci a été réalisée en utilisant les souches de référence des deux espèces les plus proches, déterminées par l'analyse phylogénétique précédente, soit *Vc. fluvialis* et *Vc. carniphilus*. Cette analyse a permis de déterminer le pourcentage d'homologie de l'ADN génomique total, entre la souche CD276^T et les souches de référence de *Vc. fluvialis* et *Vc. carniphilus*, qui était de 18 % et 14 %, respectivement. Ces valeurs étant bien inférieures à celle du seuil de 70 %, recommandé pour attester que deux souches font partie de la même espèce bactérienne, elles confirment donc que CD276^T constitue une nouvelle espèce au sein du genre *Vagococcus*.

Description de la nouvelle espèce *Vagococcus penaei* sp. nov.

En concertation avec les règles de nomenclature des procaryotes, le nom de *Vagococcus penaei* a été choisi pour désigner cette nouvelle espèce (*penaei* de *Penaeus*, correspondant à l'espèce de crevette *Penaeus vannamei* d'où la souche décrite dans cette étude a été isolée). Cette bactérie est de forme sphérique (coque), Gram positif, catalase et oxydase négative, de 0.5 à 1 µm de diamètre, se présentant seule, par paires ou en courtes chaînes. Elle est non mobile, aéro-anaérobie facultative et ne produit pas de spore. Elle forme des colonies rondes, petites, lisses, de couleur blanche, de diamètre supérieur à 1 mm. Elle ne produit pas d'hémolysine lorsqu'elle est cultivée sur gélose Columbia supplémentée de 5 % de sang de cheval. Elle métabolise le glucose en produisant de l'acide lactique mais pas de gaz. Cette

espèce est capable de croître à 10 °C mais pas à 45 °C. Elle ne croît pas non plus en milieu liquide contenant 6,5 % de NaCl. L'utilisation de galerie API ID32S a permis de détecter la production d'acide par cette souche à partir du D-maltose, D-mélezitose, D-raffinose, D-ribose, D-saccharose, D-tréhalose, de l' α -cyclodextrine. En revanche, elle ne produit pas d'acide à partir du L-arabinose, D-arabitol, D-lactose, D-mannitol, D-melibiose, D-sorbitol, D-tagatose, glycogène, methyl- β D-glucopyranoside et pullulane. La galerie API ZYM a permis de détecter une activité pour les enzymes suivantes : phosphatase acide, arginine dihydrolase, glycyl-tryptophane arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase et pyroglutamic acid arylamidase. Une faible activité a été détectée pour la β -glucosidase, l'estérase (C4) et l'estérase lipase (C8). Aucune activité n'a été détectée pour l' α -chymotrypsine, l' α -glucosidase, l' α -fucosidase, l' α -galactosidase, l' α -mannosidase, la β -galactosidase, la β -glucosidase, la β -glucuronidase, la β -mannosidase, l'alanyl-phénylalanyl-proline-arylamidase, la phosphatase alcaline, la cystine arylamidase, la leucine arylamidase, la lipase (C14), la N-acetyl- β -glucosaminidase, la trypsine, l'uréase et la valine arylamidase. *Vagococcus penaei* n'hydrolyse pas l'hippurate et ne réduit pas le nitrate. Par contre elle produit de l'acétoïne (test de Voges-Proskauer). Son pourcentage G+C de l'ADN est de 35,4 mol%.

Enfin, cette souche n'a pas manifesté d'activité anti-bactérienne testée sur boîte de Petri contre *Brochothrix thermosphacta*, l'une des principales bactéries d'altération de la crevette, et contre *Listeria monocytogenes*, pathogène important des produits de la mer. Les travaux présentés dans le chapitre III suivant ont montré que cette souche ne manifestait pas de potentiel d'altération sur matrice crevette.

L'ensemble de cette étude fait l'objet d'une publication soumise dans la revue International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, qui est présentée dans les pages suivantes.

***Vagococcus penaei* sp. nov., isolated from spoilage microbiota of cooked shrimp (*Penaeus vannamei*).**

Emmanuel Jaffrès,^{1,2} Hervé Prévost,¹ Jean-Jacques Joffraud,² and Xavier Dousset ^{*-1}

¹ UMR INRA 1014 SECALIM ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France.

² Département Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes, Cedex 3, France.

* Corresponding author. Tel.: ++33 251 785 525; fax: ++ 33 251 785 520.

E-mail address: xavier.dousset@enitiaa-nantes.fr

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of *Vagococcus penaei*, strain CD276^T = LMG 24833^T = CIP 109914^T is FJ360897.

ABSTRACT

A polyphasic taxonomic study, using phenotypic and phylogenetic characterization as well as genetic methods, was performed on an unknown Gram-positive, catalase-negative, coccus-shaped bacterium isolated from the spoilage microbiota of cooked shrimp. Comparative 16S rRNA gene sequence analysis of the representative strain CD276T indicated that this strain belonged to the genus *Vagococcus* and that it formed a new branch distinct from the six species already recognized (*Vc. fluvialis*, *Vc. salmoninarum*, *Vc. lutrae*, *Vc. fessus*, *Vc. carniphilus* and *Vc. elongatus*). This result was confirmed by using biochemical tests and molecular genetic analysis, notably DNA-DNA reassociation experiments with the two phylogenetically closest neighbours, *Vc. fluvialis* and *Vc. carniphilus*. The whole of this study attested that CD276T (LMG 24833T = CIP 109914T) represents the type strain of a novel species, for which the name *Vagococcus penaei* sp. nov. is proposed.

INTRODUCTION

The bacterial genus *Vagococcus* was proposed twenty years ago by Collins *et al.* (1989) in order to improve the taxonomy of Gram-positive, catalase-negative, motile, coccus-shaped bacteria that were close to the Lactococci in terms of reacting with Lancefield group N antisera, but phylogenetically distant. Phylogenetic studies have shown that the closest relatives of *Vagococcus* are the genera *Enterococcus* and *Carnobacterium* (Wallbanks *et al.*, 1990). To date, the *Vagococcus* genus is made up of six species. The first described was *Vc. fluvialis*, isolated from chicken faeces and sea water (Hashimoto *et al.*, 1974) and from various internal organs of domestic animals such as pigs, cattle, cats and horses (Pot *et al.*, 1994). *Vagococcus fluvialis* strains have also been isolated from human clinical samples such as blood, peritoneal fluid and wounds (Teixeira *et al.*, 1997) and, more recently, from a root-filled tooth with periradicular lesions (Al-Ahmad *et al.*, 2008). *Vagococcus salmoninarum* was recognized as the second species of the genus by Wallbanks *et al.* (1990). It was isolated from diseased fish such as Atlantic salmon, rainbow and brown trout (Michel *et al.*, 2007; Ruiz-Zarzuela *et al.*, 2005; Schmidtke and Carson, 1994; Wallbanks *et al.*, 1990). Two further species were subsequently found in several marine mammals and allotted to the genus. These were *Vc. lutrae* (Lawson *et al.*, 1999) and *Vc. fessus* (Hoyles *et al.*, 2000) isolated from the common otter (*Lutra lutra*) and from a seal and harbour porpoise, respectively. In the last few years, two more species have been isolated ; *Vc. carniphilus* from ground beef (Shewmaker *et al.*, 2004) and *Vc. elongatus* from a swine manure storage pit (Lawson *et al.*, 2007). Recently, we have isolated five strains of *Vagococcus*-like bacteria from the microbiota of spoiled cooked shrimps (Jaffrès *et al.*, 2008). In this present work, we describe the polyphasic taxonomic study of one representative strain, CD276T, from the group of five. The phenotypic and phylogenetic evidence is presented to support the description of a novel species of the *Vagococcus* genus, for which the name *Vagococcus penaei* sp. nov. is proposed.

MATERIAL AND METHODS

Strain isolation and culture condition

The five strains were collected from a batch of cooked, peeled, brined, drained shrimps (*Penaeus vannamei*, harvested in the Pacific Ocean) and packaged in modified atmosphere, which were considered as spoiled by a trained panel, experienced in the sensory evaluation of

seafood. All details of the sensory and microbiological monitoring, strain collection and purification can be found in the previous study (Jaffrès *et al.*, 2008).

phylogenetic analysis of 16S rRNA gene

The phylogenetic position of the five strains was determined by complete 16S rRNA gene sequence analysis. Genomic DNA extraction and purification were carried out using the Qiagen DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, S.A., Courtaboeuf, France). The 16S rRNA gene amplification, purification and sequencing were performed as described previously (Valcheva *et al.*, 2006). A sequence analysis using the BioEdit sequence alignment software (Hall, 1999), revealed that the five strains presented a 100% sequence similarity in their 16S-rRNA gene. The sequence of the strain CD276T (continuous stretches of 1550 bp) was deposited in the GenBank/EMBL/DDBJ database, under the accession number FJ360897. The CD276T 16S rRNA gene sequence was combined with those of the most closely related species of *Vagococcus* and *Enterococcus*, from the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and from the ribosomal database project (RDP, USA, <http://rdp.cme.msu.edu/>) (Cole *et al.*, 2003). These sequences were aligned with CLUSTAL in MEGA software, V4.0., and a neighbour-joining phylogenetic unrooted-tree was created (Tamura *et al.*, 2007) (Fig 1). The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The latter were computed using Kimura's 2-parameter method (Gascuel, 1997; Kimura, 1980) and are in the units of the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset. The topology analysis of the unrooted-tree showed the phylogenetic clustering of *Vagococcus* and *Enterococcus* sequences into two distinct monophyletic groups. The close association of the strain CD276T with members of the genus *Vagococcus* was confirmed, and the clustering together occurred with a bootstrap value of 99%. Strain CD276T formed a distinct branch based on this comparative 16S rRNA gene sequence analysis with a common branching node (bootstrap value of 98%) with *Vc. carniphilus* and *Vc. fluvialis*, which presented 97.5% and 97.3% sequence similarity, respectively, after a realigned matrix by CLUSTAL W. For the other *Vagococcus* type strains, the realigned matrix showed 96.2, 95.6, 95.1 and 94.2% sequence similarity with *Vc. lutrae*, *Vc. elongatus*, *Vc. salmoninarum* and *Vc. fessus*, respectively. The whole of these phylogenetic results indicated that CD276T was phylogenetically distinct from the six *Vagococcus* species already recognized.

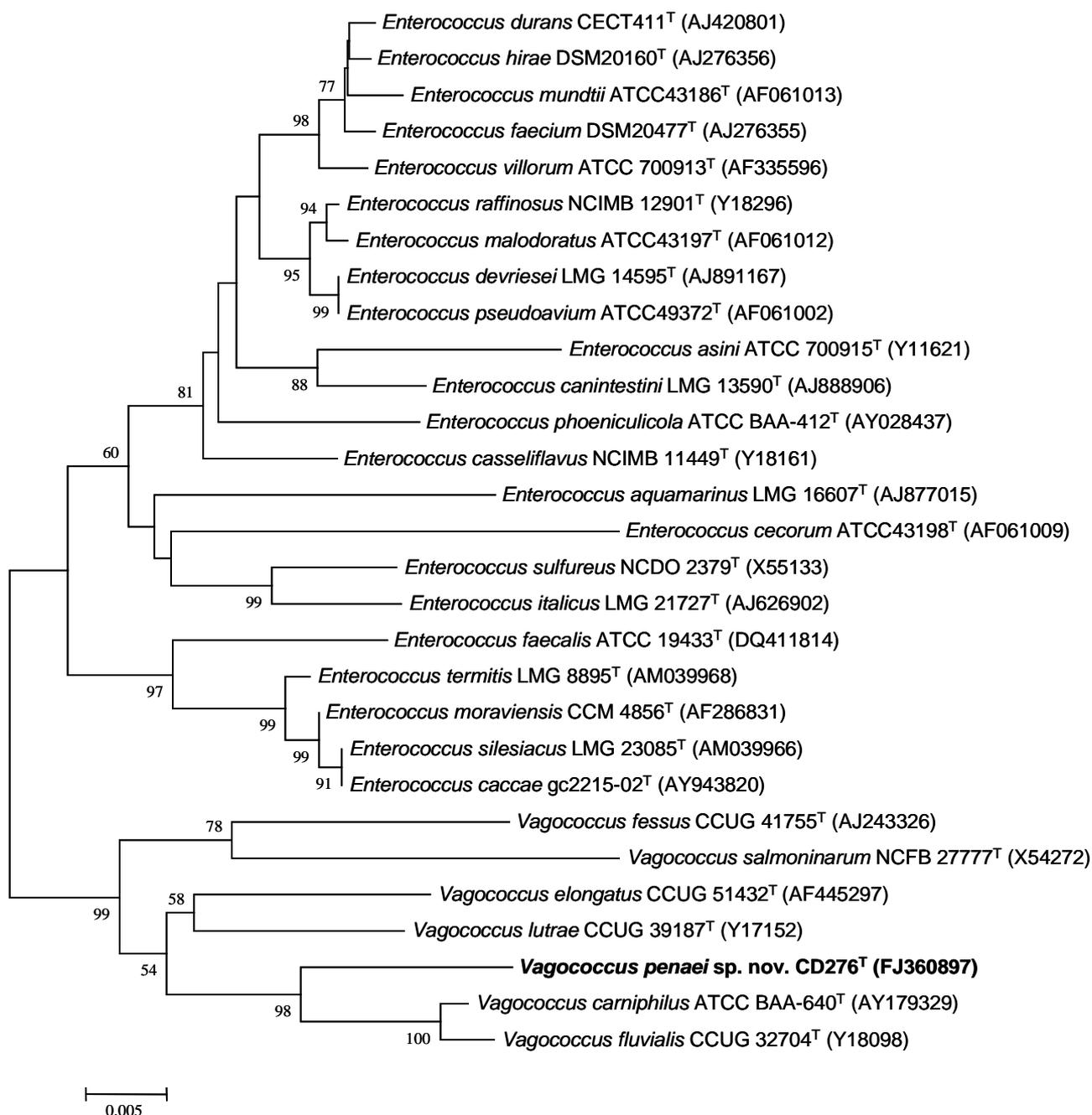


Fig. 1. Phylogenetic unrooted-tree based on 16S rRNA gene sequence analysis, showing the relationships of *Vagococcus penaei* sp. nov. strain CD276^T with the other *Vagococcus* species and some selected *Enterococcus* species. The tree was constructed using the neighbour-joining method, with Kimura's 2-parameter, on 1404 gap-free sites. Horizontal branch lengths are proportional to evolutionary distance. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1000 replicates, appear next to the corresponding branching node.

Phenotypical characterization

The strain isolate CD276^T was characterized phenotypically using conventional biochemical tests. All phenotypical tests were performed at 30°C except for temperature growth tests at 10 and 45°C. Strain CD276^T was analyzed for colony appearance and, by using phase contrast microscopy, for cell morphology and motility. Motility was also examined in mannitol nitrate mobility medium (MNM, BioRad) inoculated by stabbing the centre of the tube. Growth was studied in BHI broth with 0.1% dextrose and bromocresol purple indicator, incubated at various temperatures (10 and 45°C) or supplemented with NaCl (6.5%) to determine the resistance to NaCl. Haemolysis was assessed in Columbia Agar supplemented with 5% defibrinated horse blood (BioRad, Marne-la-Coquette, France) with 5-10% CO₂. Gas production from glucose was examined in Man Rogosa Sharp medium (MRS, Biokar Diagnostic) using Durham tubes and sealed by melted petroleum jelly. The cells strain CD276^T recovered from the spoilage microbiota of tropical cooked shrimp (*Penaeus vannamei*) consisted of Gram-positive, catalase-negative, coccus-shaped bacteria (0.5 to 1µm in diameter), non-motile by microscopic observation and MNM medium, occurring singly, in pairs or in a short chain, elongated in the direction of the chain. It produced small, smooth and white colonies (0.5 to 1 mm in diameter) on BHI agar at 30°C. Facultatively anaerobic, it produced lactic acid but not gas from glucose. The sugar fermentation patterns and enzymatic activities were characterized by using the API Rapid ID32S and API ZYM systems, respectively, according to the manufacturer's instructions (API-BioMerieux, Craponne, France). All tests for biochemical characterization were carried out at least in duplicate. Strain CD276^T was the second most reactive compared to the *Vagococcus* species already known with 13 positive reactions and 3 weak positive reactions, behind *Vc. lutrae* with 18 positive reactions and 5 weak positive reactions. However, four reactions were positive for CD276^T exclusively and not for any other *Vagococcus* species. These were the acidification of D-melezitose and D-raffinose, the enzymatic activity for arginine dihydrolase and acetoin production (Voges Proskauer). Furthermore, acid was produced from several other carbohydrates, such as D-maltose, D-ribose, D-saccharose, D-trehalose and α cyclodextrin, and activity was displayed for acid phosphatase, glycyl-tryptophan arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, and pyroglutamic acid arylamidase as well as a weak activity for β -glucosidase, esterase (C4) and esterase lipase (C8). The detailed biochemical characteristics of the strain CD276^T are presented in the description of this novel species and in Table 1.

Table 1. Phenotypic characteristics of *Vagococcus penaei* sp. nov. strain CD276^T and closely related *Vagococcus* species.

CHARACTERISTIC	1	2	3	4	5	6	7
Acid from:							
D-maltose	+	+	-	+	+	-	-
D-melezitose	+	-	-	-	-	-	-
D-raffinose	+	-	-	-	-	-	-
D-ribose	+	+	-	+	+	-	-
D-saccharose	+	+	-	-	+	-	-
D-sorbitol	-	+ ^w	-	-	+	-	-
D-trehalose	+	+	+	+	+	-	-
methyl-βD-glucopyranoside	-	-	-	+	+	-	-
α cyclodextrin	+	+	-	+	+	-	-
Enzymatic activity :							
α-chymotrypsin	-	+ ^w	+	-	+	+	-
α-glucosidase	-	+ ^w	-	-	+	-	-
α-galactosidase	-	-	-	-	+	-	+
β-glucosidase	+ ^w	+	+ ^w	-	+	-	+ ^w
β-mannosidase	-	+ ^w	-	-	+	-	-
Acid phosphatase	+	+	+	-	+	-	-
Alkaline phosphatase	-	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w
Arginine dihydrolase	+	-	-	-	-	-	-
Esterase (C4)	+ ^w	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w	+ ^w	+ ^w
Esterase lipase (C8)	+ ^w	+	+ ^w	-	+	+ ^w	+ ^w
Glycyl-tryptophan arylamidase	+	+	+	+	+	+ ^w	+
Leucine arylamidase	-	-	+	+	+	+	-
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	-	-	+ ^w	+ ^w	-
Pyroglutamic acid arylamidase	+	+ ^w	+	+	+	+	-
Acetoin production (Voges Proskauer)	+	-	-	-	-	-	-

+, positive reaction; -, negative reaction; +^w, weak positive reaction. Strains: 1, *Vagococcus penaei* sp. nov. strain CD276^T; 2, *Vc. fluvialis* CCUG 32704^T; 3, *Vc. salmoninarum* CCUG 33394^T; 4, *Vc. carniphilus* CCUG 46823^T; 5, *Vc. lutrae* CCUG 39187^T; 6, *Vc. fessus* CCUG 41755^T; 7, *Vc. elongatus* CCUG 51432^T. Data for reference strains were taken from the CCUG database (<http://www.ccug.se>).

DNA G+C content and DNA-DNA hybridisation

For the determination of G+C content, genomic DNA was prepared according to Gevers *et al.* (2001). The DNA G+C contents were determined in triplicate by using high performance liquid chromatography (Mesbah *et al.*, 1989). The DNA G+C content of the strain CD276T was 35.4 mol%. This value is within the range (33.6-44.5 mol%) obtained by compiling the G+C content of the six other recognized species of *Vagococcus*.

DNA-DNA hybridizations were carried out by the BCCM/LMG Bacteria Collection (University of Gent, Belgium) with a genomic DNA prepared according to a modification of the procedure of Gevers *et al.* (2001). They were performed at 35°C using the fluorometric method in duplicate, according to a modification of the method described by (Ezaki *et al.*, 1989). The two most closely related strains, based on the previous 16S rRNA sequence analysis (*Vc. fluvialis* and *Vc. carniphilus*), were included in the tests. Table 2 shows the values of DNA-DNA relatedness obtained. The DNA homology percentages reported are the means of 2 hybridizations. Thus, DNA-DNA hybridization experiments confirmed the grouping found with the phylogenetic data, with DNA-DNA reassociation values of 14 and 18% with *Vc. carniphilus* and *Vc. fluvialis*, respectively. These values are below the threshold of 70% suggested for species delineation (Stackebrandt & Goebel, 1994; Wayne *et al.*, 1987), indicating that the strain CD276T represents a separate genomic species.

Table 2. DNA relatedness between *Vagococcus penaei* sp. nov. strain CD276^T and phylogenetically closely related *Vagococcus* species (values are means of 2 minimum hybridizations).

Species	% DNA homology		
	<i>Vc. penaei</i> CD276 ^T	<i>Vc. carniphilus</i> CIP 108561 ^T	<i>Vc. fluvialis</i> LMG 9664 ^T
<i>Vc. penaei</i> CD276 ^T	100%	/	/
<i>Vc. carniphilus</i> CIP 108561 ^T	(14 ± 2)%	100%	/
<i>Vc. fluvialis</i> LMG 9664 ^T	(18 ± 2)%	(23 ± 0)%	100%

Description of *Vagococcus penaei* sp. nov.

Vagococcus penaei (pe.na'e.i. N.L. gen. n. *penaei*, of *Penaeus*, pertaining to the spoilage microbiota of cooked shrimp *Penaeus vannamei*, from which the first described strain of this species was isolated).

Cells are Gram-positive, coccus-shaped, 0.5 to 1 µm in diameter, occurring singly, in pairs or in a short chain, elongated in the direction of the chain. Cells are non-motile and non-spore forming, facultatively anaerobic and catalase and oxidase-negative. Small, smooth and white colonies, up to 1 mm in diameter, are formed by cells when grown on BHI agar at 30°C. When grown on Columbia agar supplemented with 5% defibrinated horse blood, cells do not produce haemolysis or pigment. Lactic acid but not gas is produced from glucose metabolism. The strain is able to grow at 10°C but no growth is detected at 45°C, nor in broth containing 6.5% NaCl. Using API systems, acid is produced from D-maltose, D-melezitose, D-raffinose, D-ribose, D-saccharose, D-trehalose and α cyclodextrin. Acid is not produced from L-arabinose, D-arabitol, D-lactose, D-mannitol, D-melibiose, D-sorbitol, D-tagatose, glycogen, methyl-βD-glucopyranoside and pullulan. Acid phosphatase, arginine dihydrolase, glycyl-tryptophan arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and pyroglutamic acid arylamidase activity is detected. Weak activity is detected for β-glucosidase, esterase (C4) and esterase lipase (C8). No activity is detected for α-chymotrypsin, α-glucosidase, α-fucosidase, α-galactosidase, α-mannosidase, β-galactosidase, β-glucosidase, β-glucuronidase, β-mannosidase, alanyl-phenylalanyl-proline-arylamidase, alkaline phosphatase, cystine arylamidase, leucine arylamidase, lipase (C14), N-acetyl-β-glucosaminidase, trypsin, urease and valine arylamidase. Hippurate is not hydrolysed. Nitrate is not reduced. Acetoin is produced (Voges-Proskauer). The DNA G+C content is 35.4 mol%. The type strain is CD276^T (= LMG 24833T = CIP 109914T), which was isolated from the spoilage microbiota of cooked shrimp *Penaeus vannamei*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the regions Bretagne et Pays de La Loire. We thank Florian Torselli for the molecular characterization of *Vagococcus* strains. We are grateful to Jean-Paul Euzéby for consultation regarding the species epithet. Emmanuel Jaffrès received a Ph.D grant awarded by Ifremer and ENITIAA.

REFERENCES

- Al-Ahmad, A., Pelz, K., Schirrmeister, J. F., Hellwig, E. & Pukall, R. (2008). Characterization of the first oral *Vagococcus* isolate from a root-filled tooth with periradicular lesions. *Curr Microbiol* 57, 235-238.
- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., Chandra, S., McGarrell, D. M., Schmidt, T. M., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 31, 442-443.
- Collins, M. D., Ash, C., Farrow, J. A., Wallbanks, S. & Williams, A. M. (1989). 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *J Appl Bacteriol* 67, 453-460.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 39, 224-229.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol* 39, 783-791.
- Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14, 685-695.
- Gevers, D., Huys, G. & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 205, 31-36.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hashimoto, H., Noborisaka, R. & Yanagawa, R. (1974). Distribution of motile streptococci in faeces of man and animals and in river and sea water. *Jpn J Bacteriol* 29, 387-393.
- Hoyle, L., Lawson, P. A., Foster, G., Falsen, E., Ohlen, M., Grainger, J. M. & Collins, M. D. (2000). *Vagococcus fessus* sp. nov., isolated from a seal and a harbour porpoise. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 1151-1154.
- Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M. F., Prevost, H., Joffraud, J. J. & Dousset, X. (2008). Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol* in press.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.

- Lawson, P. A., Falsen, E., Cotta, M. A. & Whitehead, T. R. (2007). *Vagococcus elongatus* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 751-754.
- Lawson, P. A., Foster, G., Falsen, E., Ohlen, M. & Collins, M. D. (1999). *Vagococcus lutrae* sp. nov., isolated from the common otter (*Lutra lutra*). *Int J Syst Bacteriol* 49, 1251-1254.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 159-167.
- Michel, C., Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D. G., Lautraite, A. & Tailliez, P. (2007). Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl Environ Microbiol* 73, 2947-2955.
- Pot, B., Devriese, L. A., Hommez, J., Miry, C., Vandemeulebroecke, K., Kersters, K. & Haesebrouck, F. (1994). Characterization and identification of *Vagococcus fluvialis* strains isolated from domestic animals. *J Appl Bacteriol* 77, 362-369.
- Ruiz-Zarzuela, I., de Bias, I., Girones, O., Ghittino, C. & Muazquiz, J. L. (2005). Isolation of *Vagococcus salmoninarum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), broodstocks: characterization of the pathogen. *Vet Res Commun* 29, 553-562.
- Schmidtke, L. M. & Carson, J. (1994). Characteristics of *Vagococcus salmoninarum* isolated from diseased salmonid fish. *J Appl Bacteriol* 77, 229-236.
- Stackebrandt, E. G. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44, 846-849.
- Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Carvalho Mda, G., Elliott, J. A., Joyce, K., Barrett, T. J., Teixeira, L. M. and Facklam, R. R. (2004). *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1505-1510.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Teixeira, L. M., Carvalho, M. G., Merquior, V. L., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. & Facklam, R. R. (1997). Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. *J Clin Microbiol* 35, 2778-2781.

- Valcheva, R., Ferchichi, M. F., Korakli, M., Ivanova, I., Ganzle, M. G., Vogel, R. F., Prevost, H., Onno, B. & Dousset, X. (2006). *Lactobacillus nantensis* sp. nov., isolated from French wheat sourdough. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 587-591.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. & Truper, H. G. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463-464.
- Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A. J., Fryer, J. L., Phillips, B. A. and Collins, M. D. (1990). 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40, 224-230.

Chapitre III

Etude du potentiel d'altération des espèces bactériennes isolées de crevettes tropicales décortiquées cuites.

Publication n°4 :

Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cooked and peeled tropical shrimps.

Jaffrès, E., Lalanne, V., Cornet, J., Cardinal, M., Serot, T., Dousset, X and J.J. Joffraud

**Article en préparation pour
*Food Research International***

Introduction

Après avoir mis en évidence les principaux genres et espèces de bactéries en lien avec l'altération des crevettes décortiquées cuites, notre objectif était de déterminer quelles étaient les espèces directement impliquées dans l'apparition de mauvaises odeurs ou dans la production de métabolites, caractéristiques du processus d'altération organoleptique. En effet, plusieurs de ces espèces ont déjà été décrites comme étant impliquées dans l'altération des produits de la mer ou d'autres matrices alimentaires. Par exemple, une précédente étude a montré que *Brochothrix thermosphacta*, inoculée sur du saumon fumé emballé sous vide, était responsable de la production de composés volatils comme le 2-hexanone ou le 2-heptanone qui sont impliqués dans l'apparition de l'odeurs fromage-bleu (Joffraud *et al.*, 2001). De même, cette espèce a également été mise en cause dans l'apparition d'odeurs fortes de beurre, aigres et d'odeurs nauséabondes, quand elle était inoculée sur des crevettes nordiques décortiquées cuites, emballées sous atmosphère modifiée. Ces odeurs étaient liées à la production de 2,3-butanedione, de 3-méthyl-1-butanal ou de 3-méthyl-1-butanol (Mejlholm *et al.*, 2005 ; Laursen *et al.*, 2006). *Serratia liquefaciens* est également considérée comme l'une des bactéries les plus altérantes du saumon fumé, par sa production de triméthylamine (TMA), liée à l'apparition des odeurs d'urine et d'ammoniac caractéristiques des poissons pourris.

Cette étude a donc consisté à évaluer le potentiel d'altération de six espèces bactériennes (*Brochothrix thermosphacta*, *Serratia liquefaciens*-like, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium alterfunditum*-like, *Vagococcus penaei* sp. nov.) isolées au cours de la précédente étude (voir chapitre I). Dans ce but, nous avons inoculé individuellement ces bactéries sur des échantillons de crevettes décortiquées cuites emballées sous atmosphère modifiée et conservées à 8°C. Pour chacune de ces espèces testées, l'inoculum était constitué d'un mélange de cinq souches permettant ainsi d'atténuer « l'effet souche », précédemment décrit par Joffraud *et al.* (2006) et Stohr *et al.* (2001). Ces auteurs ont en effet mis en évidence, que des souches appartenant à une même espèce pouvaient présenter entre-elles un potentiel d'altération variable quand elles étaient inoculées individuellement. Un suivi d'analyse sensorielle des crevettes inoculées, par un jury constitué de 11 juges entraînés et expérimentés dans l'évaluation des produits de la mer, a été réalisé deux fois par semaine pendant 27 jours. Lorsque l'activité altérante des espèces testées a été jugée suffisamment élevée, les composés volatils ont été analysés par micro-extraction

en phase solide (Solid Phase Micro Extraction, SPME) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Principaux résultats et discussion

Au cours de chaque séance d'analyse sensorielle, l'altération des échantillons de crevettes inoculées a été évaluée à l'aide de huit descripteurs d'odeurs (Riz/crustacé, lait-bouilli, serpillière, aigre/fermenté, amine/urine, fromage/pieds, choux/gaz/ail), établis selon une procédure décrite par Matamoros *et al.* (2009), dont chaque juge devait noter l'intensité. Egalement, à la fin de chaque séance, les juges devaient se prononcer sur le niveau d'altération des échantillons, en les classant dans une des quatre catégories suivantes : non-altéré, légèrement altéré, modérément altéré et fortement altéré.

Parmi les six espèces bactériennes testées, trois se sont révélées être les plus altérantes à savoir : *Bt. thermosphacta*, *St. liquefaciens*-like et *Cb. maltaromaticum*. En effet, les échantillons de crevettes inoculées avec ces trois espèces ont été les seuls à être classés dans la catégorie fortement altéré par au moins 50 % des juges. Néanmoins, ces espèces présentaient des évolutions différentes dans leur profil et leur activité d'altération. *Brochothrix thermosphacta* atteignait dès le 9^{ème} jour de stockage le niveau fortement altéré avec l'apparition d'odeurs de type fromage/pied et aigre/fermenté, suivi au 13^{ème} jour de *St. liquefaciens*-like qui présentait des odeurs de type choux/ail, amine/urine et serpillière. Enfin, *Cb. maltaromaticum* atteignait ce niveau de forte altération au 16^{ème} jour de stockage, en présentant des odeurs proches de celles émises par *Bt. thermosphacta* (fromage/pied et aigre/fermenté) mais moins prononcées. Toutefois, pour *Cb. maltaromaticum*, une odeur de beurre, qui ne faisait pas partie de la liste des descripteurs sélectionnés, a été systématiquement suggérée par les juges jusqu'à la fin du stockage. Les échantillons de crevettes inoculées avec les trois autres espèces, tout comme les échantillons témoins non inoculés, sont restés classés dans les catégories non-altérés et légèrement altérés pour *Vc. penaei* et *Cb. alterfunditum*-like, voire modérément altérés pour *Cb. divergens*.

Vagococcus penaei et *Carnobacterium alterfunditum*-like ont exprimé des odeurs riz/crustacée, caractéristiques des produits de la mer non altérés, jusqu'à la fin du stockage avec également une légère odeur de beurre pour *Vc. penaei*. *Carnobacterium divergens* a exprimé quant à elle une odeur de lait bouilli avec également à partir du 13^{ème} jour des odeurs fromage/pied et aigre/fermenté mais beaucoup moins prononcées que celles exprimées par *Cb. maltaromaticum* et *Bt. thermosphacta*.

La plupart de ces odeurs caractéristiques ont pour origine la production et la libération par les bactéries de composés chimiques volatils. Nous avons donc analysé par SPME/GC-MS la fraction volatile des échantillons de crevettes inoculées avec les trois espèces les plus

altérantes, afin de rechercher des relations entre les molécules produites et les profils d'odeurs attribuées à chacune de ces espèces. Parmi l'ensemble des composés produits par *Bt. thermosphacta*, certains sont déjà connus pour être responsables d'odeurs caractéristiques comme le 2,3-heptanedione qui est associé aux odeurs de fromage et de beurre (Fenaroli, 2001), le 3-méthyl-1-butanal avec l'odeur de malt (Varlet *et al.*, 2006), le 2,3-butanedione avec une odeur de beurre (Prost *et al.*, 2004 ; Senger-Emonnot *et al.*, 2006) ou encore le 2-méthyl-1-butanal avec une odeur forte de brûlé (Fukami *et al.*, 2002). Le profil sensoriel de *St. liquefaciens*-like a pu être expliqué par sa capacité à produire du 2,3-butanedione et de la triméthylamine, déjà connue pour être responsable des odeurs d'ammoniac et de poisson pourri (Jørgensen *et al.*, 2001 ; Gram et Dalgaard, 2002), ainsi que de l'acétate d'éthyle et du 2-butanol associés aux odeurs de solvant et de colle, respectivement (Jørgensen *et al.*, 2001). Enfin, *Cb. maltaromaticum* produisait du 3-méthyl-1-butanal, du 2-méthyl-1-butanal, du 2,3-butanedione et de l'acétate d'éthyle, pouvant expliquer les odeurs rencontrées sur les crevettes inoculées avec cette espèce. Cependant, elle ne produisait pas de 2,3-heptanedione qui est associé à l'odeur de fromage (Fenaroli, 2001). Ceci illustre donc le fait qu'une odeur n'est pas systématiquement due à une seule molécule, mais peut résulter de l'association et de la combinaison de plusieurs composés volatils (Olafsdottir *et al.*, 2000 ; Jørgensen *et al.*, 2001).

L'ensemble de cette étude a contribué à améliorer nos connaissances en ce qui concerne les mécanismes d'altération des crevettes cuites. Elle a permis de mettre en évidence les trois espèces bactériennes les plus actives dans l'altération organoleptique de ce type de produit : *Bt. thermosphacta*, *St. liquefaciens*-like et *Cb. maltaromaticum*. Ces bactéries ont métabolisé notamment des composés volatils issus de différentes voies cataboliques comme celles des acides aminés avec le 3-méthyl-1-butanal ou le 2-méthyl-1-butanal, du glycogène avec le 2,3-butanedione ou le 2,3-heptanedione, la fermentation des sucres avec l'acétate d'éthyle ou encore la respiration anaérobie à l'origine de la réduction de l'oxyde de triméthylamine (OTMA) en triméthylamine. Tous ces composés peuvent ensuite générer seuls ou en combinaison des mauvaises odeurs caractéristiques de l'altération.

L'ensemble de cette étude fait l'objet d'un projet d'article en préparation pour la revue Food Research International, et est présentée dans les pages suivantes.

Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cooked and peeled tropical shrimps

**Jaffrès, E.,¹⁻² Lalanne, V.,³ Cornet, J.,² Cardinal, M.,² Sérot, T.,³ Dousset, X.¹ and J.J.
Joffraud,^{*-2}**

1 UMR INRA 1014 SECALIM ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes
Cedex 3, France.

2 Ifremer, Département Sciences et Techniques Alimentaires Marines, F-44311 Nantes 03,
France.

3 Laboratoire de Biochimie Alimentaire et Industrielle, Equipe de Recherche Qualité
Aromatique des Aliments, ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes Cedex
3, France.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40374284; fax: +33 2 40374071.

E-mail address: joffraud@ifremer.fr

ABSTRACT

Off-odours and flavours associated with the seafood spoilage are the consequences of bacterial activity. This study evaluated the spoilage potential of six bacterial species (*Brochothrix thermosphacta*, *Serratia liquefaciens*-like, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium alterfunditum*-like and *Vagococcus penaei* sp. nov.) isolated from cooked and peeled tropical shrimps. Five different strains for each species group were inoculated into cooked and peeled shrimps, packaged in modified atmosphere (MAP : 50% N₂-50% CO₂) and stored for 27 days at 8°C. Microbial growth as well as chemical and sensory changes were monitored, twice a week, during the storage period. A trained panel performed sensory profiles on each bacterial group and evaluated the level of spoilage according 4 classes (NS = non spoiled, LS = lightly spoiled, MS = moderately spoiled, SS = strongly spoiled). A correspondence factorial analysis on spoilage classes showed that the bacteria mainly involved in shrimps spoilage were *Brochothrix thermosphacta*, *Serratia liquefaciens*-like and *Carnobacterium maltaromaticum* whose main characteristics of odours, described on a principal component analysis, were cheese-sour, cabbage-amine and cheese-sour-butter, respectively. When spoilage potential of bacterial groups was clearly observed by panellist, the volatile fraction of the inoculated shrimps samples was analysed by solid phase micro-extraction (SPME) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). This device showed that the characteristics odours were probably induced by the volatile compounds production such as 3-methyl-1-butanol, 2,3-butanedione, 2-methyl-1-butanol, 2,3-heptanedione or trimethylamine.

Keywords : Shrimp, bacteria, spoilage potential, sensory analysis, SPME/GC-MS analysis.

INTRODUCTION

Shrimps are of economic importance worldwide, particularly in Europe which is the world's main importer of shrimp (FAO-Globefish/Josupeit, 2008). The most important part of shrimps purchased by French consumers, concerns the chilled and cooked shrimps (OFIMER, 2006). However, this foodstuff is considered as very sensitive to the microbial spoilage. Indeed, after the heat treatment in the preparation process, they can undergo bacterial recontaminations from the processing equipment and environment in the production plant (Bagge-Ravn *et al.*, 2003 ; Huss *et al.*, 2000). These bacteria can grow very quickly on the shrimp matrix where the conditions are ideal for growth, with a neutral pH, a high water activity (A_w) and a high content of low molecular weight compounds such as free amino-acids and nucleotides (Gram and Huss, 1996). Few of them, named the specific spoilage organisms (SSO), can present a metabolism resulting in the formation of amines (trimethylamine), sulfides, alcohols, ketones, aldehydes and organic acids (Gram and Dalgaard, 2002 ; Gram *et al.*, 2002). These chemical compounds give rise to the unpleasant and unacceptable off flavours/odours associated with the sensory spoilage phenomenon and result finally in a decrease of shelf-life. In a previous study, Jaffrès *et al.* (2008) have highlighted the main bacterial genera and species related to the spoilage microbiota of cooked and peeled tropical shrimps, packaged in modified atmosphere (MAP). The lactic acid bacteria, with the main represented genera *Carnobacterium*, *Vagococcus* and *Enterococcus*, were found to dominate the microbiota of studied shrimps, followed by *Brochothrix thermosphacta* and *Serratia liquefaciens*-like. Several of these bacteria were already involved in the off-odours production, characteristics of the spoiled seafood products. Indeed, *Serratia liquefaciens* was found to be one of the most spoiling micro-organisms in cold smoked salmon (Joffraud *et al.*, 2006 ; Stohr *et al.*, 2001), which produced trimethylamine (related to the urine, curdled milk or vinegar off-odours), dimethylsulphide and thiobarbituric acid (sulphur odours related to garlic, cabbage or mud). *Brochothrix thermosphacta* was also found to be responsible for the production of the volatile compounds, 2-hexanone and 2-heptanone, which were shown to be related with the formation of sour, blue-cheese and pungent off-odours in cold smoked salmon (Joffraud *et al.*, 2001). In chilled and MAP cooked peeled nordic shrimps, *Bt. thermosphacta* was also shown to produce 2,3-butanedione (diacetyl), 3-methyl-1-butanal, 3-methyl-1-butanol (Laursen *et al.*, 2006 ; Mejlholm *et al.*, 2005). These compounds seemed to be responsible in the formation of strong butter, buttermilk-like, sour and nauseous off-odours. For *Carnobacterium* species, the spoilage potential is not clearly established in seafood products. Several previous studies on

the spoilage of cold smoked salmon, have shown that the inoculation of *Cb. divergens* and *Cb. maltaromaticum* produced either no off-odours or a very weak butter-like odours, possibly resulting from the formation of 2,3-butanedione and 2,3-pentanedione, which was not considered as a spoilage off-odour by a trained panel (Joffraud *et al.*, 2001 ; Leroi *et al.*, 1998 ; Stohr *et al.*, 2001). Furthermore, Laursen *et al.* (2006) have shown that the spoilage potential of *Carnobacterium* species was species and strain dependent on chilled and MAP cooked peeled nordic shrimps. Some strains of *Cb. divergens* and *Cb. maltaromaticum* were able to cause off-odours such as chlorine, chemical, malty, nutty, sour and nauseous, probably generated by the production of ammonia, tyramine, various alcohols, aldehydes, and ketones. Conversely, others strains of *Cb. maltaromaticum* were unable to produce these spoilage compounds and were not involved in shrimps spoilage. Mejlholm *et al.* (2005) have shown that *Cb. maltaromaticum* and *Bt. thermosphacta* in co-culture on chilled and MAP cooked peeled nordic shrimps, produced a particular wet-dog off-flavour, which was not identified when the two species were studied separately. This combined activity of these two species was confirmed by Laursen *et al.* (2006), who have shown that the wet dog off-flavour did not result from a new metabolite production by the co-culture, but may result from the interaction between metabolites formed by the two species. The whole of these previous works shows that the spoilage potential of SSO depends on the nature of food matrix, where they have been isolated from. The identification of the bacteria responsible for the spoilage in cooked shrimp is important to allow a better understanding of the mechanisms involved in spoilage, and of any changes in the product after the heat treatment. To our knowledge, only the bacteria isolated from the cooked nordic shrimps were studied through their spoilage characteristics. The purpose of this present study was to investigate the spoilage potential of several bacteria, belonging to different taxonomic groups, previously isolated from tropical cooked shrimps (Jaffrès *et al.*, 2008). Spoilage potential of these bacteria was assessed by monitoring their sensory profile, and by investigating the volatile fraction released by bacteria from spoiled, cooked tropical shrimps.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

All strains tested in this study, selected from the collection of the laboratory, were previously isolated from cooked and peeled tropical shrimps in MAP (Jaffrès *et al.*, 2008) and were maintained as frozen stocks at -80°C in a cryoprotector medium containing glycerol. These

strains belonged to the taxonomic groups: *Bt. thermosphacta*, *Cb. maltaromaticum*, *Cb. divergens*, *Cb. alterfunditum*-like, *Vc. penaei* sp nov. and *St. liquefaciens*-like. Each group was represented by five strains (Table 1).

Table 1. Bacterial groups (reference numbers in IFREMER collection) inoculated on cooked and peeled tropical shrimps, by mixing strains cultures.

Bacterial species	Inoculated strain mixture	Label of mixture
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	CD 251, CD 290, CD 340, CD 266, CD 274	Bro
<i>Serratia liquefaciens</i> -like	CD 249, CD 297, CD 298, CD 301, CD 302	Sl
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	CD 253, CD 256, CD 257, CD 263, CD 300	Cm
<i>Carnobacterium divergens</i>	CD 362, CD 314, CD 379, CD 320, CD 361	Cd
<i>Carnobacterium alterfunditum</i> -like	CD 332, CD 344, CD 345, CD 347, CD 348	Ca
<i>Vagococcus penaei</i> sp. nov.	CD 276, CD 279, CD 285, CD 310, CD 380	Vp

Strains culture, samples inoculation and packaging

Tropical shrimps samples (*Penaeus vannamei*) used in this study were prepared in semi-industrial conditions at the experimental pilot in food processing of the high institute in food science and technology (ENITIAA) Nantes, France. The shrimps (size 112 to 132 shrimps per kg) were farmed, caught, peeled and frozen in Colombia and supplied in the frozen state to the pilot, and kept at -20°C until the start of the experiments. Shrimps were cooked in a boiling and salted water bath (30g NaCl l⁻¹) until a core temperature around +80°C was achieved. Shrimps were then drained and rapidly cooled by storage into a cooling room (-20°C) until a core temperature around +2°C was reached. The cooked shrimps samples were kept at +2°C into a chilled room, until the inoculation process. Strains were pre-cultured individually in brain heart infusion broth (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), and cultured in the same conditions until an absorbance-estimated concentration level of approximately 10⁸ cells ml⁻¹ was achieved. The cultures of five strains belonging to the same species were pooled into a sterile vial and mixed. The mixture was thousand-fold diluted in sterile peptone water (0.85% NaCl and 0.1% peptone), in order to achieve an inoculation concentration of approximately 10³–10⁴ cells g⁻¹. The inoculation and packaging process were

carried out in a white-room of the experimental pilot. Each strain mixture was inoculated on a batch of approximately 4,5 kg of cooked and peeled shrimps (around 20ml of diluted mixture/kg) under a laminar flow hood, by spraying both faces with an airbrush coupled with compressor and equipped with sterile needle (Dalbe, Nantes, France). A control was prepared by spraying sterile peptone water on cooked and peeled shrimps, instead of strains mixture. Each batch of inoculated shrimps were divided and placed into several plastic packets (around 190 g portions) as well as for shrimps control, and packaged in modified atmosphere (50% CO₂ and 50% N₂) using a Multivac T 200 machine (Hagenmüller, Wolfertschwenden, Germany) and low gas permeability film like LDPE (low density polyethylene). All batches of inoculated shrimps and control were stored at 8°C for several weeks and twice a week, two series of analysis were carried out including sensory, chemical and microbiological analysis, until the sensory rejection was achieved. The volatiles compounds produced by inoculated bacteria were then detected and analysed by solid phase micro-extraction (SPME) and gas chromatography coupled to a mass spectrometry system (GC-MS). Each analysis was also realized in the same conditions for shrimps control.

Enumeration of inoculated strains

A 30-g portion of shrimp samples was aseptically weighed into 120 ml of sterile physiological saline solution (0.85% NaCl) with 0.1% peptone in a sterile plastic bag and blended with a stomacher 400 (Seward Medical, London, UK) for 2 min. The homogenized analysis solution was kept at room temperature for 30 min for bacterial resuscitation. Several appropriate 10-fold dilutions of the analysis solution were carried out in sterile physiological saline solution and 0.1 ml of each was spread on a plate. The following media were used to enumerate the inoculated strains: plate count agar (PCA, Biokar) incubated aerobically for 3–5 days at 25°C for *Bt. thermosphacta* and *St. liquefaciens* and Elliker broth (Biokar) with 1.5% of agar, placed in anaerobic jars with Anaerocult A (Merck) at 20°C for 5 days for *Cb. maltaromaticum* and *Vagococcus penaei* sp. nov.

Chemical analysis

The flesh remaining in the bags opened for microbiological analysis was homogenized in a Waring Blender (New Hartford, CO, USA). Total Volatile Basic Nitrogen (TVBN) and Trimethylamine (TMA) were measured in duplicate by the Conway microdiffusion method (Conway and Byrne, 1933). The pH value was measured in the ten-fold-diluted flesh with a pH meter (Mettler Delta, AES, Combourg, France).

Sensory analysis

Eleven trained panellists, experienced in seafood sensory evaluation, carried out the sensory analysis of shrimp samples, according to a conventional profile (QDA) (ISO13299, 2003). For shrimp odours evaluation, the list of descriptors established according the procedure described by Matamoros *et al.*(2009) was tested in preliminary sessions, where fresh cooked and peeled tropical shrimp, stored at +4°C were evaluated each week, during six weeks. These sessions allowed to select only eight relevant descriptors (table 2) .

Table 2. List of sensory spoilage descriptors selected for the shrimps samples analysis and corresponding label used in Fig. 5.

Descriptor of odour	label
Global intensity of odour	oint
Rice/crustacean	rice
Milky boiled	milk
Floor cloth	fclo
Sour/fermented	sour
Amine/urine	amin
Cheese/feet	chee
Cabbage/gas/garlic	cabb

Sensory sessions were performed in individual testing booths (ISO 8589, 1989) equipped with a computerized system using Fizz 2.30C software (Biosystèmes, Couternon, France). Panellists were required to score each descriptor on an unstructured scale anchored by the term low intensity (0) and high intensity (10). They received seven samples (4 shrimps per sample), six inoculated and one control. Products were assigned 3 digit numbers, randomized and served simultaneously to the panellists, after 1 hour in a oven at 18°C. At the end of the evaluation, panellists identified the level of spoilage of each sample: NS, non spoiled; LS, lightly spoiled; MS, moderately spoiled and SS, strongly spoiled. The frequencies obtained for each class on the whole panellists were recorded for each bacterial group, at each analysis

day. The products were considered to be in the spoilage phase when at least 50% of the assessors classified them at the SS level.

Data treatment

Summary statistics (mean, standard deviation, minimum, maximum), analysis of variance and Duncan's multiple range test were performed using Statgraphics Plus Centurion XV.I software (Sigma Plus, Paris, France). The significant statistical level was set at $p < 0.05$. Principal component analysis (PCA) with standardization was performed on the means of the scores for each sensory descriptor. For levels of spoilage (NS, LS, MS, SS) frequencies were treated by a correspondence factorial analysis (CFA). Multivariate data processing was performed with Uniwin Plus 6.1 software (Sigma Plus).

Analysis of volatile compounds

Volatile compounds produced by inoculated bacteria were analysed using a device of gas chromatography coupled with mass spectrometry, after a solid-phase micro extraction (SPME). SPME is a single-step solvent-free extraction technique for volatile compounds extraction, with a high sensitivity (Arthur and Pawliszyn, 1990). To date, SPME has been used for analysis of volatile compounds in different foodstuff (Duflos *et al.*, 2006 ; Risticovic *et al.*, 2008) and various biological and inorganic materials (Nicolle *et al.*, 2008 ; Pawliszyn, 1997). In brief, a 4-g portion of shrimp sample was weighed into a 20 ml vial with a polypropylene screw-on cap and a PTFE/silicone septum (Supelco, Bellefonte, PA, USA) to make airtight. The vial was heated at 40°C for 50 min to allow volatiles evaporation from the sample. The SPME fiber, 85 µm carboxen/polydimethylsiloxane Stable Flex™ (Supelco), was inserted through the septum and exposed in the headspace of vial for 25 min, to allow the volatile compounds absorption to SPME fiber. The SPME fiber was then introduced into the injector port of an Agilent gas chromatograph model GC 7890A, with flame ionization detector (Agilent technologies, Santa Clara, USA) in order to desorb the volatile compounds to the capillary column at 280°C for 5 min. The GC-MS system was equipped with an autosampler MPS 2 (Gerstel, Mülheim, Germany), a chromatographic column Agilent J&W DB-5ms (30m length × 0.25mm internal diameter × 0.5µm film thickness), and a mass selective detector 5975 C VL (Agilent). The desorbed components were then subjected to GC-MS analysis. Helium was used as carrier gas with a flow of 1.3 ml/min and the oven temperature was programmed as follows: 40°C for 5 min, then ramped at 3°C min⁻¹ to 140°C, then ramped at 6°C min⁻¹ to 280°C, held during 5 min. Molecules of volatile compounds were detected by FID and mass selective detector. The detector operated in a

mass range between 33 and 300 with a scan rate at 2 scans/s. Identification of volatile compounds was carried out by using a MS database/library system (Wiley 6, Hewlett-Packard). Data were reported as log (peak area/g) for each compound detected as described previously by Laursen *et al.* (2006). The detection limit was 400 000 area units corresponding to 5.0 log(peak area/g).

RESULTS

Bacterial kinetics

Fig 1A and B, show the growth pattern of the six different bacterial groups, inoculated on cooked and peeled tropical shrimps, during storage under MAP at 8°C for 27 days. Most of the cultures were inoculated in a range of 10^4 - 10^5 cfu g⁻¹, except for *Cb. maltaromaticum* and *Vc. penaei*, inoculated at 10^3 - 10^4 cfu g⁻¹. The control was under the enumeration threshold (10^3 cfu g⁻¹) until 20 days of storage, then an increase of growth was detected with around 10^6 cfu g⁻¹ at the end of storage. All bacterial groups grew well on the cooked shrimp matrix, they reached their maximum levels after 1-2 weeks of storage with a final counts ranging between 10^8 and 10^9 cfu g⁻¹. According to the inoculation rates, the growth curves pattern were different and two sets of bacterial groups can be distinguished. A first set, including *Cb. divergens*, *St. liquefaciens*-like, *Cb. alterfunditum*-like and *Bt. thermosphacta*, increased rapidly during the first week and reached their maximum of growth after six days of storage. The growth of the second set, including *Cb. maltaromaticum* and *Vc. penaei* which were inoculated at a lower level, was delayed and they reached their maximum of growth after 12 days of storage.

Chemical changes

Most of the bacterial groups produced a significant amount of TVBN compared to the control, which did not exceed 20 mg-N 100g⁻¹ (Fig. 2A, B). The highest producers were *Cb. divergens*, *Cb. maltaromaticum* and *Vc. penaei*, which reached a maximum production rate of TVBN ranging between 80 and 90 mg-N 100 g⁻¹. However, *Cb. divergens* exhibited a better yield than both others, because it reached the maximum of production since nine days of storage, whereas in the same period, the TVBN production for *Cb. maltaromaticum* and *Vc. penaei* did not exceed 15 mg-N 100 g⁻¹, and they reached their maximum of production after 20 days of storage. The three others bacterial groups exhibited a lower and more graduate

production of TVBN during storage, which reached 72, 60 and 42 mg-N 100 g⁻¹ at the end of storage for *Cb. alterfunditum*-like, *Bt. thermosphacta* and *St. liquefaciens*-like.

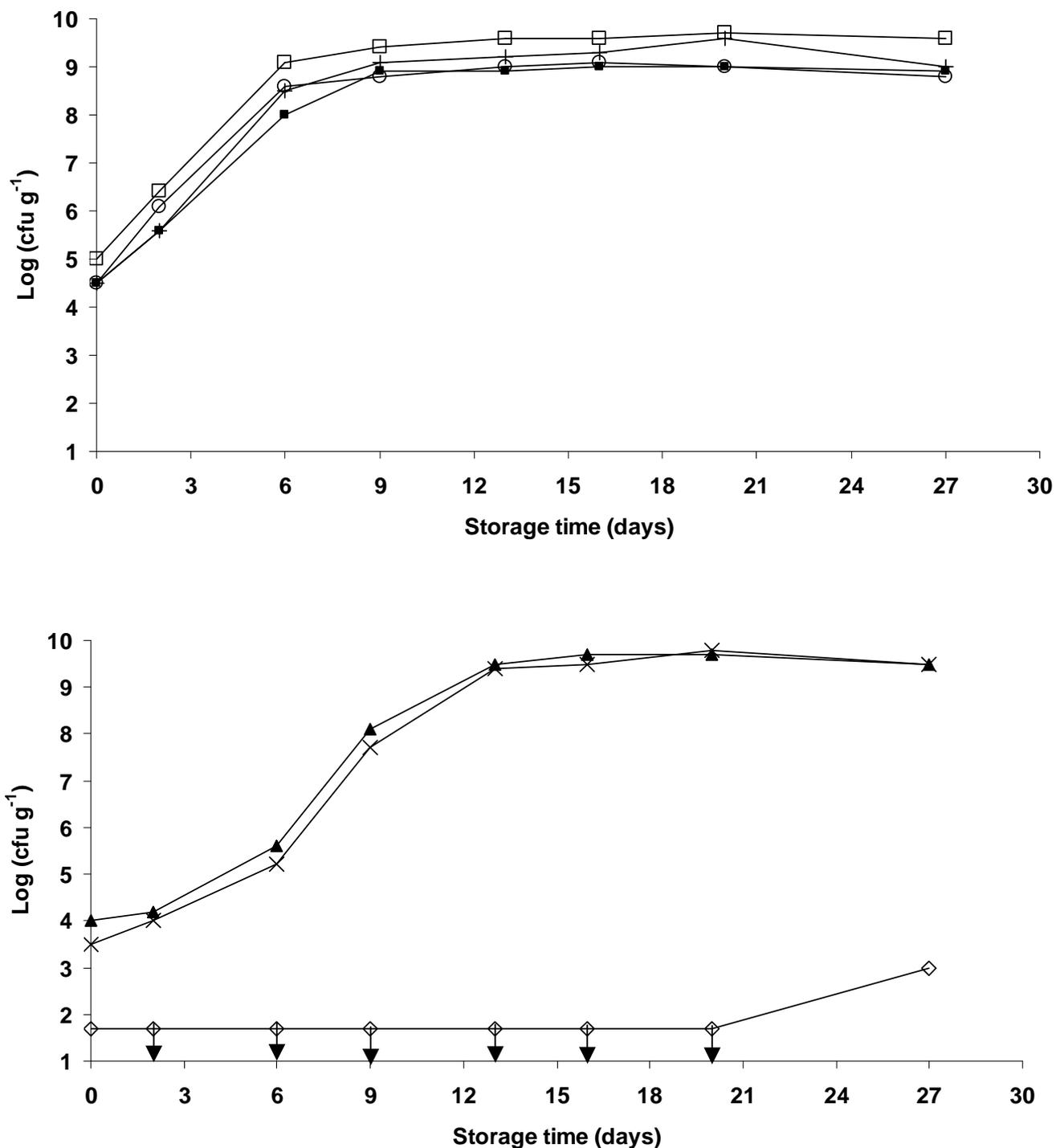


Fig. 1. Growth of bacterial groups on chilled and MAP cooked peeled tropical shrimps during storage at 8°C. A: (□): *Carnobacterium divergens*, (+) : *Carnobacterium alterfunditum*-like, (O) : *Serratia liquefaciens*-like, (■) : *Brochothrix thermosphacta*. B : (▲) : *Carnobacterium maltaromaticum*, (×) : *Vagococcus penaei* sp. nov., (◇) : Control. The symbol “↓” indicates that counts were below the enumeration threshold (10² cfu g⁻¹).

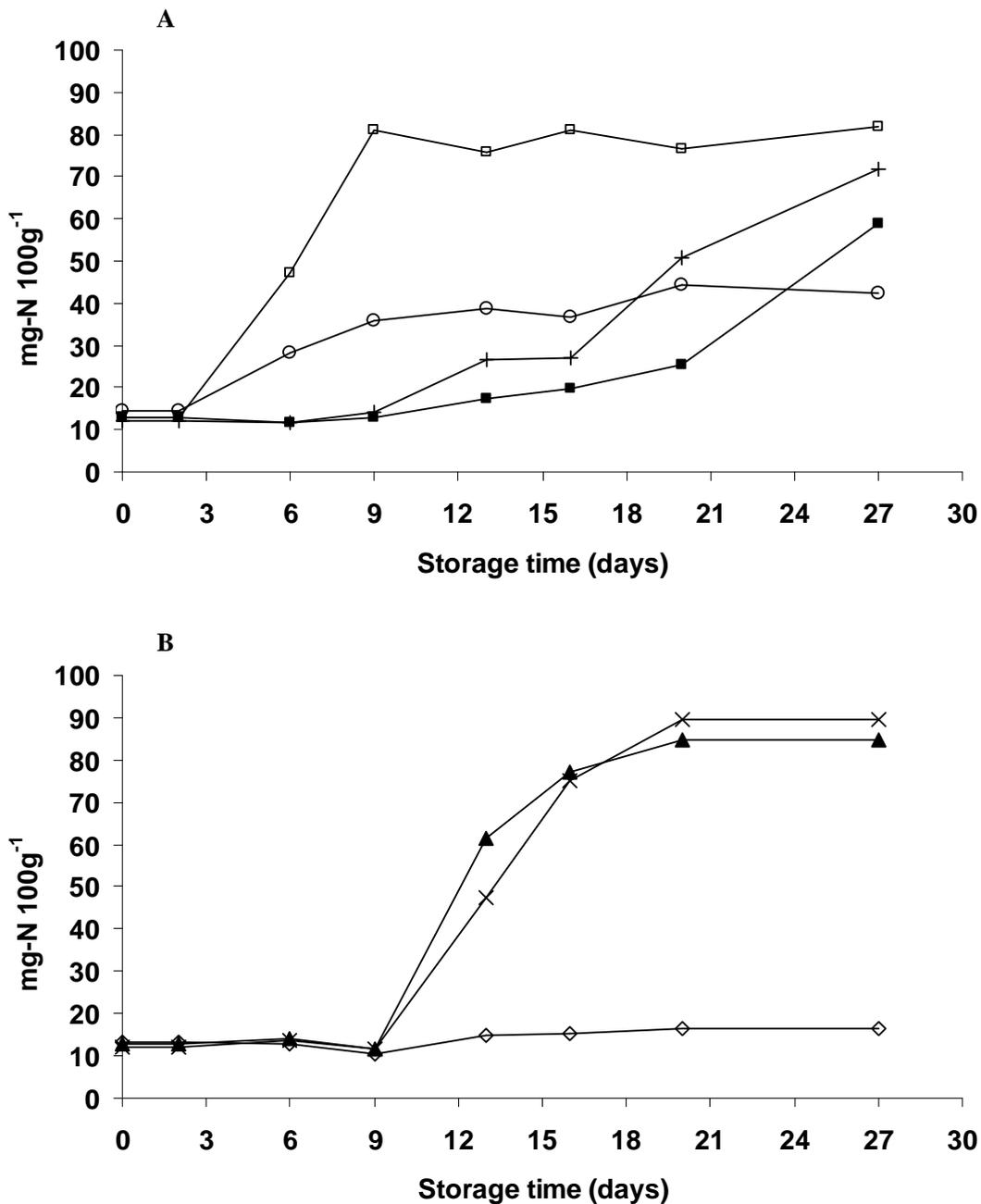


Fig. 2. Total volatile base nitrogen (TVBN) production ($\text{mg-N } 100 \text{ g}^{-1}$) of bacterial groups inoculated on chilled and MAP cooked peeled tropical shrimps during storage at 8°C . A: (□): *Carnobacterium divergens*, (+) : *Carnobacterium alterfunditum*-like, (O) : *Serratia liquefaciens*-like, (■) : *Brochothrix thermosphacta*. B : (▲) : *Carnobacterium maltaromaticum*, (×) : *Vagococcus penaei* sp. nov., (◇) : Control.

TMA production (Fig. 3) was very low for all bacterial groups or even inexistent during all the storage period for *Cb. alterfunditum*-like, *Cb. maltaromaticum* and *Vc. penaei* (data not shown) as well as for the control. Among the bacterial groups which exhibited a very low

TMA production, only *St. liquefaciens*-like showed an increase of the amount of TMA during storage, but it did not exceed 10 mg-N 100 g⁻¹.

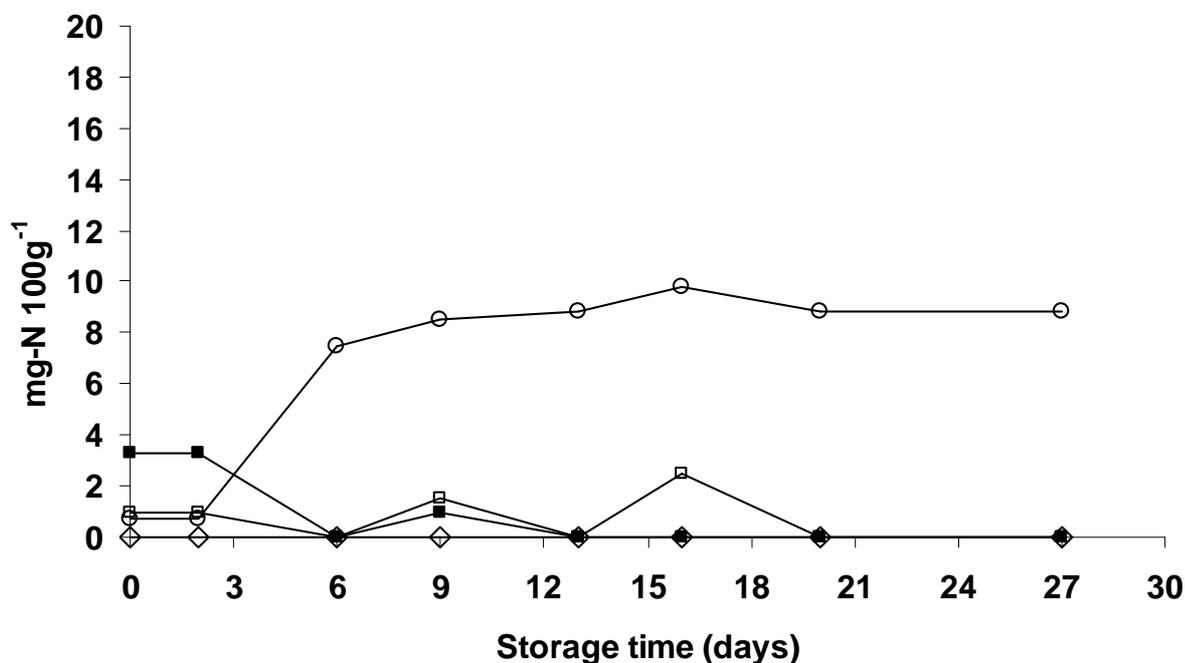


Fig 3. Trimethylamine (TMA) production (mg-N 100 g⁻¹) of bacterial groups inoculated on chilled and MAP cooked peeled tropical shrimps during storage at 8°C. (□): *Carnobacterium divergens*, (O) : *Serratia liquefaciens*-like, (■) : *Brochothrix thermosphacta*, (◇) : Control.

Sensory characteristics of inoculated shrimps

Correspondence factorial analysis (CFA) performed on the frequencies of the four levels of spoilage, indicated the spoilage potential of each bacterial groups (Fig. 4). The first two principal components allowed to restore around 90% of the total information. The first axis, which restored 63% of the total information, allowed the separation of strongly-spoiled samples (right part of the Fig. 4) from non-spoiled samples (left part of the Fig. 4). Non-spoiled (upper part) and lightly-spoiled (lower part) but also strongly-spoiled (upper part) and moderately-spoiled (lower part) were discriminated on the second axis (28% of the total information). Control samples after 20 days of storage was located in the area of non-spoiled samples. Several sensory evolution patterns were observed according to the strains. Indeed,

only three bacterial groups were located in strongly-spoiled area: *Bt. thermosphacta*, *St. liquefaciens*-like and *Cb. maltaromaticum*. These three bacteria were considered as the most spoiling micro-organisms with different evolution in their spoilage activity. *Brochothrix thermosphacta* reached the strongly spoiled level since 9 days of storage (63% of the panellists), followed by *St. liquefaciens*-like since 13 days (around 50% of the panellists and confirmed at day 27 by 90%) and *Cb. maltaromaticum* since 16 days (50% of the panellists and confirmed at day 27 by 75%). Other bacterial groups were mainly classified in the non and lightly spoiled level (*Vc. penaei* and *Cb. alterfunditum*-like) or moderately spoiled level (*Cb. divergens*), until the end of storage period and were considered as non spoiling or very weakly spoiling micro-organisms.

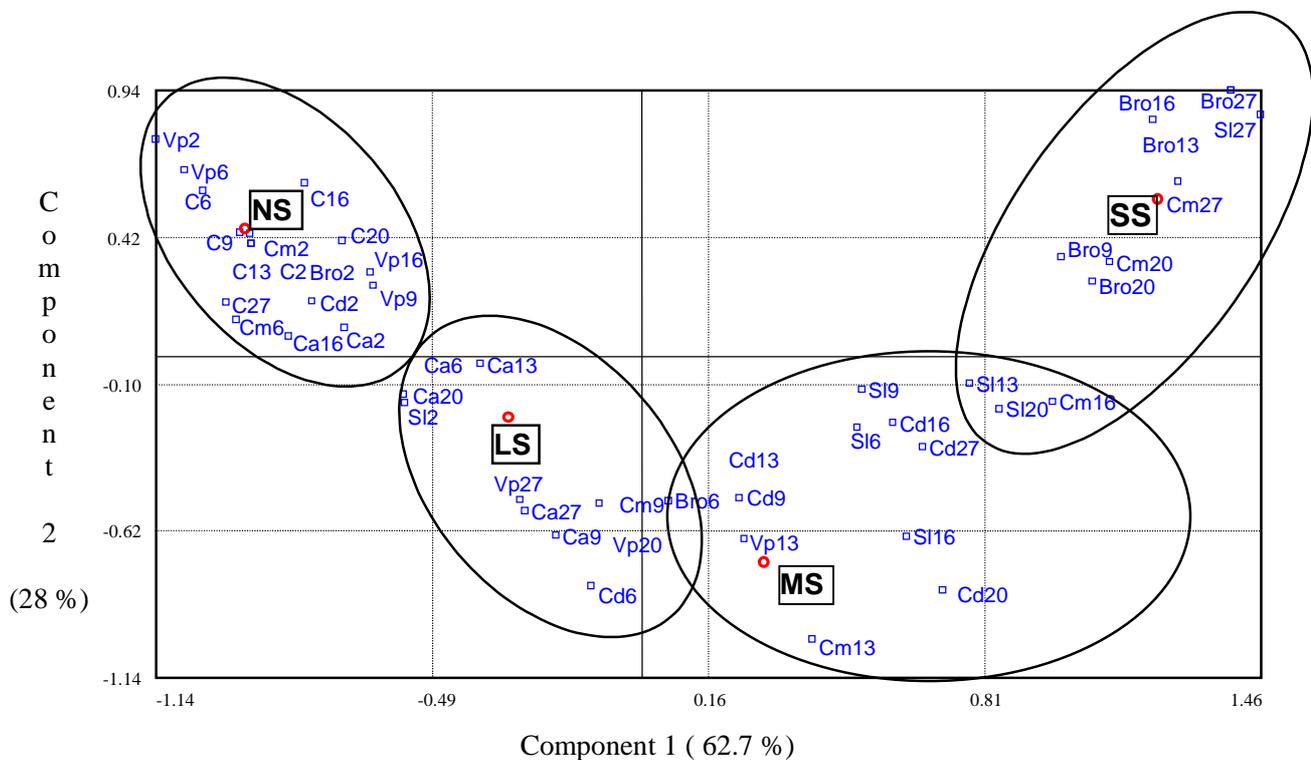


Fig. 4. Simultaneous representation of samples and spoilage levels of inoculated MAP shrimps samples stored at 8°C on plane 1-2 of correspondence factorial analysis (CFA). NS: non-spoiled; LS: lightly spoiled; MS: moderately spoiled; SS: strongly spoiled. Sample nomenclature: C, control samples (non inoculated); Bro, *Brochothrix thermosphacta*; SI, *Serratia liquefaciens*-like; Cm, *Carnobacterium maltaromaticum*; Cd, *Carnobacterium divergens*; Ca, *Carnobacterium alterfunditum*-like; Vp, *Vagococcus penaei*. Number express duration of storage (in days).

The Principal component analysis (PCA) (Fig. 5) performed on the mean scores of profiling tests presents the main odours characteristic for each sample. This figure shows the simultaneous projection of samples and sensory descriptors on the first 1-2 plane. The first axis (56% of the information) is mainly characterized by descriptors such as rice/crustacean on one side, and sour/fermented, cheese/feet, global intensity of odour, amine/urine, cabbage/gas/garlic and floor cloth on the other side. This component can be considered as an axis of spoilage, as it divides odours typical of freshly processed brined and cooked shrimps on the left side and spoiling off-odours on the right side. Milky-boiled odours on the upper part of the graph mainly defined the second component (25% of the information). The characteristic odour of the non spoiled control at day 2 is rice/crustacean. After 27 days the control kept the same odour. The samples inoculated with *Bt. thermosphacta* and *St. liquefaciens*-like strains, kept the rice/crustacean non-spoiled odour until day 2. Then, they exhibited mainly cheese/feet and sour/fermented off-odours for *Bt. thermosphacta*, from day 9 until the end of storage, with a tinge of milky-boiled odour for day 27 and for *St. liquefaciens*-like, cabbage/gas/garlic, amine/urine and floor cloth off-odours, from day 6 until the end of storage. At the day 9, samples inoculated with *Cb. maltaromaticum* strains were similar to the control with rice/crustacean non-spoiled odour. From day 13 until the end, they exhibited the same odour characteristics than *Bt. thermosphacta* but less pronounced (cheese/feet, sour/fermented and milky-boiled off-odours). Interestingly for these samples, a sensory descriptor of butter odour, which was not presented in the selected list, was systematically suggested by panellists until the end of storage. Since day 6, samples with *Cb. divergens* strains exhibited milky-boiled off-odours and then, from day 13 until the end, they revealed sour/fermented and cheese/feet off-odours but less pronounced than *Cb. maltaromaticum* and *Bt. thermosphacta*. The others inoculated shrimps samples, with *Vc. penaei* and *Cb. alterfunditum*-like strains, kept the rice/crustacean non-spoiled odour until the end of storage. Nevertheless, samples with *Vc. penaei* strains exhibited the same butter odour at day 13 and 16 than *Cb. maltaromaticum*. Whole odours characteristic of bacterial groups are summarized in Table 3.

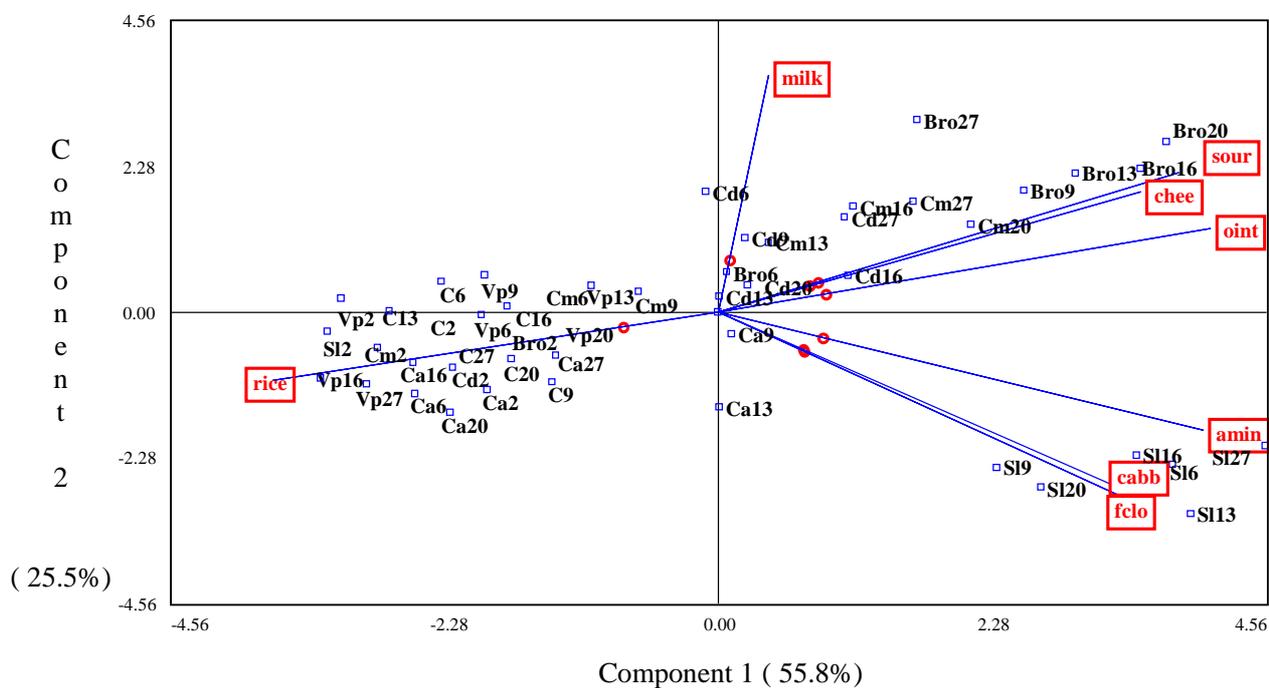


Fig. 5. Simultaneous representation of inoculated shrimps samples and odour descriptors on plane 1-2 of principal component analysis. Sample nomenclature: C, control samples (non inoculated); Bro, *Brochothrix thermosphacta*; SI, *Serratia liquefaciens*-like; Cm, *Carnobacterium maltaromaticum*; Cd, *Carnobacterium divergens*; Ca, *Carnobacterium alterfunditum*-like; Vp, *Vagococcus penaei*. Number express duration of storage (in days) and labels for sensory descriptors are defined in Table 2.

Table 3. Conditions and odours assigned by a 11 members panel to samples of cooked shrimps inoculated with bacterial groups during 27 days of storage at 8°C. Bacterial groups are classified in a decreasing order of spoilage potential.

Bacterial group	Condition	Sensory characteristics
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Spoiled	cheese/feet and sour/fermented
<i>Serratia liquefaciens</i> -like	Spoiled	cabbage/gas/garlic and amine/urine
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Spoiled	cheese/feet, sour/fermented and butter
<i>Carnobacterium divergens</i>	Weakly spoiled	sour/fermented and cheese/feet
<i>Carnobacterium alterfunditum</i> -like	Non spoiled	rice/crustacean
<i>Vagococcus penaei</i> sp. nov.	Non Spoiled	rice/crustacean and butter (day 13, 16)

Volatile compounds

Only bacterial groups which were considered as the most spoiling micro-organisms (i.e. *Brochothrix thermosphacta*, *Serratia liquefaciens*-like and *Carnobacterium maltaromaticum*), were included into the volatile compounds research by SPME/GC-MS analysis. This device allowed to detect and identify approximately fifty compounds for each bacterial groups and control. However, we have kept only the thirty most abundant compounds (Table 4).

Table 4. Volatile compounds identified in inoculated, cooked and peeled tropical shrimp in MAP, after inoculation with bacterial strains groups and storage at 8°C^a

Volatile compound	Non inoculated (control)	<i>Bt.</i> <i>thermosphacta</i>	<i>St.</i> <i>liquefaciens</i>	<i>Cb.</i> <i>maltaromaticum</i>
<i>alcohols</i>				
2-methyl-1-butanol	<5.0	6.7 ± 0.04	5.5 ± 0.06	6.6 ± 0.03
3-methyl-1-butanol	<5.0	5.2 ± 0.14	<5.0	5.0 ± 0.03
1-propanol	<5.0	5.5 ± 0.07	6.4 ± 0.15	<5.0
1-penten-3-ol	5.9 ± 0.03	<5.0	5.0 ± 0.13	5.8 ± 0.07
Cis-2-pentenol	5.1 ± 0.12	<5.0	<5.0	<5.0
2-methyl-1-propanol	<5.0	6.3 ± 0.12	<5.0	<5.0
2-hexanol	<5.0	5.8 ± 0.04	<5.0	<5.0
2-butanol	<5.0	<5.0	6.0 ± 0.3	<5.0
cyclopentanol	<5.0	<5.0	<5.0	5.8 ± 0.01
<i>aldehydes</i>				
Ethanal (acetaldehyde)	<5.0	6.3 ± 0.02	6.4 ± 0.02	6.2 ± 0.02
3-methyl-1-butanal	<5.0	7.4 ± 0.06	<5.0	7.5 ± 0.01
2-methyl-1-butanal	<5.0	6.9 ± 0.18	<5.0	7.0 ± 0.04
pentanal	<5.0	5.6 ± 0.53	5.2 ± 0.22	<5.0
2-methyl-1-propanal	<5.0	6.3 ± 0.13	<5.0	6.3 ± 0.06
<i>ketones</i>				
2,3-butanedione	<5.0	7.1 ± 0.07	6.8 ± 0.06	6.2 ± 0.18
2-propanone	6.0 ± 0.04	6.0 ± 0.04	6.1 ± 0.03	6.1 ± 0.02
3-pentanone	5.2 ± 0.12	<5.0	<5.0	5.2 ± 0.27
3-methyl-2-butanone	<5.0	<5.0	<5.0	6.5 ± 0.07
2,3-heptanedione (acetyl valeryl)	<5.0	5.8 ± 0.09	<5.0	<5.0
<i>hydrocarbons</i>				
benzene methyl	5.1 ± 0.18	<5.0	<5.0	<5.0
2-pentene	6.3 ± 0.04	6.0 ± 0.05	<5.0	6.1 ± 0.08
3-methyl-1-Butene	<5.0	<5.0	<5.0	6.5 ± 0.02
<i>others</i>				
methanethiol	5.7 ± 0.30	6.0 ± 0.01	6.0 ± 0.03	6.1 ± 0.04
ethyl acetate	<5.0	6.3 ± 0.07	6.8 ± 0.08	6.4 ± 0.06
chloroform	5.4 ± 0.11	<5.0	<5.0	<5.0
trimethylamine	<5.0	<5.0	6.1 ± 0.1	<5.0
Thiocarbamide (thiourea)	<5.0	<5.0	<5.0	6.1 ± 0.15

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

Among the most significant compounds, different than those detected for control, *Brochothrix thermosphacta* strains group was found to produce 3-methyl-1-butanal, 2,3-butanedione, 2-methyl-1-butanal, 2-methyl-1-butanol, ethanal, 2-methyl-1-propanal and ethyl acetate. It produced also several compounds which were only detected for this bacterial group such as 2-methyl-1-propanol, 2-hexanol and 2,3-heptanedione. *Serratia liquefaciens*-like strains group produced 2,3-butanedione, ethyl acetate, 1-propanol and ethanal. It produced also trimethylamine and 2-butanol which were not produced by other groups. *Carnobacterium maltaromaticum* strains group produced 3-methyl-1-butanal, 2-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, ethyl acetate, 2-methyl-1-propanal, 2,3-butanedione and ethanal. It produced also 3-methyl-2-butanone, 3-methyl-1-Butene, thiocarbamide and cyclopentanol which were not produced by other groups.

DISCUSSION

The objective of this study was the investigation of spoilage potential of six bacterial species on cooked and peeled shrimps. All species tested were previously isolated from the spoilage microbiota of cooked and peeled tropical shrimps during a previous study (Jaffrès *et al.*, 2008). However, the individual ability of each species to produce sensory changes on this type of product had to be tested, in order to determine which are really involved in the production of volatile compounds and undesirable odours characteristic of spoilage process. In this work, we have chosen to inoculate each bacterial species by a mix of five strains in order to avoid the strain effect, previously described by Joffraud *et al.* (2006) and Stohr *et al.* (2001), where strains belonging to a same species can present heterogeneous spoilage potential when individually tested. Consequently, the sensory changes observed in this study and assigned to each bacterial group, were resulting from the combination of five mixed strains. For *Bt. thermosphacta*, *St. liquefaciens*-like and *Cb. maltaromaticum*, the strongest spoiling bacteria in this work, the inoculated shrimps were rejected just after the exponential stage and at the beginning of the stationary phase of the growth curves (i.e. day 9, 13 and 16, respectively). This compartment was typical of the SSOs described by (Gram and Dalgaard, 2002). In fact, sensory rejection occurs after chemical metabolites amount, produced by bacteria, have reached a certain level following an exponential evolution (Gram and Huss, 1996). Regarding the chemical results, we observed that there was no correlation between TVBN amount and the sensory rejection. Indeed, TVBN amounts produced by *Cb. divergens*, *Cb. alterfunditum*-like and *Vc. penaei*, which were considered as non or very weakly spoiling

bacteria, was higher than those produced by strongest spoiling bacteria, except for *Cb. maltaromaticum*. This result lead to conclude that likely TVBN is not a good indicator for estimation of the sensory spoilage of cooked peeled shrimps like that it was concluded by Joffraud *et al.* (2006) for cold smoked salmon. Concerning TMA production, interestingly, the only bacterial group which exhibited a light production was *St. liquefaciens*-like with approximately 8 mg-N 100 g⁻¹. This production was then confirmed by the SPME/GC-MS analysis where trimethylamine compound was detected only for this species.

In this study, the spoilage potential of *Bt. thermosphacta* strains was revealed by their ability to produce cheese/feet and sour/fermented odours, probably provoked by the volatile compounds releasing. Indeed, several of the chemical compounds detected for this bacterial group were already described to be responsible of characteristic flavours, such as 2,3-heptanedione with butter and cheesy odours (Fenaroli, 2001), 3-methyl-1-butanal with malty and coffee odours (Varlet *et al.*, 2006), 2,3-butanedione with buttery odours (Prost *et al.*, 2004 ; Senger-Emonnot *et al.*, 2006) and 2-methyl-1-butanal with strong burnt odours (Fukami *et al.*, 2002). These results are in accordance with those of Laursen *et al.* (2006), showing that *Bt. thermosphacta* was able to produce notably 2,3-butanedione and 3-methyl-1-butanal, when inoculated on cooked and peeled nordic shrimps, which would take part in the formation of strong butter, buttermilk-like, sour and nauseous off-odours. Strains of *St. liquefaciens*-like displayed a spoilage potential by producing cabbage/gas/garlic, amine/urine and floor cloth off-odours. This sensory profile can be explained by the volatile compounds produced by this bacterial group among which 2,3-butanedione, trimethylamine already known to be responsible of strong fishy and ammonia-like off-odours (Gram and Dalgaard, 2002 ; Jørgensen *et al.*, 2001), ethyl acetate and 2-butanol which were already associated with solvent/pungent and glue-like odours, respectively (Jørgensen *et al.*, 2001). *Serratia liquefaciens* was already involved in the production of trimethylamine when inoculated on cold smoked salmon with urine, curdled milk or vinegar off-odours, it produced also sulphur odours related to garlic, cabbage or mud (Joffraud *et al.*, 2006 ; Stohr *et al.*, 2001). *Carnobacterium maltaromaticum* strains exhibited a spoilage potential with the production of cheese/feet, sour/fermented and butter flavours and they released the volatile compounds 3-methyl-1-butanal, 2-methyl-1-butanal, 2,3-butanedione and ethyl acetate. However, they did not produce 2,3-heptanedione which was related to the butter/cheesy odour (Fenaroli, 2001). This result illustrated the fact that a characteristic odour is not necessary related to one specific chemical metabolite, but could result from the combination of several compounds (Jørgensen *et al.*, 2001 ; Olafsdottir *et al.*, 2000). *Carnobacterium maltaromaticum* was

already described to produce butter-like odour on cold smoked salmon probably due to the 2,3 butanedione and 2,3 pentanedione release (Joffraud *et al.*, 2001).

In conclusion, this study has contributed to improve our knowledge concerning the spoilage mechanisms in cooked shrimps. It shows that three bacterial species were mainly responsible for shrimps samples spoilage (i.e. *Brochothrix thermosphacta*, *Serratia liquefaciens*-like and *Carnobacterium maltaromaticum*) by notably the production of several volatile compounds which were known to originate from different catabolic pathways such as amino acids metabolism with 3-methyl-1-butanal or 2-methyl-1-butanal, glycogen metabolism with 2,3-butanedione or 2,3-heptanedione, sugar fermentation with ethyl acetate and also the anaerobic respiration by certain bacteria which can induce the TMAO reduction in trimethylamine. These compounds can generate individually or by combination, off-odours and flavours characteristic of spoilage process. This study was performed by testing each species group independently of the others. Further investigations will be needed to determine the incidence of the combination between species which could change the overall metabolism, and associations of volatile compounds could modify the perception of odours as previously showed by Laursen *et al.* (2006).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out as part of the IMIBIOMER program, managed by Pôle Agronomique Ouest (PAO) and financially supported by the regions Bretagne and Pays de La Loire. We are grateful to Fabrice Frassetto, technical manager of ENITIAA's technological hall, for welcoming us and for allowing access to the experimental pilot. We thank STAM department members: Sarah Le Glaunec and Frédérique Gigout for the microbiological and chemical analysis. Emmanuel Jaffrès received a Ph.D grant awarded by Ifremer and ENITIAA.

REFERENCES

- Arthur, C.L., Pawliszyn, J. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62, 2145-2148.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C., Gram, L. 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology* 87, 239-250.
- Duflos, G., Coin, V.M., Cornu, M., Antinelli, J.F., Malle, P. 2006. Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 600-611.
- FAO-Globefish/Josupeit, H. 2008. Global Technical and Trade Conference on Shrimp : US and EU Market, Rome, Italy. www.globefish.org
- Fenaroli, G. 2001. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients 4th Edition. Burdock, G. A. ed. CRC Press.
- Fukami, K., Ishiyama, S., Yaguramaki, H., Masuzawa, T., Nabeta, Y., Endo, K., Shimoda, M. 2002. Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5412-5416.
- Gram, L., Dalgaard, P. 2002. Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 262-266.
- Gram, L., Huss, H.H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M. 2002. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 78, 79-97.
- Huss, H.H., Reilly, A., Karim Ben Embarek, P. 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11, 149-156.
- Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prevost, H., Joffraud, J.J., Dousset, X. 2008. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* in press.
- Joffraud, J.J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J.S., Leon, S., Gigout, F., Leroi, F. 2006. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 112, 51-61.

- Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C., Berdague, J.L. 2001. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 66, 175-184.
- Jørgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P. 2001. Significance of volatile compounds produced by spoilage bacteria in vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) analyzed by GC-MS and multivariate regression. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49, 2376-2381.
- Laursen, B.G., Leisner, J.J., Dalgaard, P. 2006. *Carnobacterium* Species: Effect of Metabolic Activity and Interaction with *Brochothrix thermosphacta* on Sensory Characteristics of Modified Atmosphere Packed Shrimp. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54, 3604-3611.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M. 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology* 39, 111-121.
- Mejlholm, O., Boknaes, N., Dalgaard, P. 2005. Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology* 99, 66-76.
- Nicolle, J., Desauziers, V., Mocho, P. 2008. Solid phase microextraction sampling for a rapid and simple on-site evaluation of volatile organic compounds emitted from building materials. *Journal of Chromatography A* 1208, 10-15.
- OFIMER. 2006. Bilan annuel 2006 : Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture. www.ofimer.fr
- Olafsdottir, G., Hognadottir, A., Martinsdottir, E., Jonsdottir, H. 2000. Application of an electronic nose to predict total volatile bases in capelin (*Mallotus villosus*) for fishmeal production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2353-2359.
- Pawliszyn, J. 1997. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice, New York.
- Prost, C., Hallier, A., Cardinal, M., Serot, T., Courcoux, P. 2004. Effect of Storage Time on Raw Sardine (*Sardina pilchardus*) Flavor and Aroma Quality. *Journal of Food Science* 69, 198-204.
- Risticvic, S., Niri, V.H., Vuckovic, D., Pawliszyn, J. 2008. Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* in press.
- Senger-Emonnot, P., Rochard, S., Pellegrin, F., George, G., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelierb, L. 2006. Odour active aroma compounds of sea fig (*Microcosmus sulcatus*). *Food Chemistry* 97, 465-471.

- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., Leroi, F. 2001. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* 34, 797-806.
- Varlet, V., Knockaert, C., Prost, C., Serot, T. 2006. Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3391-3401.

**DISCUSSION GÉNÉRALE
ET CONCLUSION**

Dans le domaine de la qualité et de la sécurité sanitaire des produits de la mer, la nouvelle réglementation européenne ne prend pas en compte les flores d'altération dans les critères d'hygiène des procédés qui permettraient de garantir la qualité de leurs produits. Celles-ci peuvent se développer rapidement sur les produits en provoquant des modifications organoleptiques non désirables et entraîner une diminution non négligeable de leur durée de conservation. Ce constat est particulièrement vrai pour les produits de la mer prêts à être consommés comme les crevettes décortiquées cuites, qui ne subissent pas d'étape ultime de cuisson chez le consommateur. Néanmoins, cette réglementation qui n'est pas figée, prévoit une évolution des critères qu'elle régit. Il est ensuite à la charge des industriels ou de leur interprofession, de définir des critères d'hygiène des procédés pertinents. De plus la connaissance des flores d'altération peut permettre de proposer des technologies adaptées (atmosphère modifiée, biopréservation ...) pour inhiber ces germes ou en atténuer les effets.

Ce travail de thèse répond à ces préoccupations en apportant des connaissances nouvelles sur les bactéries responsables de modifications de la qualité organoleptique des crevettes décortiquées cuites, et sur le potentiel d'altération de ces flores. Dans ce but, nous nous sommes attachés à répondre à plusieurs objectifs :

- 1 – Réaliser un inventaire des espèces bactériennes de la crevette cuite en lien avec leur altération, à l'aide d'outils de microbiologie adaptés.
- 2 – Approfondir dans le cadre de cet inventaire la connaissance taxonomique d'un certain nombre de groupes bactériens avec en particulier la description d'une nouvelle espèce : *Vagococcus penaei*.
- 3 – Etudier le potentiel d'altération des principales espèces bactériennes isolées de la microflore de crevettes décortiquées cuites.

L'étude de la biodiversité d'un écosystème nécessite le développement d'outils adaptés.

Comme nous l'avons abordé dans la revue bibliographique, les microbiologistes disposent à l'heure actuelle d'un large éventail de techniques pour appréhender la diversité d'un écosystème microbien complexe. Les techniques moléculaires constituent des outils performants pour la détection, l'identification et la quantification des micro-organismes impliqués dans les variations de ces écosystèmes. Par ailleurs, la biodiversité microbienne est très souvent sous-estimée lorsque son étude nécessite la culture des bactéries sur des milieux.

Pour remédier à ce biais méthodologique, des techniques dites culture-indépendantes ont été développées (Giraffa et Neviani, 2001).

Dans le chapitre I, nous avons mis en œuvre une approche polyphasique pour étudier la diversité de l'écosystème microbien des crevettes décortiquées cuites. Cette approche combinait à la fois des techniques culture-dépendantes, qui consistaient à suivre le développement de plusieurs flores à l'aide de milieux de culture adaptés et à isoler puis identifier au moyen de tests phénotypiques et moléculaires, des colonies prélevées sur ces milieux. L'approche culture-indépendante a consisté à mettre en œuvre deux techniques, la PCR-TTGE et la DHPLC, qui fournissent des empreintes moléculaires de l'ADN bactérien directement extrait de la matrice crevette en ciblant la région V3 du gène codant l'ARNr-16S. Cette approche nous a permis d'identifier les principaux genres et espèces de bactéries présentes dans la microflore d'altération des crevettes décortiquées cuites. Les bactéries lactiques constituent le groupe bactérien majoritaire avec les principaux genres : *Carnobacterium* (*Cb. maltaromaticum*, *Cb. divergens* et *Cb. alterfunditum*-like), *Vagococcus* (*Vc. fluvialis* et *Vc. penaei* sp .nov) et *Enterococcus* (*Ec. faecalis* et *Ec. faecium*). Deux autres espèces bactériennes importantes étaient retrouvées dans cet écosystème : *Brochothrix thermosphacta* et *Serratia liquefaciens*-like.

Ce type d'approche a déjà été décrit pour l'étude de divers écosystèmes comme celui du fromage Mozzarella (Ercolini *et al.*, 2001b) ou récemment du fromage espagnol Alberquilla (Abriouel *et al.*, 2008). Dans cette dernière étude, une comparaison des résultats obtenus par méthodes culture-dépendantes et indépendantes a montré que ces deux approches fournissaient des résultats complémentaires. En effet, certaines espèces bactériennes étaient exclusivement retrouvées par la TTGE et d'autres étaient identifiées uniquement par l'utilisation des milieux de culture. Des résultats analogues ont été décrits par Ercolini *et al.* (2001b), Miambi *et al.* (2003) et Perez Pulido *et al.* (2005). Nous avons également constaté dans cette étude que des espèces comme *Citrobacter gilleni* ou *Psychrobacter* sp. étaient uniquement identifiées par la TTGE ou la DHPLC, alors que la plupart des espèces du genre *Vagococcus* que nous avons rencontrées étaient retrouvées essentiellement sur les milieux de culture. Selon Abriouel *et al.* (2008), plusieurs paramètres pourraient expliquer ce phénomène : la méthode d'extraction d'ADN, l'amplification PCR ainsi que la nature des milieux de culture utilisés.

En ce qui concerne l'extraction d'ADN bactérien à partir d'une matrice alimentaire, trois étapes clés doivent être optimisées et maîtrisées afin de garantir la robustesse de l'analyse par empreintes moléculaires. Ainsi la première étape de « solubilisation » de la matrice, doit se faire avec une prise d'essai d'échantillon suffisamment importante pour être représentative de l'écosystème étudié et ne doit pas dépasser une certaine quantité qui pourrait conduire à une saturation de la réaction de lyse cellulaire. C'est au cours de cette première étape que la séparation de la fraction bactérienne du reste de la matrice doit être réalisée le plus efficacement possible. Plusieurs protocoles ont été décrits à ce jour dans la littérature et diffèrent selon la nature de la matrice (Godon *et al.*, 1997 ; Ogier *et al.*, 2002 ; Meroth *et al.*, 2003b). Dans le cadre de notre étude, nous avons développé en collaboration avec l'ADRIA de Quimper, un système de broyage de la matrice avec un broyeur mécanique, suivi d'une filtration du broyat sur colonne de gel de silice. Ce type de colonne est à la base conçu pour l'extraction et la purification de l'ADN de cellules végétales. Par conséquent, la filtration du broyat de crevette sur ces colonnes permet de piéger à la fois les cellules eucaryotes issues des débris de la matrice crevette, mais également l'ADN eucaryote qui aurait pu être libéré à la suite du broyage.

La lyse cellulaire des bactéries constitue la deuxième étape importante de l'extraction et doit être suffisamment drastique pour permettre à la fois la lyse des bactéries à Gram positif et négatif. Parayre *et al.* (2007) ont mis au point un système de lyse cellulaire croisée, dont nous nous sommes inspirés. Tout d'abord, une première phase consiste en la lyse enzymatique des bactéries par l'utilisation du lysozyme et de la mutanolysine qui dégradent le peptidoglycane, constituant important de la paroi des bactéries à Gram positif. La deuxième phase est une lyse mécanique réalisée à l'aide de billes de verre agitées à très haute vitesse par un vibro-broyeur qui casse les parois bactériennes.

La troisième et dernière étape clé de l'extraction consiste en la purification de l'ADN extrait. Celle-ci conditionne véritablement la quantité et la qualité des ADN qui sont ensuite utilisés comme matrice pour l'amplification PCR. Elle doit être la plus simple et la plus reproductible possible, sans trop de phases intermédiaires pour éviter les pertes d'ADN. Giacomazzi *et al.* (2005) ont réalisé une étude comparative de plusieurs protocoles d'extraction et de purification d'ADN bactérien issus de la matrice saumon fumé. Les résultats ont démontré qu'un système de purification en kit commercial comme le DNeasy Tissue KitTM commercialisé par la société Qiagen, équipé de colonne de gel de silice pour la purification de l'ADN, était plus efficace et reproductible qu'un protocole classique reposant

sur un principe d'extraction liquide-liquide. De plus, ce système a l'avantage de ne pas utiliser de solvant toxique comme le phénol-chloroforme pour extraire l'ADN.

Une fois le protocole d'extraction optimisé, se pose la question de l'amplification PCR et notamment du choix du gène cible à amplifier. En effet dans notre étude, le choix de la région V3 de l'ADNr 16S comme marqueur de la diversité bactérienne peut être à l'origine de la non détection des espèces du genre *Vagococcus* avec la TTGE. Ce résultat pourrait s'expliquer par le phénomène de co-migration du fragment V3 de ces espèces avec celui des espèces du genre *Enterococcus*, car elles présentent un *Tm* identique.

Nous avons également constaté la présence de bandes multiples en TTGE ou de pics multiples par DHPLC pour certaines espèces comme *Brochothrix thermosphacta*. Ces résultats pourraient être attribués à la présence de plusieurs copies de l'opéron ribosomique. Plusieurs études ont déjà proposé et démontré l'utilisation de gènes cibles alternatifs comme le gène *rpoB* pour s'affranchir de ce type de phénomènes (Dahllof *et al.*, 2000 ; Giacomazzi *et al.*, 2004). En effet, compte tenu que ce gène existe à l'état de copie unique dans le génome des bactéries, il n'est pas à l'origine d'empreintes multiples pour une espèce bactérienne donnée. En outre, Case *et al.* (2007) ont démontré que le gène *rpoB* était capable de discriminer des groupes taxonomiques phylogénétiquement très proches. Ainsi, le choix de ce marqueur aurait pu permettre la différenciation des espèces des genres *Vagococcus* et *Enterococcus* en TTGE. Toutefois, une des limites dans l'utilisation d'autres gènes que l'ADNr 16S réside dans le fait que les banques de données sont nettement moins riches en séquences du gène *rpoB* qu'en séquences de l'ADNr 16S. Or, dans le cas d'un fragment ou d'un pic inconnu, il paraît indispensable de pouvoir identifier l'espèce bactérienne correspondante après clonage et séquençage.

L'optimisation de la réaction de PCR constitue également un point important qui va conditionner la qualité et la résolution des empreintes moléculaires. Par exemple, le système d'amplification du gène cible peut donner lieu à différentes adaptations selon les auteurs. En effet, pour l'amplification de la région V3 de l'ADNr 16S, Ogier *et al.* (2002) ont développé un système de « nested-PCR » ou « PCR nichée » qui consiste à amplifier la région d'intérêt au cours de deux PCR successives. La première étape de PCR permet d'amplifier un fragment d'ADN plus large qui englobe le fragment d'intérêt avec un premier couple d'amorces. La deuxième PCR est réalisée avec les amplicons de la première, en ciblant cette fois-ci spécifiquement le fragment d'intérêt avec un couple d'amorces approprié. L'avantage de cette

technique est de fournir un meilleur rendement d'amplification et également de faciliter l'incorporation du GC-clamp dans les amplicons, car il est ajouté uniquement à l'issue de la seconde PCR. De même, ce système permet de limiter les phénomènes de doubles bandes artéfacts sur les gels. Un des inconvénients majeurs de cette technique concerne le risque de contaminations qui est accentué par les deux étapes de PCR. Pour l'amplification de la même région V3, Ercolini *et al.* (2008) ont préféré avoir recours à un système de « PCR-touchdown » ou « PCR essais » qui se déroule au cours d'une seule étape. Cependant, lors des premiers cycles, la température d'hybridation est relativement élevée comparativement à celle d'une PCR classique (environ 10 °C au dessus de la température d'hybridation des amorces) ce qui favorise la spécificité de l'amplification mais génère un rendement faible d'amplicons. Ensuite, la température est abaissée progressivement à chaque cycle jusqu'à atteindre une température proche de celle d'hybridation des amorces, ce qui va favoriser un bon rendement tout en conservant une bonne spécificité de l'amplification. Un inconvénient de cette technique est que l'efficacité n'est pas constante tout au long de la réaction. Ainsi cette PCR peut donc poser des problèmes pour l'amplification des fragments présents en faible quantité notamment pour les populations bactériennes sous-dominantes d'un écosystème.

Au cours de cette étude, nous avons également fait évoluer notre système d'amplification de la région V3 en fonction des techniques d'empreintes moléculaires utilisées. En effet, dans le cas de la TTGE, nous avons développé en collaboration avec l'ADRIA de Quimper, un système de PCR classique à une seule étape avec 40 cycles d'amplification et une quantité de 2,5 unités de Taq polymérase, pour garantir une efficacité correcte et un bon rendement. Egalement, ce système comportait une étape d'élongation finale de 30 minutes pour prévenir la formation d'artéfacts et de double bandes dans le gel TTGE, comme cela a été décrit par Janse *et al.* (2004). Dans le cas de la DHPLC, nous avons eu recours à un système de « reconditioning-PCR » ou « PCR de re-conditionnement » qui est un système à deux étapes d'amplification en utilisant les mêmes conditions de PCR et le même couple d'amorces pour les deux amplifications successives, mais avec uniquement 5 cycles d'amplification pour la deuxième PCR. Ce système mis au point par Thompson *et al.* (2002) et validé pour la DHPLC par Goldenberg *et al.* (2007) permet de prévenir la formation d'artéfacts et de fragments hétéroduplex qui viendraient fausser l'élution chromatographique des fragments V3.

Une des limites des techniques d'empreintes moléculaires qui pourrait également expliquer le fait qu'une espèce, bien qu'isolée sur milieu de culture ne soit pas détectée par

TTGE ou DHPLC, concerne le seuil de détection des populations bactériennes sous-dominantes dans un écosystème. En effet, plusieurs études ont déjà démontré que ces techniques n'étaient pas capables de détecter une population sous-dominante lorsque celle-ci représentait moins de 1 % en nombre de cellules, par rapport à l'espèce dominante (Muyzer *et al.*, 1993 ; Ogier *et al.*, 2002). A l'inverse au cours de notre travail, nous avons constaté que la TTGE avait permis de détecter *Brochothrix thermosphacta* dès le début du stockage, alors même qu'aucune colonie n'était dénombrée sur le milieu STAA, pourtant sélectif pour le dénombrement des *Brochothrix*. Le même constat a été fait pour deux espèces de *Carnobacterium* (*Cb. divergens* et *Cb. maltaromaticum*) qui étaient détectées par la TTGE alors que sur le milieu sélectif NAP, aucune colonie n'était dénombrable. Des résultats analogues ont été observés par Rachman *et al.* (2004a) sur le saumon fumé.

Une autre limite de ces techniques par rapport aux méthodes culturales, est que celles-ci ne permettent pas de distinguer les bactéries viables des bactéries mortes ou inactives dans un écosystème. En effet, après la mort des bactéries, la vitesse de dégradation de leur ADN dépend d'une part des espèces et d'autre part de l'environnement dans lequel elles se trouvent (Wolffs *et al.*, 2005). Par conséquent, en réalisant une extraction d'ADN bactérien total d'une matrice donnée, il est possible de récolter l'ADN de bactéries non viables qui seront pourtant considérées comme faisant partie intégrante de l'écosystème étudié. Pour augmenter le niveau d'information obtenu avec ces techniques, une alternative serait de s'intéresser à la fraction des ARNs transcrits dans le cadre d'une approche RT-PCR TTGE ou DHPLC, comme cela a été décrit pour les fromages (Randazzo *et al.*, 2002 ; Le Bourhis *et al.*, 2007).

Une des difficultés de l'analyse par empreintes moléculaires concerne l'interprétation des données sur la composition d'un écosystème microbien, particulièrement lorsqu'on travaille uniquement avec une approche culture-indépendante. En effet dans cette étude, l'assignation des bandes des profils TTGE était d'autant plus aisée que l'on connaissait, grâce aux données obtenues par les milieux de culture, une partie des genres et espèces bactériens qui composaient l'écosystème microbien de la crevette cuite. C'est la raison pour laquelle, des bases de données de profils TTGE ou DGGE ont été développées ces dernières années et sont dédiées à l'étude spécifique de certains écosystèmes microbiens comme les produits laitiers (Ogier *et al.*, 2002 ; Ogier *et al.*, 2004 ; Parayre *et al.*, 2007), ou encore le raisin (Doare-Lebrun *et al.*, 2006). Le principe pour constituer de telles bases de données, consiste à collecter des profils électrophorétiques obtenus dans des conditions standardisées

correspondant à différentes espèces représentatives d'un écosystème donné. Ces profils sont ensuite numérisés et normalisés à l'aide d'un logiciel de traitement et d'intégration d'images comme le logiciel BionumericsTM. Les profils de migration des souches ainsi obtenus seront stockés dans une base de données informatisée. En confrontant ensuite les profils TTGE obtenus pour un écosystème inconnu, avec ceux de la base de donnée, le logiciel va pouvoir rechercher des assignations possibles et donc délivrer une identification présomptive des espèces bactériennes correspondantes.

Dans le cadre du programme IMIBIOMER, nous avons été amenés à développer une base de données de profils TTGE dédiée à l'analyse des écosystèmes microbiens des produits de la mer. Actuellement celle-ci contient 150 profils de migration de la région V3 de l'ADNr 16S correspondant à environ 50 taxons bactériens différents, représentatifs de la microflore des produits de la mer. Cette base de données, initiée postérieurement à l'étude de l'écosystème microbien des crevettes décortiquées cuites, n'a donc pas été utilisée pour le traitement des gels TTGE correspondants. Néanmoins, nous avons pu évaluer son efficacité sur des profils TTGE de différents produits de la mer provenant des industriels partenaires du programme IMIBIOMER. Celle-ci n'est pas définitive et doit être l'objet d'un enrichissement en fonction des flores identifiées dans les produits de la mer.

L'ensemble de cette première partie du travail de thèse nous a permis de démontrer et de confirmer l'efficacité des techniques d'empreintes moléculaires pour étudier l'écosystème microbien complexe de la crevette décortiquée cuite. Cependant, au regard des avantages et inconvénients des deux approches culture-dépendantes et indépendantes, il apparaît indispensable lorsqu'on initie ce type de travail d'avoir recours aux deux approches simultanément, pour permettre un inventaire le plus complet possible des flores présentes dans cet écosystème. En effet, sans l'appui des milieux de culture, nous n'aurions sans aucun doute pas identifié la nouvelle espèce *Vagococcus penaei* décrite dans ce document. Néanmoins, quand l'écosystème microbien d'un aliment est connu, il peut être intéressant d'utiliser ces méthodes moléculaires seules pour obtenir une image rapide de la dynamique de l'évolution des flores.

Approfondir dans le cadre de cet inventaire la connaissance taxonomique d'un certain nombre de groupes bactériens avec en particulier la description d'une nouvelle espèce : *Vagococcus penaei*.

L'étude de taxonomie polyphasique mise en œuvre pour décrire la souche *Vagococcus penaei* CD276^T, représentative d'un groupe de cinq souches isolées de crevettes décortiquées cuites, a permis de confirmer l'existence d'une nouvelle espèce au sein du genre *Vagococcus*.

Les techniques de taxonomie polyphasique, qui englobent les analyses phénotypiques, phylogénétiques et génétiques pour caractériser les isolats bactériens, conduisent à des résultats qui permettent une classification dite « consensus » des bactéries (Vandamme *et al.*, 1996). Cependant, dès lors que l'on aborde les problèmes d'écologie microbienne et de taxonomie, la question de la définition de l'espèce se pose inévitablement. Cette vaste question, sujette à controverses, préoccupe les biologistes et les microbiologistes depuis qu'existe la volonté de réaliser une classification du vivant. En microbiologie, l'espèce constitue l'unité de base ou le maillon essentiel de la classification bactérienne (Wayne *et al.*, 1987 ; Euzéby, 2007). Les deux critères importants pour la définition d'une espèce biologique sont ceux de la ressemblance mutuelle et de l'interfécondité. Or, en microbiologie le critère d'interfécondité est inapplicable, la reproduction des procaryotes étant végétative et asexuée, les bactériologistes ont dû élaborer une définition originale de l'espèce. Ainsi, le critère de ressemblance mutuelle est l'unique critère qui ait été appliqué en classification bactérienne pendant de nombreuses années (Le Guyader, 2002).

La définition de l'espèce diffère selon les critères retenus pour apprécier la similitude des souches (caractères phénotypiques, génétiques et phylogénétiques...), ce qui a conduit à constituer des comités internationaux chargés de définir des critères et de proposer une définition de l'espèce. En 1987 et 2002, les comités *ad hoc* en systématique (International Committee on Systematic Bacteriology et International Committee on Systematics of Prokaryotes, respectivement) ont permis de proposer une définition de l'espèce bactérienne basée sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de l'ADN génomique, on parle donc dans ce cas de genomospecies (Wayne *et al.*, 1987 ; Stackebrandt *et al.*, 2002). Ces comités ont considéré les résultats de nombreuses études menées avec des espèces bien définies (plus de 10 000 souches appartenant à environ 2 000 espèces différentes réparties dans plusieurs centaines de genres), et il a été déclaré que des valeurs d'hybridation ADN-

ADN supérieures ou égales à 70 % et des valeurs de ΔT_m (différence de T_m entre l'hybride homologue et l'hybride hétérologue) inférieures ou égales à 5 °C constituaient des bornes raisonnables pour la définition de l'espèce microbienne. Les espèces répondant à ces critères génotypiques partagent également de nombreuses similitudes phénotypiques. En l'absence de meilleurs critères, cette délimitation permet de structurer le monde procaryotique d'une manière cohérente au niveau de l'espèce (Euzéby, 2007). Des études ultérieures ont mis en évidence que des similitudes d'ADNr 16S inférieures à 97 % ne correspondaient jamais à des pourcentages de réassociation ADN-ADN supérieurs à 60 % (Stackebrandt et Goebel, 1994 ; Rossello-Mora et Amann, 2001). Plus récemment, Stackebrandt and Ebers (2006) ont montré que des similarités de séquences de l'ADNr 16S comprises entre 98,6 et 99 % constituaient le seuil minimum pour que l'on puisse prétendre que des isolats appartiennent à la même espèce. Toutefois, seul le résultat de l'hybridation ADN-ADN permet de trancher définitivement sur l'appartenance ou non à la même espèce.

L'acceptation largement diffusée de ces standards de classification, a contribué à harmoniser le niveau taxonomique de l'espèce entre groupes de micro-organismes éloignés (Brisse, 2008). Cependant, l'analyse de nombreuses souches révèle l'existence d'une diversité génétique parfois considérable au sein des espèces ainsi définies. A titre d'exemple, Chaillou *et al.* (2008) ont montré par des analyses d'électrophorèse en champ-pulsé, que des souches de *Lactobacillus sakei* isolées de divers écosystèmes alimentaires (essentiellement poisson et viande) présentaient des variations de la taille de leur génome pouvant aller jusqu'à 25 % de différence par rapport à la taille moyenne du génome de cette espèce (2020 kb), avec des tailles comprises entre 1815 kb et 2310 kb. De plus, les souches d'une même espèce bactérienne peuvent diverger considérablement par leurs propriétés biologiques comme la virulence ou leurs propriétés métaboliques. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué dans les précédents chapitres, Stohr *et al.* (2001) ont démontré que des souches appartenant à une même espèce bactérienne pouvaient présenter des potentiels d'altération différents lorsqu'elles étaient inoculées sur du saumon fumé. Un autre exemple, concerne l'espèce *Escherichia coli*, qui comprend à la fois des souches commensales dont certaines sont utilisées comme probiotiques, mais également de nombreuses souches pathogènes comme les souches entérohémorragiques et entérotoxigéniques (Möndel *et al.*, 2008).

Une première hypothèse permettant d'expliquer cette variabilité intra-spécifique concerne l'impact des facteurs environnementaux sur l'évolution des bactéries et leur

adaptation à un écosystème donné, à travers l'induction de mutations ponctuelles dans leur génome (Tenailon *et al.*, 2001). En effet, plusieurs études ont démontré que des souches de l'espèce *Escherichia coli*, isolées de diverses niches écologiques naturelles, présentaient des taux de mutation 100 fois plus élevés que ceux de souches de référence issues de collections, dont le taux de mutation moyen est évalué à environ 5×10^{-10} mutations par paires de base générées au moment de la réplication (Drake, 1991). Ce phénomène serait en partie dû à l'inactivation chez ces souches sauvages du système de réparation de l'ADN post-réplication MMR (Methyl-directed Mismatch Repair system), qui corrige les erreurs des mauvaises paires de base incorporées dans l'ADN.

Une autre hypothèse expliquant la variabilité intra-spécifique concerne le phénomène des transferts horizontaux de matériel génétique entre les bactéries. En effet, les micro-organismes se reproduisent majoritairement par division cellulaire binaire. Ce mode de transfert dit « vertical » peut également être accompagné de l'acquisition de nouveaux gènes (insertion) ou de remplacement par recombinaison homologue, à des fréquences diverses, de portions de gènes par transfert horizontal entre lignées distinctes (Lan et Reeves, 1996). Les donneurs dans ces échanges de matériel génétique sont le plus souvent des souches proches appartenant à la même espèce, mais peuvent également être des espèces distinctes appartenant à des groupes phylogénétiquement distants, la barrière interspécifique peut donc ne pas être un frein (Jain *et al.*, 2002).

Le taux de recombinaison homologue a des répercussions directes sur l'efficacité des techniques de typage et d'identification des espèces bactériennes. En effet, l'étude phylogénétique des espèces n'a de sens que si la recombinaison est relativement rare, il en est de même pour la validité d'un marqueur phylogénétique (Brisse, 2008). Par exemple, *Listeria monocytogenes* est l'une des espèces dont les souches sont considérées comme les moins exposées aux recombinaisons homologues (Ragon *et al.*, 2008). Les phylogénies obtenues indépendamment à partir de la séquence de différents gènes étant congruentes, un seul marqueur pourra donc suffire pour identifier des souches de cette espèce. Pour les espèces « recombinogènes », le transfert fréquent des marqueurs entre lignées signifie que chaque portion du chromosome d'une souche a une histoire évolutive distincte, il n'existe donc pas de phylogénie possible pour distinguer les souches entre elles (Brisse, 2008). Dans le cas intermédiaire, l'utilisation simultanée de plusieurs gènes permet de modérer les effets éventuels des transferts horizontaux d'un ou de quelques gènes qui en étant utilisés seuls, engendreraient une position phylogénétique erronée des souches de l'espèce étudiée.

Ce type d'approche utilisant plusieurs gènes a été développée à travers la méthode MLST (Multi Locus Sequence Typing). Cette technique a été mise au point par Maiden *et al.* (1998) pour l'étude de la variabilité phylogénétique des souches appartenant à *Neisseria meningitidis*. Elle est basée sur le séquençage de fragments de plusieurs gènes de ménages ou informationnels, ubiquistes pour une population bactérienne donnée, codant des protéines impliquées dans des fonctions essentielles comme la transcription et la traduction (Cooper et Feil, 2004). Cette technique s'est considérablement développée pour le typage des souches et espèces bactériennes issues de diverses niches écologiques. Parmi l'ensemble des études publiées sur le sujet, citons ceux de Bilhere *et al.* (2008) dont les travaux ont permis de mettre en évidence deux sous-populations au sein de l'espèce *Oenococcus oeni*, ainsi que ceux de Goarant *et al.* (2006) qui ont permis de déterminer également plusieurs sous-populations au sein de l'espèce *Vibrio nigripulchritudo*, pathogène des crevettes d'aquaculture, dont l'une d'elles était spécifiquement associée au syndrome de « mortalité estivale » des crevettes.

Une des difficultés de la technique MLST repose sur le choix et le nombre de gènes à séquencer pour permettre une analyse phylogénétique robuste, qui s'affranchisse au mieux de la variabilité intra-spécifique. D'après le comité *ad hoc* pour la re-évaluation de la définition d'espèce bactérienne (Stackebrandt *et al.*, 2002), un minimum de cinq gènes est nécessaire pour l'étude par MLST des relations inter et intra-spécifiques. Ces gènes doivent être situés aux niveaux de loci chromosomiques différents. Cependant, Cooper and Feil (2004) considèrent que le nombre de gènes à prendre en compte dépend de la longueur séquencée de chaque gène et du degré de variabilité génétique des souches bactériennes à caractériser. Bien que cette technique soit considérée par le comité *ad hoc* comme très prometteuse pour élucider les relations inter et intra-spécifiques des bactéries, il confirme néanmoins les recommandations des précédents comités qui établissaient comme méthode de référence, l'hybridation ADN-ADN pour la délimitation du niveau de l'espèce, et qui recommandait l'utilisation combinée de l'analyse phylogénétique du gène codant l'ARNr 16S et de l'analyse du phénotype pour la description des nouvelles espèces.

C'est également grâce à une telle approche polyphasique que nous avons réussi dernièrement à élucider la taxonomie d'un autre groupe bactérien, *Carnobacterium alterfunditum*-like, isolé des crevettes décortiquées cuites (voir chapitre I). Ce groupe comportait cinq souches dont l'identification n'avait pu être réalisée précisément au niveau de l'espèce, car leur séquence du gène codant l'ARNr 16S présentait une similarité identique

(environ 98 %) pour les deux espèces *Cb. alterfunditum* et *Cb. pleistocenium*. Cette valeur étant en dessous du seuil minimum de 98,6 % de similarité recommandé par Stackebrandt et Ebers (2006) pour l'appartenance à une espèce, nous présumons donc l'existence, au sein de ce groupe, de souches appartenant à une nouvelle espèce. L'analyse par hybridation ADN-ADN réalisée récemment avec plusieurs souches de référence du genre *Carnobacterium* nous a permis d'identifier l'une de ces souches comme appartenant à l'espèce *Carnobacterium inhibens*, et de confirmer que les quatre autres souches pouvaient correspondre effectivement à une nouvelle espèce du genre *Carnobacterium*. Un travail complémentaire d'analyse phénotypique, en définissant des critères pertinents pour la description des espèces du genre *Carnobacterium*, devra être réalisé prochainement pour confirmer ces résultats.

Etudier le potentiel d'altération des principales espèces bactériennes isolées de la microflore de crevettes décortiquées cuites.

Pour déterminer si un groupe d'isolats appartient à la catégorie des organismes spécifiques d'altération, il est nécessaire d'évaluer leur potentiel altérant qui peut être défini qualitativement comme la capacité à produire des mauvaises odeurs lorsqu'ils se développent sur une matrice alimentaire, par la capacité à produire en quantité suffisante des métabolites liés à cette altération (Gram et Dalgaard, 2002). Le potentiel d'altération des principales espèces bactériennes isolées de la crevette décortiquée cuite a été étudié par analyse sensorielle et par la recherche des composés volatils. Trois espèces bactériennes se sont révélées être les plus altérantes pour la crevette cuite : *Bt. thermosphacta*, *St. liquefaciens*-like et *Cb. maltaromaticum*. Celles-ci ont été notamment capables de produire des composés volatils issus de différentes voies cataboliques comme celles des acides aminés, des sucres ou encore la respiration anaérobie. En effet, les micro-organismes peuvent cataboliser une grande diversité de molécules, transformées en intermédiaires métaboliques qui entrent dans un grand cycle de production d'énergie comme celui des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs.

Le catabolisme des protéines aboutit aux acides aminés. Ceux-ci sont utilisés par les bactéries et sont à l'origine de la production de nombreux composés volatils odorants. En effet, les acides aminés sont soit décarboxylés en amines, soit catabolisés en molécules aromatiques comme les méthyl-aldéhydes, les méthyl-alcools et les méthyl-acides (Larrouture-Thiveyrat, 2001). Par exemple, la leucine est dégradée en 3-méthyl butanal et en 3-méthyl butanol, que nous avons retrouvés dans les composés volatils produits par les

bactéries d'altération de la crevette. De manière analogue (Larrouture-Thiveyrat *et al.*, 2003) ont mis en évidence chez la souche *Carnobacterium piscicola* 545 une forte production de 3-méthyl butanal issue du catabolisme de la leucine dans le saucisson sec.

Quant aux glucides, ils sont présents en très faible quantité dans les crevettes (0,4 %) mais dans certains cas, les industriels ajoutent des sucres dans la saumure de refroidissement après cuisson. Ceux-ci peuvent alors être métabolisés par les voies homofermentaires ou hétérofermentaires en fonction de la nature et de la quantité de sucres présents et de la flore microbienne. Par la voie homofermentaire, les *Brochothrix* fermentent les glucides en les transformant principalement en acide lactique. Les bactéries lactiques hétérofermentaires comme les *Leuconostoc* et certains *Lactobacillus*, ou faiblement hétérofermentaires comme les *Carnobacterium* sont capables de métaboliser l'acide pyruvique en 2,3-butanedione (diacétyl) et 3-hydroxy-2-butanone (acétoïne), composés volatils responsables de saveurs de type beurre. Enfin la voie de fermentation des acides mixtes, caractéristiques des entérobactéries, génère de l'acide lactique, acétique, formique, de l'éthanol, de la 2,3-butanedione, et de la 3-hydroxy-2-butanone.

Une propriété très particulière de certaines bactéries est leur capacité à générer de l'énergie en condition anaérobie par l'utilisation d'accepteurs d'électrons alternatifs à l'oxygène. Cette adaptation au niveau respiratoire leur permet de coloniser de nombreuses niches écologiques mais nécessite une expression hiérarchisée de leurs systèmes respiratoires (Gon *et al.*, 2002). L'OTMA, dont la concentration varie en fonction des produits de la mer, permet la respiration anaérobie de certains micro-organismes comme *Shewanella*, *Photobacterium*, *Aeromonas* (Gram et Dalgaard, 2002) et *Serratia* comme nous l'avons vu au cours de cette étude. Il est alors réduit en triméthylamine, molécule très malodorante qui donne cette odeur aminée typique du poisson pourri (Gram et Huss, 1996).

Et pour conclure ...

L'intégralité de ce travail de thèse nous a permis d'approfondir les connaissances relatives à la microbiologie des produits de la mer et particulièrement des crevettes tropicales cuites qui avait fait l'objet de peu d'études antérieurement. Avec la mise en œuvre et le développement d'outils de biologie moléculaire comme la TTGE et la DHPLC, mais également avec l'appui

des méthodes culturales, nous avons pu mettre en évidence les principaux genres et espèces de bactéries qui composent l'écosystème de la crevette cuite au moment de l'altération. Celui-ci se compose dans notre étude d'une majorité de bactéries lactiques des genres *Carnobacterium*, *Vagococcus* et *Enterococcus*, mais aussi des espèces *Brochothrix thermosphacta* et *Serratia liquefaciens-like*. De plus, les études de taxonomie polyphasique ont permis d'approfondir l'identification et la classification de deux genres bactériens *Vagococcus* et *Carnobacterium*, et de découvrir deux nouvelles espèces au sein de cet écosystème. L'une des nouvelles espèces identifiées porte désormais « la marque » de la crevette tropicale de par son épithète d'espèce et s'appelle *Vagococcus penaei*.

En mettant en évidence dans ce travail que *Brochothrix thermosphacta*, *Serratia liquefaciens-like* et *Carnobacterium maltaromaticum* étaient les trois espèces les plus altérantes, nous avons, dans le cadre du nouveau contexte réglementaire européen, apporté des connaissances concernant les critères d'hygiène des procédés. De toute évidence, avant que ces trois espèces bactériennes puissent intégrer la réglementation en tant que critères, des essais complémentaires devront être réalisés pour confirmer les résultats obtenus dans ce travail. Par ailleurs, pour déterminer le rôle réel de ces trois espèces dans l'altération, il sera utile d'étudier d'éventuelles interactions entre ces espèces et d'autres espèces comme cela a déjà été décrit dans quelques études précédentes.

Au terme de ce travail, plusieurs perspectives pourraient être envisagées pour une meilleure maîtrise de la qualité de cette denrée :

Après avoir confirmé la nature des espèces bactériennes impliquées dans l'altération de la crevette, il serait utile de quantifier spécifiquement et rapidement ces bactéries. La mise au point d'une technique de PCR quantitative en temps réel permettrait de répondre à cette question. Dans le cadre de cette thèse, un travail préliminaire a déjà été initié pour la quantification de *Brochothrix thermosphacta* et a permis de dessiner des amorces spécifiques. Il reste à déterminer la sensibilité et l'efficacité de la technique.

Des travaux pourraient être envisagés pour modéliser la croissance des bactéries spécifiques d'altération en fonction des paramètres environnementaux (température, atmosphère, pH, ...) dans le cadre d'une approche de microbiologie prévisionnelle.

Des travaux pourraient être entrepris pour élucider certains mécanismes impliqués dans le processus d'altération par les bactéries. Il s'agirait alors d'identifier certaines enzymes importantes et éventuellement de rechercher les gènes à l'origine de la production de certains composés volatils.

Enfin, une autre perspective est la maîtrise du développement des flores d'altération par des technologies « barrières » comme la biopréservation qui utilise des bactéries lactiques inhibitrices.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

A3C (2006). Guide de bonnes pratiques, d'hygiène et d'application des principes HACCP à la cuisson de crustacés.

Abriouel, H., Ben Omar, N., Lopez, R. L., Martinez-Canamero, M., Keleke, S. and Galvez, A. (2006). Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods *poto poto* and *degue* by using three different DNA extraction methods. *International Journal of Food Microbiology* **111**, 228-233.

Abriouel, H., Martin-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E. and Martinez-Bueno, M. (2008). Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **127**, 200-208.

Al-Ahmad, A., Pelz, K., Schirrmeister, J. F., Hellwig, E. and Pukall, R. (2008). Characterization of the first oral *Vagococcus* isolate from a root-filled tooth with periradicular lesions. *Current Microbiology* **57**, 235-238.

Al-Harbi, A. H. (2003). Bacterial flora of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), cultured in concrete tanks in Saudi Arabia. *Journal of Applied Aquaculture* **14**, 113-124

Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* **59**, 143-169.

Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E. and Chevallier, I. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food microbiology* **22**, 373-382.

Anthoni, U., Borresen, T., Christophersen, C., Gram, L. and Nielsen, P. H. (1990). Is trimethylamine oxide a reliable indicator for the marine origin of fishes? Comparative biochemistry and physiology - part B: *Comparative Biochemistry* **97**, 569-571.

Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A. and Clementi, F. (2007). The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **120**, 136-145.

Azarani, A. and Hecker, K. H. (2001). RNA analysis by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. *Nucleic acids research* **29**, 2-9.

-B-

Barakat, R. K., Griffiths, M. W. and Harris, L. J. (2000). Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 83-94.

- Barlaan, E. A., Sugimori, M., Furukawa, S. and Takeuchi, K.** (2005). Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* **61**, 399-412.
- Benner, R. A., Jr., Staruszkiewicz, W. F. and Otwell, W. S.** (2004). Putrescine, cadaverine, and indole production by bacteria isolated from wild and aquacultured penaeid shrimp stored at 0, 12, 24, and 36 degrees C. *Journal of Food Protection* **67**, 124-133.
- Bilhère, E., Lucas, P. M., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (2008). Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Applied and Environmental Microbiology* in press.
- Biollo, G. A., Reinheimer, J. A. and Vinderola, C. G.** (2001). Enterococci vs. nonlactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiology* **18**, 597-604.
- Bohaychuk, V. M. and Greer, G. G.** (2003). Bacteriology and storage life of moisture-enhanced pork. *Journal of Food Protection* **66**, 293-299.
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L. and Blixt, Y.** (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 103-120.
- Brillet, A., Pilet, M. F., Prévost, H., Cardinal, M. and Leroi, F.** (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **104**, 309-24.
- Brisse, S.** (2008). L'espèce microbienne : nécessaire mais pas suffisante. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* **23**, 164-174.
- Brooks, J. C., Alvarado, M., Stephens, T. P., Kellermeier, J. D., Tittor, A. W., Miller, M. F. and Brashears, M. M.** (2008). Spoilage and safety characteristics of ground beef packaged in traditional and modified atmosphere packages. *Journal of Food Protection* **71**, 293-301.
- Burdychova, R. and Komprda, T.** (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters* **276**, 149-155.
- Busse, H. J., Denner, E. B. M. and Lubitz, W.** (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* **47**, 3-38.
- C-**
- Cai, J. and Collins, M. D.** (1994). Evidence for a close phylogenetic relationship between *Melissococcus pluton*, the causative agent of European foulbrood disease, and the genus *Enterococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 365-367.

- Cailliez-Grimal, C., Miguindou-Mabiala, R., Leseine, M., Revol-Junelles, A. M. and Milliere, J. B.** (2005). Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from French soft cheeses. *FEMS Microbiology Letters* **250**, 163-169.
- Cambon-Bonavita, M. A., Lesongeur, F., Menoux, S., Lebourg, A. and Barbier, G.** (2001). Microbial diversity in smoked salmon examined by a culture-independent molecular approach--a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* **70**, 179-187.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllorf, I., Holmstrom, C., Doolittle, W. F. and Kjelleberg, S.** (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 278-288.
- Chaillou, S., Daty, M., Baraige, F., Dudez, A. M., Anglade, P., Jones, R., Alpert, C. A., Champomier-Verges, M. C. and Zagorec, M.** (2008). Intra-species genomic diversity and natural population structure of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology* in press.
- Chinivasagam, H. N., Bremner, H. A., Wood, A. F. and Nottingham, S. M.** (1998). Volatile components associated with bacterial spoilage of tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology* **42**, 45-55.
- Cocolin, L., Diez, A., Urso, R., Rantsiou, K., Comi, G., Bergmaier, I. and Beimfohr, C.** (2007). Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **120**, 100-109.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M. and Comi, G.** (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology* **90**, 83-91.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G.** (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5113-5121.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C. and Comi, G.** (2004). Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 1883-1894.
- Coenye, T. and Vandamme, P.** (2003). Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiology Letters* **228**, 45-49.
- Collins-Thompson, D. L., Sorhaug, T., Witter, L. D. and Ordal, Z. J.** (1972). Taxonomic consideration of *Microbacterium lacticum*, *Microbacterium flavum* and *Microbacterium thermosphactum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **22**, 65-72.
- Collins, M. D., Ash, C., Farrow, J. A., Wallbanks, S. and Williams, A. M.** (1989). 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *Journal of Applied Bacteriology* **67**, 453-460.

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

Connil, N., Plissoneau, L., Onno, B., Pilet, M. F., Prevost, H. and Dousset, X. (2002a). Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. *Journal of Food Protection* **65**, 333-338.

Connil, N., Prevost, H. and Dousset, X. (2002b). Production of biogenic amines and divercin V41 in cold smoked salmon inoculated with *Carnobacterium divergens* V41, and specific detection of this strain by multiplex-PCR. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 611-617.

Cooper, J. E. and Feil, E. J. (2004). Multilocus sequence typing-what is resolved? *Trends in Microbiology* **12**, 373-377.

Coton, M., Coton, E., Lucas, P. and Lonvaud, A. (2004). Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiology* **21**, 125-130.

Couvert, P., Poirier, K., Carrie, A., Chalas, C., Jouannet, P., Beldjord, C., Bienvenu, T., Chelly, J. and Kerjean, A. (2003). DHPLC-based method for DNA methylation analysis of differential methylated regions from imprinted genes. *BioTechniques* **34**, 356-362.

-D-

Dahllof, I., Baillie, H. and Kjelleberg, S. (2000). *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3376-3380.

Dainty, R. H. and Mackey, B. M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* **73**, 103S-114S.

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

Dalgaard, P. (1995b). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* **26**, 319-333.

Dalgaard, P., Gram, L. and Huss, H. H. (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* **19**, 283-294.

- Dalgaard, P. and Jørgensen, L. V.** (2000). Cooked and brined shrimps packed in a modified atmosphere have a shelf-life of >7 months at 0°C, but spoil in 4–6 days at 25°C. *International Journal of Food Science and Technology* **35**, 431- 442.
- Dalgaard, P., Madsen, H. L., Samieian, N. and Emborg, J.** (2006). Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*)-effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 80-95.
- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P. and Leisner, J. J.** (2003). Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 80-89.
- Danish-National-Food-Institut** (2006). Danish Food Composition Databank. <http://www.foodcomp.dk>.
- Dauga, C., Doré, J. and Sghir, A.** (2005). La diversité insoupçonnée du monde microbien. *Médecine/Sciences* **21**, 290-296.
- Davidson, C. M. and Cronin, F.** (1973). Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Applied Microbiology* **26**, 439-440.
- Del Rio, E., Alonso-Calleja, C. and Capita, R.** (2005). Effectiveness of trisodium phosphate treatment against pathogenic and spoilage bacteria on poultry during refrigerated storage. *Journal of Food Protection* **68**, 866-869.
- DeLisle, S. and Perl, T. M.** (2003). Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest* **123**, 504S-518S.
- Devriese, L. A., Baele, M. and Butaye, P.** (2006). The genus *Enterococcus*. In: The Prokaryotes. Springer (Eds), 163-164.
- Devriese, L. A., Pot, B. and Collins, M. D.** (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 399-408.
- Diaz-Ruiz, G. and Wachter-Rodarte, C.** (2003). Methods for the study of microbial communities in fermented foods. *Revista Latino-Americana de Microbiología* **45**, 30-40.
- Diez, A. M., Urso, R., Rantsiou, K., Jaime, I., Rovira, J. and Cocolin, L.** (2008). Spoilage of blood sausages morcilla de Burgos treated with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **123**, 246-253.
- Doare-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guerin, L., Pernelle, J. J., Ogier, J. C. and Bouix, M.** (2006). Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis - potentialities and limits of the method. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 1340-1350.

Domann, E., Hong, G., Imirzalioglu, C., Turschner, S., Kuhle, J., Watzel, C., Hain, T., Hossain, H. and Chakraborty, T. (2003). Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *Journal of clinical microbiology* **41**, 5500-5510.

Dore, I. and Frimodt, C. (1987). An illustrated guide to shrimp of the world. Osprey Books.

Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**, 7160-7164.

-E-

Edima, H. C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A. M., Rondags, E. and Millière, JB. (2008). Short communication: impact of pH and temperature on the acidifying activity of *Carnobacterium maltaromaticum*. *Journal of Dairy Science* **91**, 3806-13.

El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. and Ogier, J. C. (2007). Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1248-1255.

El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. and Ogier, J. C. (2008). Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* **121**, 295-301.

Emborg, J., Laursen, B. G. and Dalgaard, P. (2005). Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C-effect of vacuum and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **101**, 263-279.

Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* **56**, 297-314.

Ercolini, D., Frisso, G., Mauriello, G., Salvatore, F. and Coppola, S. (2008). Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology* **124**, 164-170.

Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G. and Coppola, S. (2004). PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 263-270.

Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. and Coppola, S. (2001a). Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current microbiology* **42**, 199-202.

Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. and Coppola, S. (2001b). The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 610-617.

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P. and Villani, F. (2006). Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 4663-4671.

Euzéby, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International journal of systematic bacteriology* **47**, 590-592.

Euzéby, J. P. (2007). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/>.

-F-

FAO-CIHEAM/Lem, A. (2007). Conference Proceedings. Seafood production and international trade: Global trends.FAO-CIHEAM Course. Zaragoza, Spain.

FAO-Globefish/Boisset, K. (2008a). Shrimp Market Report - February 2008 - Europe. <http://www.globefish.org/>.

FAO-Globefish/Boisset, K. (2008b). Shrimp Market Report - July 2008 - Europe. <http://www.globefish.org/>.

FAO-Globefish/Josupeit, H. (2004). Conference Proceedings. An Overview on the World Shrimp Market. World Shrimp Markets. Madrid.

FAO-Globefish/Josupeit, H. (2008). Conference Proceedings. Global Technical and Trade Conference on Shrimp : US and EU Market. Rome, Italy. www.globefish.org.

FAO/OMS (1995). CODEX STAN 92 - 1981, Rév. 1 - 1995 - NORME POUR LES CREVETTES SURGELÉES.

Fenaroli, G. (2001). Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients 4th Edition. Burdock, G. A. CRC Press.

Ferchichi, M., Valcheva, R., Prevost, H., Onno, B. and Dousset, X. (2007). Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* **24**, 678-686.

Flahaut, S., Boutibonnes, P. and Auffray, Y. (1997). Enterococci in the near environment of human - Les entérocoques dans l'environnement proche de l'homme. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 699-708.

Flórez, A. B. and Mayo, B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* **110**, 165-171.

Fonnesbech Vogel, B., Venkateswaran, K., Satomi, M. and Gram, L. (2005). Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 6689-6697.

Foulquié-Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 1-24.

Frankel, E. N. (2005). Lipid oxidation - 2nd ed. Bridgewater. The Oily Press.

Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. and Holzappel, W. H. (2003). Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 105-122.

Franz, C. M. A. P., Holzappel, W. and Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety ? *International Journal of Food Microbiology* **47**, 1-24.

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

Fraser, D. I., Dingle, J. R., Hines, J. A., Nowlan, S. C. and Dyer, W. J. (1967). Nucleotide degradation, monitored by thin layer chromatography and associated post mortem changes in relaxed cod muscle. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **24**, 1837-1841.

From, V. and Huss, H. H. (1990). Lightly preserved shrimps - shrimps in brine. *Fiskerbladet* **36**, 35-41.

Frueh, F. W. and Noyer-Weidner, M. (2003). The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **41**, 452-461.

Fukami, K., Ishiyama, S., Yaguramaki, H., Masuzawa, T., Nabeta, Y., Endo, K. and Shimoda, M. (2002). Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5412-5416.

-G-

Garcia-Fontan, M. C., Lorenzo, J. M., Parada, A., Franco, I. and Carballo, J. (2007). Microbiological characteristics of "androlla", a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology* **24**, 52-58.

Gardner, G. A. (1966). A selective medium for the enumeration of *Microbacterium thermosphactum* in meat and meat products. *Journal of Applied Bacteriology* **29**, 455-460.

Gardner, G. A. (1981). *Brochothrix thermosphacta* (*Microbacterium thermosphactum*) in the spoilage of meats: A review. In: Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity. Academic-Press (Eds), 139-173.

Garofalo, C., Silvestri, G., Aquilanti, L. and Clementi, F. (2008). PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of Panettone. *Journal of Applied Microbiology* **105**, 243-254.

- Gascuel, O.** (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 685-695.
- Giacomazzi, S., Leroi, F. and Joffraud, J. J.** (2005). Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 1230-1238.
- Giacomazzi, S., Leroi, F., L'Henaff, C. and Joffraud, J. J.** (2004). *rpoB*-PCR amplified gene and temporal temperature gradient gel electrophoresis: a rapid tool to analyse bacterial strains representative of cold-smoked salmon microflora. *Letters in Applied Microbiology* **38**, 130-134.
- Giraffa, G.** (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 215-222.
- Giraffa, G. and Neviani, E.** (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* **67**, 19-34.
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., de Decker, S., Saulnier, D. and le Roux, F.** (2006). Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 570-580.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. and Moletta, R.** (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2802-2813.
- Goldenberg, O., Herrmann, S., Adam, T., Marjoram, G., Hong, G., Gobel, U. B. and Graf, B.** (2005). Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 5912-5915.
- Goldenberg, O., Herrmann, S., Marjoram, G., Noyer-Weidner, M., Hong, G., Bereswill, S. and Gobel, U. B.** (2007). Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* **68**, 94-105.
- Gomez-Gil, B., Tron-Mayen, L., Roque, A., Turnbull, J. F., Inglis, V. and Guerra-Flores, A. L.** (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **163**, 1-9.
- Gon, S., Patte, J. C., Dos Santos, J. P. and Mejean, V.** (2002). Reconstitution of the trimethylamine oxide reductase regulatory elements of *Shewanella oneidensis* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **184**, 1262-1269.
- Gonzalez-Rodriguez, M. N., Sanz, J. J., Santos, J. A., Otero, A. and Garcia-Lopez, M. L.** (2002). Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 161-168.

- Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. and Karunasagar, I.** (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 151-159.
- Gram, L.** (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology* **4**, 65-72.
- Gram, L. and Dalgaard, P.** (2002). Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 262-266.
- Gram, L. and Huss, H. H.** (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 121-137.
- Grimont, F. and Grimont, P. A. D.** (1992). The Genus *Serratia*. In: The Prokaryotes. Springer (Eds), 2823-2848.
- Grimont, P. A. D., Grimont, F. and Irino, K.** (1982). Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens sensu stricto*, *Serratia proteamaculans*, and *Serratia grimesii* sp. nov. *Current Microbiology* **7**, 69-74.
- Gürtler, V. and Stanisich, V. A.** (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S- 23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**, 3-16.

-H-

- Hammes, W. P. and Hertel, C.** (2006). The genus *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: The Prokaryotes. Springer (Eds), 320-403.
- Hanninen, M. L., Oivanen, P. and Hirvela-Koski, V.** (1997). *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. *International Journal of Food Microbiology* **34**, 17-26.
- Hidalgo, A., Franzetti, L., Rossi, M. and Pompei, C.** (2008). Chemical markers for the evaluation of raw material hygienic quality in egg products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 1289-1297.
- Holley, R. A., Guan, T. Y., Peirson, M. Y. and Yost, C. K.** (2002). *Carnobacterium viridans* sp. nov., an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1881-1885.
- Hovda, M. B., Lunestad, B. T., Sivertsvik, M. and Rosnes, J. T.** (2007a). Characterisation of the bacterial flora of modified atmosphere packaged farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by PCR-DGGE of conserved 16S rRNA gene regions. *International Journal of Food Microbiology* **117**, 68-75.
- Hovda, M. B., Sivertsvik, M., Lunestad, B. T., Lorentzen, G. and Rosnes, J. T.** (2007b). Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiology* **24**, 362-371.

Hoyles, L., Lawson, P. A., Foster, G., Falsen, E., Ohlen, M., Grainger, J. M. and Collins, M. D. (2000). *Vagococcus fessus* sp. nov., isolated from a seal and a harbour porpoise. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1151-1154.

Hozbor, M. C., Saiz, A. I., Yeannes, M. I. and Fritz, R. (2006). Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *LWT - Food Science and Technology* **39**, 99-104.

Hugas, M., Garriga, M. and Aymerich, M. T. (2003). Functionalty of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 223-233.

Hughes, R. B. and Jones, N. R. (1966). Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material, with a comment on flavour relations. *Journal of SeaFood Agreement* **17**, 434-436.

Huis in 't Veld, J. H. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 1-18.

Huss, H. H., Dalsgaard, D., Hansen, L., Ladefoged, H., Pedersen, A. and Zittan, L. (1974). The influence of hygiene in catch handling on the storage life of iced cod and plaice. *International Journal of Food Science Technology* **9**, 213-221.

-J-

Jain, R., Rivera, M. C., Moore, J. E. and Lake, J. A. (2002). Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theoretical Population Biology* **61**, 489-495.

Janse, I., Bok, J. and Zwart, G. (2004). A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 279-281.

Jany, J. L. and Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology* **25**, 839-848.

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

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

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

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

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

Jørgensen, L. V., Huss, H. H. and Dalgaard, P. (2001). Significance of volatile compounds produced by spoilage bacteria in vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) analyzed by GC-MS and multivariate regression. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **49**, 2376-2381.

Juste, A., Thomma, B. P. and Lievens, B. (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* **25**, 745-761.

-K-

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

Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Hill, C. and Cogan, T. M. (2007). Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1393-1405.

Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2. William-&-Wilkins (Eds), 1208-1234.

Kanduri, L. and Eckhardt, R. A. (2002). Food Safety in Shrimp Processing - A Handbook for Shrimp Processors, Importers, Exporters & Retailers. Blackwell Publishing.

Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M. and Tsukamoto, T. (2004). *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *International Journal of Food Microbiology* **92**, 79-87.

Kim, S. H., Price, R. J., Morrissey, M. T., Field, K. G., Wei, C. I. and An, H. (2002). Histamine production by *Morganella morganii* in Mackerel, Albacore, Mahi-Mahi, and salmon at various storage temperatures. *Journal of Food Science* **67**, 1522-1528.

Kim, S. H., Wei, C. I., Clemens, R. A. and An, H. (2004). Histamine accumulation in seafoods and its control to prevent outbreaks of scombroid poisoning. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **13**, 81-100.

Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R. and Kuwahara, S. (1963). A new selective isolation medium for the *Vibrio* group, on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). *Nippon Saikingaku Zasshi - Japanese Journal of Bacteriology* **18**, 387-392.

-L-

- Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y. and Delacroix-Buchet, A.** (2004). Le potentiel de la TTGE pour l'étude bactérienne de quelques laits crus. *Le Lait* **84**, 169-178.
- Lan, R. and Reeves, P. R.** (1996). Gene transfer is a major factor in bacterial evolution. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 47-55.
- Lannelongue, M., Hanna, M. O., Finne, G., Nickelson, R. and Vanderzant, C.** (1982). Storage characteristics of fin-fish fillets (*Archosargus probatocephalus*) packaged in modified gas atmospheres containing carbon dioxide. *Journal of Food Protection* **45**, 440-444.
- Larrouture-Thiveyrat, C.** (2001). Potentialités aromatiques des bactéries lactiques des produits carnés - Ability of lactic acid bacteria from meat origin to catabolise amino acids in aromatic compounds. Ph. D. Thesis. INRA de Clermont-Ferrand, Unité de Recherches sur la viande, Laboratoire de microbiologie. Université de Clermont-Ferrand 2.
- Larrouture-Thiveyrat, C., Pepin, M., Leroy-Setrin, S. and Montel, M. C.** (2003). Effect of *Carnobacterium piscicola* on aroma formation in sausage mince. *Meat Science* **63**, 423-426.
- Laursen, B. G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P. and Leisner, J. J.** (2005). *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 151-164.
- Laursen, B. G., Leisner, J. J. and Dalgaard, P.** (2006). *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 3604-3611.
- Lawson, P. A., Falsen, E., Cotta, M. A. and Whitehead, T. R.** (2007). *Vagococcus elongatus* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 751-754.
- Lawson, P. A., Foster, G., Falsen, E., Ohlen, M. and Collins, M. D.** (1999). *Vagococcus lutrae* sp. nov., isolated from the common otter (*Lutra lutra*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1251-1254.
- Le Bourhis, A. G., Dore, J., Carlier, J. P., Chamba, J. F., Popoff, M. R. and Tholozan, J. L.** (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal Food Microbiology* **113**, 154-163.
- Le Garff, B.** (1998). Dictionnaire étymologique de zoologie. Delachaux & Niestle.
- Le Guyader, H.** (2002). Doit-on abandonner le concept d'espèce ? *Courrier de l'Environnement de l'INRA* **46**, 51-64.

- Le Roux, F., Goubet, A., Thompson, F. L., Faury, N., Gay, M., Swings, J. and Saulnier, D.** (2005). *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 2251-2255.
- Leblanc, D. J.** (2006). *Enterococcus*. In: The Prokaryotes. Springer (Eds), 175-204.
- Lee, B. H. and Simard, R. E.** (1984). Evaluation of methods for detecting the production of H₂S, volatile sulfides, and greening by lactobacilli. *Journal of Food Science* **49**, 981-983.
- Leisner, J. J., Greer, G. G., Dilts, B. D. and Stiles, M. E.** (1995). Effect of growth of selected lactic acid bacteria on storage life of beef stored under vacuum and in air. *International Journal of Food Microbiology* **26**, 231-243.
- Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prévost, H., Drider, D. and Dalgaard, P.** (2007). *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews* **31**, 592-613
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F. and Cardinal, M.** (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 111-121.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F. and Cardinal, M.** (2001). Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 578-587.
- Leung, P. S. and Engle, C.** (2007). *Shrimp Culture: Economics, Market, and Trade*. Blackwell Publishing.
- Leuschner, R. G. and Hammes, W. P.** (1999). Formation of biogenic amine in mayonnaise, herring and tuna fish salad by lactobacilli. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **50**, 159-164.
- Li, M. Y., Zhou, G. H., Xu, X. L., Li, C. B. and Zhu, W. Y.** (2006). Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. *Food Microbiology* **23**, 607-611.
- López-Caballero, M., Gonçalves, A. and Nunes, M.** (2002). Effect of CO₂/O₂-containing modified atmospheres on packed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *European Food Research and Technology* **214**, 192-197.
- Lopez-Galves, D. E., De la Hoz, L. and Ordonez, J. A.** (1995). Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on microbiological and chemical changes in refrigerated bina (*Thunnus alalunga*)steaks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 483-490.
- Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., VanderGheynst, J. and Mills, D. A.** (2003). Design and Evaluation of PCR Primers for Analysis of Bacterial Populations in Wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6801-6807.

Ludwig, W., Seewaldt, E., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K. H., Magrum, L., Woese, C. R., Fox, G. E. and Stackebrandt, E. (1985). The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of General Microbiology* **131**, 543–551.

Lyhs, U. and Bjorkroth, J. K. (2008). *Lactobacillus sakei/curvatus* is the prevailing lactic acid bacterium group in spoiled maatjes herring. *Food Microbiology* **25**, 529-533.

Lyhs, U., Korkeala, H., Vandamme, P. and Bjorkroth, J. (2001). *Lactobacillus alimentarius*: a specific spoilage organism in marinated herring. *International Journal of Food Microbiology* **64**, 355-360.

-M-

Maiden, M. C. J., Bygravesdagger, J. A., FeilDagger, E., Morelli, G., Russelldagger, J. E., Urwin, R., ZhangDagger, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feaversdagger, I. M., Achtman, M. and Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95** 3140-3145.

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

Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Kasbi Chadli, F., Cornet, J., Prévost, H. and Pilet, M. F. (2009). Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* in press.

McLean, R. A. and Sulzbacher, W. L. (1953). *Microbacterium thermosphactum*, spec. nov., a nonheat resistant bacterium from fresh sausage. *Journal of Bacteriology* **65**, 428-433.

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

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

Meroth, C. B., Hammes, W. P. and Hertel, C. (2003a). Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 7453-7461.

Meroth, C. B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M. J. and Hammes, W. P. (2003b). Monitoring the Bacterial Population Dynamics in Sourdough Fermentation Processes by Using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 475-482.

Miambi, E., Guyot, J. P. and Ampe, F. (2003). Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-

dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 111-120.

Michel, C., Nougayrède, P., Eldar, A., Sochon, E. and De Kinkelin, P. (1997). *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Diseases of Aquatic Organisms* **30**, 199-208.

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

Millière, J. B., Michael, M., Mathieu, F. and Lefebvre, G. (1994). Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. *Journal of Applied Bacteriology* **76**, 264-269.

Molin, G. and Stenström, I. M. (1984). Effect of temperature on the microbial flora of herring stored in air or in carbon dioxide. *Journal of Applied Bacteriology* **56**, 275-282.

Möndel, M., Schroeder, B. O., Zimmermann, K., Huber, H., Nuding, S., Beisner, J., Fellermann, K., Stange, E. F. and Wehkamp, J. (2008). Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunology* in-press.

Montel, M. C., Talon, R., Fournaud, J. and Champomier, M. C. (1991). A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 469-472.

Mora, D., Scarpellini, M., Franzetti, L., Colombo, S. and Galli, A. (2003). Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 675-678.

Morales, P., Feliu, I., Fernandez-Garcia, E. and Nunez, M. (2004). Volatile compounds produced in cheese by *Enterobacteriaceae* strains of dairy origin. *Journal of Food Protection* **67**, 567-573.

Mossel, D. A. and Ratto, M. A. (1970). Rapid detection of sublethally impaired cells of *Enterobacteriaceae* in dried foods. *Applied Microbiology* **20**, 273-275.

Murray, A. E., Hollibaugh, J. T. and Orrego, C. (1996). Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2676-2680.

Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 317-322.

Muyzer, G., de Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.

Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S. and Maniatis, T. (1985a). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **13**, 3131-3145.

Myers, R. M., Fischer, S. G., Maniatis, T. and Lerman, L. S. (1985b). Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **13**, 3111-3129.

-N-

Najjari, A., Ouzari, H., Boudabous, A. and Zagorec, M. (2008). Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *International Journal of Food Microbiology* **121**, 342-351.

Nickelson, R., Finne, G., Hanna, M. O. and Vanderzant, C. (1980). Minced fish flesh from non-traditional Gulf of Mexico finfish species: Bacteriology. *Journal of Food Science* **45**, 1321-1326.

Nordvi, B., Langsrud, O., Egelanddal, B., Slinde, E., Vogt, G., Gutierrez, M. and Olsen, E. (2007). Characterization of volatile compounds in a fermented and dried fish product during cold storage. *Journal of Food Science* **72**, S373-380.

-O-

OFIMER (2001). Le marché des crevettes. Note présentée au Conseil de Direction de l'OFIMER du 26 septembre 2001.

OFIMER (2004). Bilan annuel 2004 : commerce extérieur des produits de la pêche et de l'aquaculture. <http://www.ofimer.fr/>.

OFIMER (2005). Estimation de la consommation de crevettes en France en 2004. Note présentée au Conseil de Direction de l'OFIMER septembre 2005.

OFIMER (2006). Bilan annuel 2006 : Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.

Ogier, J. C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J. Y. and Delacroix-Buchet, A. (2004). Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5628-5643.

Ogier, J. C. and Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* **126**, 291-301.

Ogier, J. C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. and Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3691-3701.

Olafsdottir, G., Hognadottir, A., Martinsdottir, E. and Jonsdottir, H. (2000). Application of an electronic nose to predict total volatile bases in capelin (*Mallotus villosus*) for fishmeal production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2353-2359.

Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M. and de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **39**, 329-367.

-P-

Paarup, T., Sanchez, J. A., Pelaez, C. and Moral, A. (2002). Sensory, chemical and bacteriological changes in vacuum-packed pressurised squid mantle (*Todaropsis eblanae*) stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology* **74**, 1-12.

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

Pantazi, D., Papavergou, A., Pournis, N., Kontominas, M. G. and Savvaidis, I. N. (2008). Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: microbiological, biochemical and sensory attributes. *Food Microbiology* **25**, 136-143.

Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N. and Kontominas, M. G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology* **20**, 411-420.

Papon, M. and Talon, R. (1988). Factors affecting growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 107-115.

Parayre, S., Falentin, H., Madec, M. N., Sivieri, K., Le Dizes, A. S., Sohier, D. and Lortal, S. (2007). Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiological Methods* **69**, 431-441.

Peirson, M. D., Guan, T. Y. and Holley, R. A. (2003). Aerococci and carnobacteria cause discoloration in cooked cured bologna. *Food Microbiology* **20**, 149-158.

Penney, N., Graham Bell, R. and Cummings, T. L. (1994). Extension of the chilled storage life of smoked blue cod (*Parapercis colias*) by carbon dioxide packaging. *International journal of food science and technology* **29**, 167-178.

Pereira, C. I., Crespo, M. T. and Romao, M. V. (2001). Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology* **68**, 211-216.

Perez-Pulido, R., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Martínez Canamero, M. and Galvez, A. (2005). Microbiological study of lactic acid fermentation of Caper berries by molecular and culture-dependent methods. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 7872-7879.

Pikuta, E. V., Marsic, D., Bej, A., Tang, J., Krader, P. and Hoover, R. B. (2005). *Carnobacterium pleistocenium* sp. nov., a novel psychrotolerant, facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox Tunnel in Alaska. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 473-478.

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

Pôle-Filière-Produits-Aquatiques (2007). Composition nutritionnelle des produits aquatiques. <http://www.nutraqua.com/>.

Pot, B., Devriese, L. A., Homme, J., Miry, C., Vandemeulebroecke, K., Kersters, K. and Haesebrouck, F. (1994). Characterization and identification of *Vagococcus fluvialis* strains isolated from domestic animals. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 362-369.

Pournis, N., Papavergou, A., Badeka, A., Kontominas, M. G. and Savva, I. N. (2005). Shelf-life extension of refrigerated Mediterranean mullet (*Mullus surmuletus*) using modified atmosphere packaging. *Journal of Food Protection* **68**, 2201-2207.

Prost, C., Hallier, A., Cardinal, M., Serot, T. and Courcoux, P. (2004). Effect of Storage Time on Raw Sardine (*Sardina pilchardus*) Flavor and Aroma Quality. *Journal of Food Science* **69**, 198-204.

-Q-

Quéro, J. C. and Vayne, J. J. (1998). Les fruits de la mer et plantes marines des pêches françaises. Delachaux & Niestle.

-R-

Rachman, C., Fourrier, A., Sy, A., De La Cochetière, M. F., Prevost, H. and Dousset, X. (2004a). Monitoring of bacterial evolution and molecular identification of lactic acid bacteria in smoked salmon during storage. *Le Lait* **84**, 145-154.

Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Prevost, H. and Dousset, X. (2004b). Identification of *Carnobacterium* species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 4468-4477.

Rachman, C. N. (2004). Développement d'outils moléculaires d'identification et d'analyse de la biodiversité de l'écosystème bactérien du saumon fumé. Ph. D. Thesis. Faculté des Sciences et des Techniques. Université de Nantes.

- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A. and Brisse, S.** (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS pathogens* **4**, 1-14.
- Randazzo, C. L., Scifo, G. O., Tomaselli, F. and Caggia, C.** (2008). Polyphasic characterization of bacterial community in fresh cut salads. *International Journal of Food Microbiology* **128**, 484-490.
- Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M. and Vaughan, E. E.** (2002). Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1882-1892.
- Randazzo, C. L., Vaughan, E. E. and Caggia, C.** (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology* **109**, 1-8.
- Rantsiou, K., Drosinos, E. H., Gialitaki, M., Metaxopoulos, I., Comi, G. and Cocolin, L.** (2006). Use of molecular tools to characterize *Lactobacillus* spp. isolated from Greek traditional fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* **112**, 215-222.
- Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G. and Cocolin, L.** (2008). Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology* **126**, 36-42.
- Renouf, V., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (2006). *rpoB* gene: a target for identification of LAB cocci by PCR-DGGE and melting curves analyses in real time PCR. *Journal of Microbiological Methods* **67**, 162-170.
- Renouf, V., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**, 149-164.
- Ringo, E., Bendiksen, H. R., Wesmajervi, M. S., Olsen, R. E., Jansen, P. A. and Mikkelsen, H.** (2000). Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Applied Microbiology* **89**, 317-322.
- Robinson, K.** (1966). Some Observations on the Taxonomy of the Genus *Microbacterium*. II. Cell Wall Analysis, Gel Electrophoresis and Serology. *Journal of Applied Bacteriology* **29**, 616-624.
- Rodas, A. M., Ferrer, S. and Pardo, I.** (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 197-207.
- Rogosa, M., Mitchell, J. A. and Wiseman, R. F.** (1951). A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *Journal of Bacteriology* **62**, 132-133.
- Rönnbäck, P.** (2001). Shrimp aquaculture - State of the art. Swedish EIA Centre, Report 1. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.

Rossello-Mora, R. and Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 39-67.

Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S. E. and Nissen, H. (2004). Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in modified-atmosphere-packed salmon and coalfish. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5010-5018.

Ruiz-Zarzuela, I., de Bias, I., Girones, O., Ghittino, C. and Muazquiz, J. L. (2005). Isolation of *Vagococcus salmoninarum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), broodstocks: characterization of the pathogen. *Veterinary Research Communications* **29**, 553-562.

-S-

Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C. and Ogawa, M. (2002). Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *International Journal of Food Microbiology* **74**, 87-99.

Sakzaki, R. and Tamura, K. (1992). The Genus *Hafnia*. In: The Prokaryotes. Springer (Eds), 2816-2821.

Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K. G. and Metaxopoulos, J. (1998). Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 649-660.

Samelis, J., Kakouri, A. and Rementzis, J. (2000). The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. *International Journal of Food Microbiology* **56**, 133-143.

Satomi, M., Vogel, B. F., Gram, L. and Venkateswaran, K. (2006). *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 243-249.

Schleifer, K. H. (1970). Die Mureintypen in der Gattung *Microbacterium* [The murein types of the genus *Microbacterium*]. *Archiv für Mikrobiologie* **71**, 271-282.

Schleifer, K. H. and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* **36**, 407-477.

Schleifer, K. H. and Kilpper-Bälz, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Systematic and Applied Microbiology* **10**, 1-19.

Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D. and Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **6**, 183-195.

Schmalenberger, A., Schwieger, F. and Tebbe, C. C. (2001). Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-

Based Microbial Community Analyses and Genetic Profiling. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3557-3563.

Schmidtke, L. M. and Carson, J. (1994). Characteristics of *Vagococcus salmoninarum* isolated from diseased salmonid fish. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 229-236.

Seibel, B. A. and Walsh, P. J. (2002). Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *Journal of Experimental Biology* **205**, 297-306.

Senger-Emonnot, P., Rochard, S., Pellegrin, F., George, G., Fernandez, X. and Lizzani-Cuvelierb, L. (2006). Odour active aroma compounds of sea fig (*Microcosmus sulcatus*). *Food Chemistry* **97**, 465-471.

Shewan, J. M. (1977). The bacteriology of fresh fish and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In: Proceedings of the Conference on "Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish. Tropical-Products-Institute (Eds), 51-66.

Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Carvalho Mda, G., Elliott, J. A., Joyce, K., Barrett, T. J., Teixeira, L. M. and Facklam, R. R. (2004). *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1505-1510.

Skerman, V. B. D., McGowan, V. and Sneath, P. H. A. (1980). Approved Lists of Bacterial Names - The *ad Hoc* Committee of the Judicial Commission of the ICSB. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**, 225-420.

Slanetz, L. W. and Bartley, C. H. (1957). Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology* **74**, 591-595.

Sneath, P. H. A. (1989). Numerical taxonomy. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. S. T. Williams, M. E. Sharpe and J. G. Holt (Eds), 2303-2305.

Sneath, P. H. A. and Jones, D. (1976). *Brochothrix*, a new genus tentatively placed in the family *Lactobacillaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **26**, 102-104.

Stackebrandt, E. and Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* **33**, 152-155.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kampfer, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. and Whitman, W. B. (2002). Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1043-1047.

Stackebrandt, E. and Jones, D. (2006). The Genus *Brochothrix*. In: The Prokaryotes. Springer (Eds), 477-491.

Stackebrandt, E. G. and Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 846-849.

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

Sulzbacher, W. L. and McLean, R. A. (1951). The bacterial flora of fresh pork sausage. *Food Technology* **5**, 7-8.

-T-

Talon, R., Grimont, P. A. D., Grimont, F., Gasser, F. and Boeufgras, J. M. (1988). *Brochothrix campestris* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**, 99-102.

Tanasupawat, S., Sukontasing, S. and Lee, J. S. (2008). *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 1630-1634.

Teixeira, L. M., Carvalho, M. G., Merquior, V. L., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. and Facklam, R. R. (1997). Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2778-2781.

Tenaillon, O., Taddei, F., Radmian, M. and Matic, I. (2001). Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Research in Microbiology* **152**, 11-16.

Thanh, V. N., Mai le, T. and Tuan, D. A. (2008). Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE. *International Journal of Food Microbiology* **128**, 268-273.

Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C. B. and Swings, J. (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5107-5115.

Thompson, J. R., Marcelino, L. A. and Polz, M. F. (2002). Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research* **30**, 2083-2088.

Thornley, M. J. (1957). Observations on the microflora of minced chicken meat irradiated with 4MeV cathode rays. *Journal of Applied Bacteriology* **20**, 286-298.

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

-U-

Underhill, P. A., Jin, L., Lin, A. A., Mehdi, S. Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R. W., Cavalli-Sforza, L. L. and Oefner, P. J. (1997). Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Research* **7**, 996-1005.

Underhill, P. A., Jin, L., Zemans, R., Oefner, P. J. and Cavalli-Sforza, L. L. (1996). A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 196-200.

-V-

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

Van Beek, S. and Priest, F. G. (2002). Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 297-305.

Van Spreekens, K. J. A. (1974). The suitability of a modification of Long and Hammer's medium for the enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **25**, 213-219.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**, 407-438.

Vaneechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G. and Kersters, K. (1992). Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters* **72**, 227-233.

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

Vasilopoulos, C., Ravyts, F., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L. and Leroy, F. (2008). Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 1341-1353.

Veciana-Nogues, M. T., Marine-Font, A. and Vidal-Carou, M. C. (1997). Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2036-2041.

Vogel, B. F., Venkateswaran, K., Satomi, M. and Gram, L. (2005). Identification of *Shewanella baltica* as the Most Important H₂S-Producing Species during Iced Storage of Danish Marine Fish. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 6689-6697.

-W-

Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A. J., Fryer, J. L., Phillips, B. A. and Collins, M. D. (1990). 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* **40**, 224-230.

Wartell, R. M., Hosseini, S., Powell, S. and Zhu, J. (1998). Detecting single base substitutions, mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods. *Journal of Chromatography A* **806**, 169-185.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. and Truper, H. G. (1987). Report of the *ad Hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 463-464.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**, 697-703.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Review* **51**, 221-271.

Wolffs, P., Norling, B. and Radstrom, P. (2005). Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* **60**, 315-323.

-Z-

Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M. and Goodfellow, M. (1988). DNA base composition and homology values in the classification of some *Rhodococcus* species. *Journal of General Microbiology* **134**, 2807-2813.

Zapatka, F. A. and Bartolomeo, B. (1973). Microbiological evaluation of cold-water shrimp (*Pandalus borealis*). *Applied Microbiology* **25**, 858-861.

Zuckerandl, E. and Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* **8**, 357-366.

Zwiehner, J., Handschur, M., Michaelsen, A., Irez, S., Demel, M., Denner, E. B. and Haslberger, A. G. (2008). DGGE and real-time PCR analysis of lactic acid bacteria in bacterial communities of the phyllosphere of lettuce. *Molecular Nutrition and Food Research* **52**, 614-623.

ANNEXES

Annexe I : Hénaff N., Jaffrès E., Huchet V., Dousset X., Joffraud J.J. and D Sohier. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis for global analysis of bacterial ecosystem dynamics in seafood samples. 21st International ICFMH Symposium, Foodmicro 2008 “Evolving Microbial Food Quality and Safety” Aberdeen, Scotland, 1st – 4th September 2008.

Annexe II : Guilbaud M., Jaffrès E., Joffraud J.J., Prévost H. et X. Dousset. Utilisation de la Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) pour le suivi de la dynamique d’une flore microbienne. 15ème colloque du Club des Bactéries Lactiques (CBL), Rennes, 13 – 15 novembre 2007.

Annexe III : Jaffrès E., Prévost H., Leroi F., Joffraud J.J. et X. Dousset. Caractérisation de l’écosystème microbien de la crevette cuite au cours de sa conservation par une approche polyphasique. 7ème congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Nantes, 30 mai – 1er juin 2007.



HENAFF N.¹, JAFFRÉS E.^{2,3}, HUCHET V.¹, DOUSSET X.³, JOFFRAUD J.J.², SOHIER D.¹

¹ADRIA Développement, Quimper, France, daniele.sohier@adria.tm.fr

²IFREMER, Nantes, France

³ENITIAA, Nantes, France

Easy DNA extraction method and optimization of PCR-Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis for global analysis of bacterial ecosystem dynamics in seafood samples

INTRODUCTION

PCR-TTGE techniques are currently being used for global analysis of microbial ecosystems dynamics. An easy and rapid method to extract DNA from various seafood samples was developed. Following the amplification of the V3 region of the 16S rDNA gene, TTGE parameters were optimised in order to separate low GC-content bacteria.

MATERIEL & METHODS

The extraction method based on DNA purification columns did not involve any harmful solvent.



Direct bacterial DNA extraction

Seafood samples (30 g) homogenisation in sterile saline solution

Filtration on a Nucleospin Plant L column (Macherey-Nagel)

Enzymatic lysis step of the bacterial cell pellet with lysozyme and metabolising

Mechanical lysis step by adding of 0.3 g of glass beads and using a bead beater

DNA purification using a DNeasy blood and tissue kit (Qiagen)

PCR-TTGE analysis

Amplification of the V3 region (194 bp) of the 16S rDNA using the primers V3P2 and V3P3-GC-Clamp.

TTGE in the DCode universal mutation detection system (BioRad) at 50 V for 12h30 with a temperature gradient of 65°C to 70°C (rate of 0.4°C. h⁻¹) with

- resolving gels (9.5% (w/v) acrylamide stock solutions (acrylamide-bisacrylamide; 37.5:1) and 8M urea)

- stacking gels (16% (w/v) acrylamide stock solutions (acrylamide-bisacrylamide; 37.5:1) and 8M urea)



TTGE ladder for gel normalization

A TTGE ladder was prepared by pooling the PCR products of DNA extracts from pure strain cultures. The ladder is composed of ten reference species, forming a regular scale.

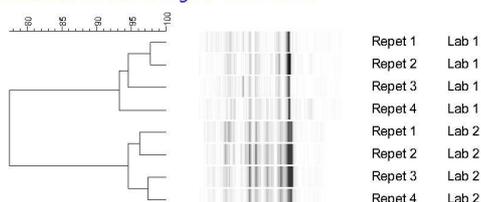


PCR-TTGE METHOD REPEATABILITY

The PCR-TTGE method repeatability was assessed by testing independent repetitions in two collaborator labs. The profiles were compared by using UPGMA algorithm combined with a Pearson correlation coefficient, in order to check the repeatability of the technique :

- the homology between profiles obtained in one lab is higher than 90 %,

- the homology between profiles obtained by the two collaborator labs is higher than 75%.

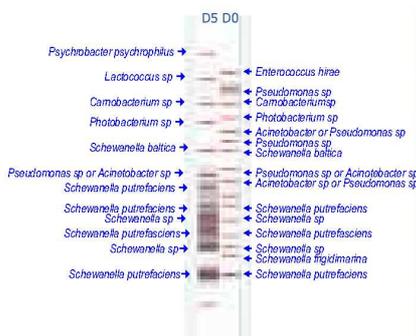


PCR-TTGE database

295 strains belonging to the most frequently encountered bacterial species in seafood were used to construct a database. The TTGE profiles were grouped into a database and normalized with the developed ladder using BioNumerics software. In most of the cases, PCR-TTGE products produced one band per species. However, for some species, several bands were obtained making the interpretation of profiles more complicated.

SEAFOOD SAMPLES ANALYSIS

Different seafood sample ecosystems dynamics during product shelf-life were analysed by PCR-TTGE analysis. PCR-TTGE profiles were correlated to microbiological enumerations using different media.



Microbiological enumerations	Dates of analysis	
	D0	D5
TVC on Long & Hammer medium	1,8.10 ⁵	5,4.10 ⁵
Photobacterium on PPDNA	1,9.10 ⁴	2,4.10 ⁵
Lactic Acid Bacteria on MRSA	1,0.10 ³	2,0.10 ⁴
Enterococcus on Slanetz Bartley medium	2,0.10 ²	4,3.10 ⁴
Brochothrix on STIA	< 10	2,2.10 ²
H ₂ S ⁺ bacteria on Lyngby medium	2,6.10 ³	1,0.10 ⁵

CONCLUSION : While the PCR-TTGE approach represents a valuable tool to describe bacterial population diversity, some limits are inherent to the culture independent approach: (i) the subdominant micro-flora might not be detected (1% or less of the total community); (ii) even if, some correlation could be done between bands intensities and population representatively, no quantitative data could be obtained. Thus, combination of culture-dependent and culture-independent methods could help to overcome several limitations inherent in each technique.



Utilisation de la DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) pour le suivi de la dynamique de la flore lactique et de la flore d'altération dans une matrice alimentaire

Morgan Guilbaud¹, Emmanuel Jaffrès^{1,2}, Jean-Jacques Joffraud², Hervé Prévost¹ et Xavier Dousset¹

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

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

Dans une matrice alimentaire, la flore lactique est en compétition avec les bactéries potentiellement pathogènes et les bactéries d'altération. Peu de données existent sur la microbiologie des crevettes, les seuls travaux concernent les crevettes nordiques (Dalgaard *et al.* 2003). Ainsi, connaître la composition de la flore bactérienne dominante des crevettes permettra d'étudier les interactions microbiennes et ainsi de pouvoir les maîtriser. La DHPLC s'est montrée efficace pour caractériser des écosystèmes microbiens comme la flore intestinale humaine (Goldenberg *et al.* 2007). Le but de cette étude était de mettre au point une méthode DHPLC afin de suivre l'évolution de la flore bactérienne de crevettes cuites au cours du stockage et d'identifier les bactéries présentes dans cette matrice.

Matériel et Méthodes

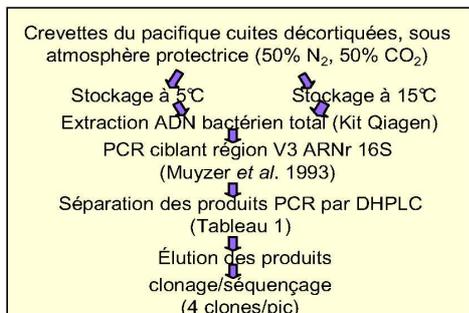


Tableau 1: Conditions de DHPLC

Gradient	Temps (min)	%A	%B
Loading	0	52	48
Start Gradient	0.1	45	55
Stop gradient	10.1	39	61

Séparation des fragments avec le Wave Microbial Analysis System (Transgenomic, Omaha, Nebraska). Température de la colonne: 62.2°C; Tampon A (0.1 M TEAA); Tampon B (0.1M TEAA dans 25% v/v acétonitrile)

Tableau 2: Identification des bactéries après clonage et séquençage des pics élués

Pic	4 clones identifiés
1	<i>B. thermosphacta</i> ; Uncultured firmicute; Uncultured firmicute; <i>Carnobacterium</i>
2	<i>B. thermosphacta</i> ; <i>B. thermosphacta</i> ; Uncultured bacterium; <i>Pseudomonas</i>
3	<i>B. thermosphacta</i> ; Uncultured bacterium; Uncultured bacterium; Uncultured bacterium
4	<i>B. thermosphacta</i> ; <i>B. thermosphacta</i> ; <i>B. thermosphacta</i> ; Cyanobactérie
5	<i>B. thermosphacta</i> ; <i>B. thermosphacta</i> ; <i>B. thermosphacta</i> ; <i>B. thermosphacta</i>
6	<i>Enterococcus</i> ; <i>B. thermosphacta</i> ; <i>Vagococcus</i> ; <i>Vagococcus</i>
7	<i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Vagococcus</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Carnobacterium</i>
8	<i>Enterococcus</i> ; <i>Enterococcus</i> ; <i>Vagococcus</i> ; <i>Citrobacter</i>
9	<i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Enterococcus</i> ; <i>Vagococcus</i> ; <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
10	<i>Vagococcus</i> ; <i>Vagococcus</i> ; <i>Vagococcus</i> ; <i>Carnobacterium</i>
11	<i>B. thermosphacta</i> ; <i>B. thermosphacta</i> ; <i>B. thermosphacta</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i>
12	<i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i>
13	<i>Enterobacteriaceae</i> (séquençage direct)

Résultats

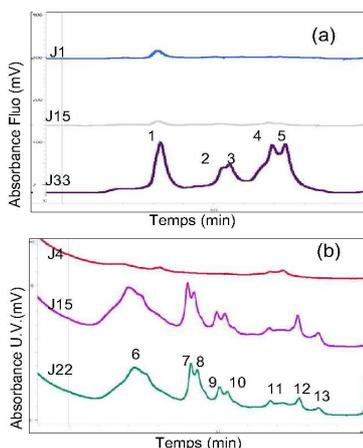


Figure 1: Profils DHPLC des amplicons après PCR région V3 sur ADN extrait de la flore bactérienne des crevettes stockées à 5°C à J1, J15 et J33 (a) et 15°C à J4, J15 et J22 (b)

N° 1 à 13 correspondent aux pics élués

L'évolution des chromatogrammes montre une augmentation et une diversification de la population au cours du stockage, surtout lors du stockage à 15°C. Les résultats de séquençage (Tableau 2) montrent qu'à 5°C, *Brochothrix thermosphacta* et des bactéries non cultivables composent la flore majoritaire. Tandis qu'à 15°C les bactéries lactiques des genres *Carnobacterium* (*C. maltaromaticum*), *Vagococcus* (*V. camphilus/fluvialis*) et *Enterococcus* (*E. faecium/faecalis*) ainsi que les entérobactéries (*Citrobacter* sp) composent la flore bactérienne majoritaire des crevettes cuites du pacifique.

Conclusion

La méthode DHPLC a été appliquée avec succès pour l'étude de l'évolution et de l'identification de la flore lactique et la flore d'altération des crevettes cuites. Cette technique automatisée présente plusieurs avantages comparée aux autres méthodes d'étude d'une flore bactérienne comme la TTGE ou DGGE car elle permet un important gain de temps et de récupérer directement les fragments séparés pour les séquencer.

Références: Muyzer, G., de Waal, E.C.Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700

Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta N., Swings, J., Fruerkilde, P., Leisner, J.J. 2003. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1):80-9.

Goldenberg, O.; Hermann, S. Marjoram, G., Nover-Weidner, M. Hong, G. Bereswill, S. Göbel, U.B. 2007. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods*. 68 (1) : 94-105

Remerciements: Françoise Le Vacon (Atlantène Applications, Nantes) pour l'accès à la DHPLC et Oliver Goldenberg (Transgenomic, Berlin) pour son support technique et scientifique.



Département Sciences et Techniques Alimentaires Marines.
Laboratoire de Microbiologie Alimentaire.



UMR-INRA 1014



Unité Mixte de Recherches
SECURITÉ des ALiments & Microbiologie.
ENTIAA.

Caractérisation de l'écosystème microbien de la crevette cuite au cours de sa conservation par une approche polyphasique.

Jaffrès E^{1,2}, Prévost H¹, Leroi F², Joffraud J.J² et Dousset X¹.

¹ Unité Mixte de Recherches Sécurité des Aliments et Microbiologie, ENTIAA domaine de la Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3.

² Département Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes, Cedex 3, France.

INTRODUCTION :

Les produits de la mer sont des aliments très fragiles d'un point de vue microbiologique. Dans le but de mieux maîtriser la conservation des crevettes cuites, la caractérisation de l'écosystème microbien de ces produits a été réalisée par le biais d'une approche polyphasique, combinant des techniques dites culture-dépendantes qui permettent l'identification phénotypique et moléculaire d'isolats bactériens, et des méthodes culture-indépendantes avec la technique PCR-TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) qui permet de séparer des fragments d'ADN amplifiés à partir d'un mélange d'ADN bactérien extrait directement d'une matrice complexe (Ogier et al., 2002) comme la crevette.

MATERIELS ET METHODES :

Echantillons : 2 lots de crevettes décortiquées, cuites, conditionnées sous atmosphère modifiée (produits A et B) provenant de deux usines différentes, ont été conservés à 5 et 15°C pendant 5 et 3 semaines respectivement. Chaque semaine deux séries d'analyses ont été réalisées (Fig. 1).

Analyse sensorielle : les caractéristiques sensorielles des produits étaient évaluées grâce à un jury d'analyse entraîné de 15 personnes. Les échantillons étaient classés suivant 3 classes d'altération : fortement, légèrement ou non altéré.

Analyse microbiologique : Approche culture dépendante – dénombrement de la flore totale psychrotrophe et de la flore productrice d'H₂S (milieux de Long and Hammer et Iron Agar). Des isolations ont été réalisées sur ces milieux lorsqu'une altération des produits était perceptible par le jury. Ces isolats ont été identifiés à l'aide de tests phénotypiques et moléculaires : Galerie API, PCR-RFLP sur ADN_r 16S, PCR sur ADN_r 16S-23S (Kabadjova et al., 2002), PCR spécifiques d'espèces.

Approche culture indépendante – Extraction d'ADN génomique de la flore totale à partir d'un broyat de crevettes en utilisant le kit DNAeasy (Qiagen®). Amplification par PCR de la région variable V3 (196 pb) de l'ARN_r-16S. L'électrophorèse a été réalisée sur gel de polyacrylamide (9,5% (v/v) (37,5:1 acrylamide-bisacrylamide), 8 M urée) dans du TAE 1,25x à 50 V, pendant 12,30 heures. Conditions de migration pour la séparation des espèces bactériennes : 65°C à 70°C, avec un gradient de 0,4°C/h.

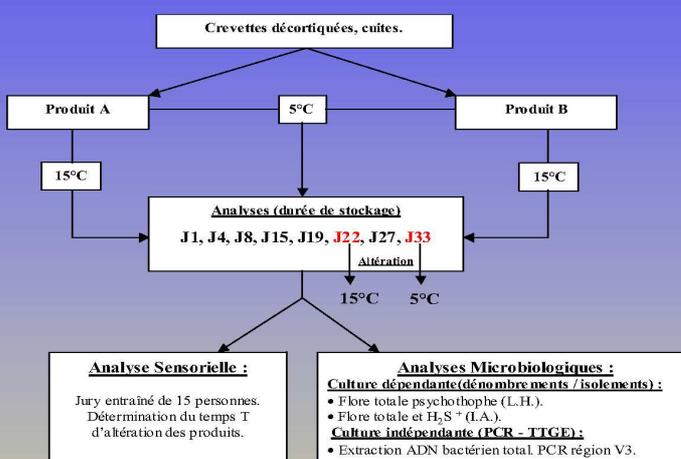


Figure 1 : Organigramme des analyses.

RESULTATS ET DISCUSSION :

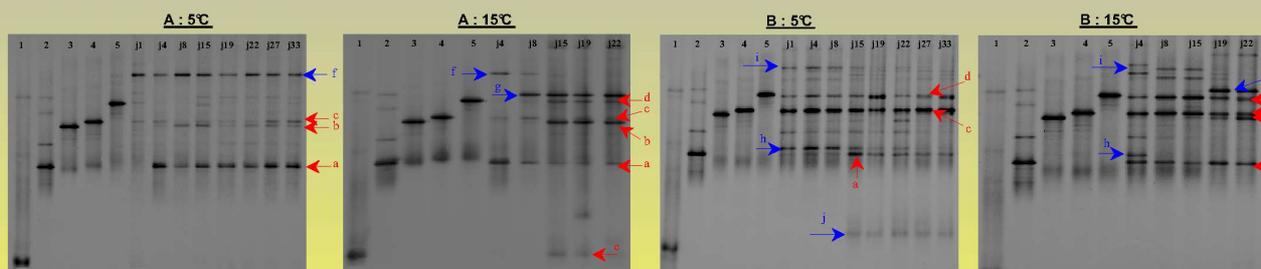


Figure 2 : Profils TTGE des fragments d'ADN-16S (région V3). Piste 1 à 5, souches de références (1 : *Serratia liquefaciens*, 2 : *Brochothrix thermosphacta*, 3 : *Enterococcus faecalis*, 4 : *Carnobacterium divergens*, 5 : *Carnobacterium maltaromaticum*). Piste [1 à 33], extraits d'ADN bactériens de crevette.

Approche culture dépendante : Sur 139 isolats récoltés, 73 appartiennent au groupe des bactéries lactiques avec la présence majoritaire de deux genres : *Carnobacterium* (35 souches) dont principalement *Cb. divergens* et *Cb. maltaromaticum*, et *Enterococcus* (31 souches) avec principalement *Ec. faecalis*. 48 isolats appartiennent à l'espèce *Brochothrix thermosphacta*. Enfin, 15 isolats sont rattachés à la famille des *Enterobacteriaceae* avec principalement l'espèce *Serratia liquefaciens*.

Approche culture indépendante : En parallèle la technique PCR-TTGE sur la région V3 a permis de suivre l'évolution des populations bactériennes majoritaires au cours de la conservation à 5 et 15°C (Fig.2). La dynamique de l'écosystème bactérien a pu être observée à travers l'alternance des fragments d'ADN sur les profils de migration. On peut noter la présence de plusieurs fragments qui ont pu être assignés à une des souches de références testées. Il s'agit des fragments « a », « b », « c », « d » et « e » que l'on retrouve sur la plupart des profils notamment au moment de l'altération et qui correspondent respectivement aux espèces *Brochothrix thermosphacta*, *Enterococcus faecalis*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum* et *Serratia liquefaciens*. Ces résultats semblent confirmer ceux acquis par l'approche culture dépendante. Certains fragments n'ont toutefois pas pu être identifiés et sont donc considérés comme inconnus. C'est le cas des fragments « f », « g », « h », « i » et « j ». Ils ne correspondent à aucun fragment de référence testé, le clonage et le séquençage seront nécessaires pour les identifier.

CONCLUSION :

Ces résultats montrent que la PCR-TTGE est un excellent moyen pour caractériser rapidement un écosystème microbien complexe comme celui de la crevette. Elle apporte des informations complémentaires à celles fournies par l'approche culture dépendante comme le montre la présence de fragments inconnus. Cette étude polyphasique a permis de mettre en évidence les principaux genres et espèces bactériens probablement liés à l'altération de la crevette. Le travail envisagé pour poursuivre consistera à étudier le potentiel d'altération de ces espèces en déterminant notamment le rôle joué par chacune dans ce processus.

REFERENCE :

Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V. and H. Prévost. (2002). Differentiation of closely related, food isolated *Carnobacterium* species, based on 16S-23S rDNA intergenic spacer regions. Applied and Environmental Microbiology, 68 : 5358-5366.
Ogier J.C., Son O., Gruss A., Talliez P and A. Delacroix Buchet (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis Applied and Environmental Microbiology, 68 : 3691 – 3701.

Ce travail a été financé par les régions Bretagne et Pays de la Loire dans le cadre du Pôle Agronomique Ouest. Programme IMBBIOMER (Interactions Microbienne et Biopréservation des produits de la Mer).

Caractérisation moléculaire de l'écosystème microbien complexe de la crevette cuite et étude des flores d'altération.

Les crevettes décortiquées cuites sont des denrées considérées comme fragiles d'un point de vue microbiologique, et sensibles au processus d'altération organoleptique provoqué par le développement de certaines bactéries. Dans le but de mieux maîtriser leur conservation, la caractérisation de l'écosystème microbien de ces produits a été réalisée par le biais d'une approche polyphasique, combinant des techniques dites culture-dépendantes, qui permettent l'identification phénotypique et moléculaire d'isolats bactériens, et des méthodes culture-indépendantes avec la PCR-TTGE et la DHPLC, qui génèrent des empreintes génétiques à partir d'un mélange d'ADN bactérien extrait directement de la matrice crevette. Cette approche a permis de mettre en évidence les principaux genres et espèces de bactéries présents dans la microflore d'altération des crevettes décortiquées cuites. Les bactéries lactiques constituaient le groupe bactérien majoritaire avec les principaux genres : *Carnobacterium* (*Cb. maltaromaticum*, *Cb. divergens* et *Cb. alterfunditum-like*), *Vagococcus* (*Vc. fluvialis* et *Vc. penaei* sp. nov.), *Enterococcus* (*Ec. faecalis* et *Ec. faecium*). Au sein du genre *Vagococcus*, une étude de taxonomie plus approfondie a permis de mettre en évidence la nouvelle espèce *Vagococcus penaei* sp. nov. Deux autres groupes bactériens importants étaient retrouvés dans cet écosystème : *Brochothrix thermosphacta* et *Serratia liquefaciens-like*. Pour comprendre les mécanismes d'altération de la crevette décortiquée cuite, le potentiel d'altération de ces bactéries a été étudié en mettant en œuvre des techniques d'analyse sensorielle et d'analyse des composés volatils produits par ces bactéries, comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Trois espèces bactériennes se sont révélées les plus actives dans l'altération de ce type de produit : *Bt. thermosphacta*, *St. liquefaciens-like* et *Cb. maltaromaticum*.

Mots-clés : Crevettes décortiquées cuites, TTGE, DHPLC, *Vagococcus penaei* sp. nov., altération, *Bt. thermosphacta*, *St. liquefaciens-like*, *Cb. maltaromaticum*.

Molecular characterization of the complex microbial ecosystem in cooked shrimp and study of the spoilage microbiota

Cooked and peeled shrimps are considered as fragile foodstuffs from a microbiological point of view and sensitive to the organoleptic spoilage process, induced by the growth of specific bacteria. For a better control of their shelf life, the characterization of the microbial ecosystem of this product was carried out by a polyphasic approach combining culture-dependent methods, which allowed the phenotypical and molecular identification of bacterial isolates, and culture-independent methods with the PCR-TTGE and DHPLC techniques which generated genetic fingerprintings from a bacterial DNA mixture directly extracted from cooked shrimps matrix. This approach has allowed to highlight the main bacterial genus and species present in the spoilage microbiota of cooked and peeled shrimps. Lactic acid bacteria were the major group with the main genus: *Carnobacterium* (*Cb. maltaromaticum*, *Cb. divergens* and *Cb. alterfunditum-like*), *Vagococcus* (*Vc. fluvialis* and *Vc. penaei* sp. nov.), *Enterococcus* (*Ec. faecalis* and *Ec. faecium*). Within the *Vagococcus* genus, a more detailed taxonomic study allowed to discover the novel species *Vagococcus penaei* sp. nov. Two other important bacterial groups were found in the shrimp ecosystem: *Brochothrix thermosphacta* and *Serratia liquefaciens-like*. To understand the spoilage mechanisms of cooked and peeled shrimps, the spoilage potential of these bacteria has been investigated by using sensory analysis methods and biochemical techniques (gas chromatography coupled to mass spectrometry device) to determine the volatile compounds produced by these bacteria. Three species were considered as the most spoiling bacteria in this type of product: *Bt. thermosphacta*, *St. liquefaciens-like* and *Cb. maltaromaticum*.

Keywords : Cooked and peeled shrimps, TTGE, DHPLC, *Vagococcus penaei* sp. nov., spoilage, *Bt. thermosphacta*, *St. liquefaciens-like*, *Cb. maltaromaticum*.