



HAL
open science

Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques

Mohammed Salim Ammor

► To cite this version:

Mohammed Salim Ammor. Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. Biologie cellulaire. Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes, 2004. Français. NNT : . tel-00104633

HAL Id: tel-00104633

<https://theses.hal.science/tel-00104633>

Submitted on 8 Oct 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Doctorale Vie-Agro-Santé

THESE

Présentée à

L'AGROCAMPUS RENNES

Pour obtenir le titre de **DOCTEUR DE L'AGROCAMPUS RENNES**

Mention : **Physico-chimie et Qualité des Bioproduits**

Par

Mohammed Salim AMMOR

*Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison :
Identification et propriétés des bactéries lactiques*

JURY :

Pr. BRULE, G. (ENSA Rennes)	Président
Pr. PREVOST, H. (ENITIAA Nantes)	Rapporteur
Dr. ZAGOREC, M. (INRA Jouy-en-Josas)	Rapporteur
Dr. CHEVALLIER, I. (ENITA-CF Lempdes)	Examineur
Pr. DUFOUR, E. (ENITA-CF Lempdes)	Examineur
Dr. TALON, R. (INRA Theix)	Examineur

Soutenue le 29 Septembre 2004

Unité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires
Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Clermont-Ferrand
Marmilhat -63370 Lempdes

A ma famille

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements au Pr. Eric DUFOUR et au Dr. Isabelle CHEVALLIER, de l'Unité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires de l'ENITA de Clermont-Ferrand, qui m'ont offert par leurs compétences scientifiques et pédagogiques et leurs qualités humaines, les moyens de mener à bien ce projet. Je tiens également à les remercier pour la confiance et le soutien permanent qu'ils m'ont témoigné dans cette collaboration.

J'adresse toute ma reconnaissance au Pr. Gérard BRULE, de l'Agrocampus Rennes, d'avoir accepté d'être Professeur responsable de cette thèse et de présider le jury de soutenance.

Je remercie le Dr. Régine TALON, de l'Unité de Recherche sur la Viande à l'INRA de Theix, qui a largement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie le Dr. Monique ZAGOREC, de l'Unité Flore Lactique et Environnement Carné de l'INRA de Jouy-en-Josas, de m'avoir accueilli au cours d'un stage dans son laboratoire et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Pr. Hervé PREVOST, de l'Unité de Recherche sur les Produits de la Mer de l'ENITIAA de Nantes, de m'avoir accueilli au cours d'un stage dans son laboratoire et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Merci au Dr. Françoise LERICHE dont les nombreux conseils ont constitué une assistance précieuse.

Je tiens également à remercier Karine FAYOLLE, Arlette LAGUET, Marcelle CHANONAT, Sylvie LARDON, Annabel BARTHELEMY, Corinne RODRIGUEZ, Isabelle LAMPRE et Isabelle GUEDON-ROCH, ainsi que tout le personnel du département QEA pour leur collaboration, leur soutien moral et leur amitié.

Enfin, des remerciements chaleureux vont à Romdhane KAROUI et à Jonathan RASON avec qui j'ai passé de très agréables moments.

RESUME

Les productions fermières représentent un enjeu socio-économique important, néanmoins l'hygiène dans les ateliers fermiers est encore peu ou mal maîtrisée, ce qui peut conduire à une perte de produit pouvant atteindre 25% à certaines périodes de l'année.

Notre étude réalisée dans le cadre de 2 programmes, régional et européen, avait pour objectif d'étudier l'écosystème microbien d'un atelier fermier de salaison n'utilisant pas de ferment et de proposer des solutions pour améliorer la qualité hygiénique et technologique du saucisson sec, sans affecter sa typicité.

La description quantitative et qualitative de l'écosystème microbien de cet atelier fermier a montré une faible maîtrise de l'hygiène, une mise en œuvre de procédures de nettoyage et de désinfection non appropriées, ainsi qu'une faible acidité du produit (pH 6,2 – 6,5). A partir de la souchothèque constituée au cours de cette première étape, nous avons identifié et caractérisé la flore lactique, en vue de développer un ferment lactique et une « flore barrière » à partir de la flore endogène à l'atelier.

Les identifications de 88 isolats de la flore lactique par approche phénotypique, génotypique et spectroscopique ont montré qu'*Enterococcus faecium* (25%) et *Vagococcus carniphilus* (12,5%) étaient les espèces dominantes au niveau des surfaces et des équipements de l'atelier, alors que *Lactococcus garvieae* (18,2%) et *Lactobacillus sakei* (40,9%) étaient, respectivement, les espèces dominantes au niveau de la mûlée et du saucisson.

Les 36 souches de *Lb. sakei* identifiées ont été caractérisées par rapport à leur potentiel d'utilisation comme ferments. Une analyse multivariée des résultats obtenus a permis de sélectionner 2 souches pouvant être utilisées dans le développement d'un ferment spécifique à cet atelier. En outre, 5 *Vc. carniphilus*, 3 *Ec. faecium*, 1 *Lb. sakei* et 1 *Enterococcus* sp. ont été testées pour leur effet antibactérien à l'encontre de *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* et/ou *Hafnia alvei* en conditions de biofilms bi-espèces. Deux souches d'*Ec. faecium* ont été caractérisées comme pouvant jouer le rôle de « flore barrière » au niveau des surfaces et des équipements de l'atelier.

Par ailleurs, dans une perspective de mise en place de procédures de décontamination appropriées à cet atelier, différentes solutions de désinfection ont été testées pour leur effet bactéricide sélectif sur des bactéries d'intérêt technologique, d'altération et pathogène, isolées de cet atelier et cultivées en biofilms. Le désinfectant utilisé dans cet atelier s'est avéré non sélectif détruisant la flore d'intérêt technologique. Par contre, la solution d'acide acétique à pH 5,4 contenant 0,075% p/v de monolaurine s'est montrée sélective, inhibant la flore indésirable à des niveaux pouvant atteindre 4 log₁₀ u.f.c/ml alors que la flore d'intérêt technologique n'a été que peu affectée.

L'ensemble de ces résultats suggère la possibilité d'améliorer la qualité des saucissons secs fermiers en adoptant une approche de type écologie microbienne dirigée dans les ateliers fermiers.

Mots clefs : Atelier fermier, saucisson sec, écosystème microbien, bactéries lactiques, identification, ferment, flore barrière, décontamination sélective.

ABSTRACT

Traditional productions represent an important socio-economic deal. However, hygiene management in small scale-facilities is still variable and can lead to a product loss, which can reach 25% at certain periods of the year.

Our study carried out within the framework of 2 research programs, regional and European, aimed to study the microbial ecosystem of a small-scale facility producing traditional dry sausages without using starter cultures and to propose solutions to improve hygienic and technological qualities of dry sausage, without change of its typicality

The quantitative and qualitative description of this facility microbial ecosystem showed a weak control of hygiene, a use of non appropriate cleaning and disinfection programs, as well as a low acidity of the product (pH 6.2 – 6.5). Considering the isolates collection made up during this first stage, we identified and characterized lactic acid bacteria (LAB) in order to develop a starter culture and a “barrier flora” from the facility endogenous flora.

The identification of 88 LAB isolates by phenotypic, genotypic and spectroscopic methods showed that *Enterococcus faecium* (25%) and *Vagococcus carniphilus* (12.5%) dominate the facility surfaces and equipment, whereas *Lactococcus garvieae* (18.2%) and *Lactobacillus sakei* (40.9%) dominate the batter and the sausage respectively.

The 36 *Lb. sakei* strains were characterized in respect to their potential use as starter cultures. A multivariate analysis performed on data recorded on strains allowed selecting 2 strains that can be considered in the development of a specific starter culture for this small-scale facility. Moreover, 5 *Vc. carniphilus*, 3 *Ec. faecium*, 1 *Lb. sakei* and 1 *Enterococcus* sp. were tested for displaying antibacterial activity against *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* and/or *Hafnia alvei* in dual species biofilms. Two *Ec. faecium* strains were characterized as being able to constitute a “barrier flora” on the facility surfaces and equipments.

Otherwise, in order to set up appropriate decontamination procedures to this small-scale facility, several decontamination solutions were tested for their selective bactericidal effect on technological, spoilage and pathogenic bacteria isolated from this facility and cultivated in biofilms. The disinfecting chemical used in this workshop proved to be nonselective, destroying the technological flora. In contrary, the solution made of acetic acid pH 5.4 and monolaurin (0.075% w/v) was selective, inhibiting undesirable bacteria with levels being able to reach 4 log₁₀ c.f.u/ml, whereas the technological flora was slightly affected.

These results suggest the possibility of improving the quality of traditional dry sausage by setting up a directed microbial ecology approach in small scale-facilities.

Key words: Small-scale facility, traditional dry sausage, microbial ecosystem, lactic acid bacteria, identification, starter cultures, barrier flora, selective decontamination.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH : Arginine dihydrolase
ADP : Adénosine diphosphate
AFD : Analyse factorielle discriminante
AFLP : Amplified fragment length polymorphism
A.G : Acide gras
ADN : Acide désoxyribonucléique
APT : All purpose tween
ARDRA : Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
Aw : Activité de l'eau
BHI : Brain heart infusion
CEE : Communauté économique européenne
mDAP : Acide *meso*-diaminopimelic
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate
EDTA : Acide éthylènediamine tétracétique
EGTA : Acide éthylèneglycol tétraacétique
ESB : Encéphalopathie spongiforme bovine
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FDP : Fructose-1,6-diphosphate
FNADT : Fonds national d'aménagement et de développement du territoire
GAP : Glycéraldéhyde-3-phosphate
G+C : Guanine+Cytosine
HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point
HSL : Homosérine lactone
IRTF : Infra-rouge à transformée de Fourier
kDa : Kilo Dalton
Mb : Myoglobine
MetMb : Metmyoglobine
MRS : de Man, Rogosa & Sharpe

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NoMb : Nitrosomyoglobine
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR : Polymerase chain reaction
Pi : Phosphate inorganique
PM : Poids moléculaire
ppm : Partie pour million
RAPD : Random amplified polymorphic DNA
RFLP : Restriction fragment length polymorphism
SPE : Substances polymériques extracellulaires
SRV : Station de Recherche sur la Viande
u.f.c : Unité formant colonie
UV : Ultra-violet

Abréviations utilisées pour les genres microbiens

Cb. : *Carnobacterium*
D. : *Debaryomyces*
Ec : *Enterococcus*
K. : *Kocuria*
L. : *Listeria*
Lb. : *Lactobacillus*
Lc : *Lactococcus*
Ln. : *Leuconostoc*
P. : *Penicillium*
Pc. : *Pediococcus*
S. : *Sporolactobacillus*
Sc. : *Staphylococcus*
Vc. : *Vagococcus*
W. : *Weissella*

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Liste des tableaux

Tableau 1. Fréquence des germes rencontrés dans la mûlée (Fournaud, 1982).

Tableau 2. Evolution de l' A_w , du pH et de la perte de poids du saucisson au cours de sa maturation.

Tableau 3. Les principaux micro-organismes utilisés comme ferments en salaison (Nychas & Arkoudelos, 1990; Smith & Palumbo, 1983 et Hammes & Hertel, 1998).

Tableau 4. Choix de l'agent nettoyant (Hyginov, 1995).

Tableau 5. Liste des produits chimiques autorisés en désinfection (Maris, 1995).

Tableau 6. Spectre d'activité des principaux désinfectants (Isoard, 1988).

Tableau 7. Antagonismes et synergies des principaux désinfectants (Isoard, 1988).

Tableau 8. Les tests phénotypiques les plus pertinents pour identifier les bactéries lactiques au niveau du genre.

Liste des figures

Figure 1. Diagramme de fabrication du saucisson sec (Baracco et al., 1990).

Figure 2. Evolution de la flore microbienne d'un saucisson (Fadda, 2002).

Figure 3. Rôle des bactéries lactiques et des coques à coagulase-négative dans la production du saucisson sec (Buckenhüskes, 1993).

Figure 4. Principales voies de fermentation des sucres chez les bactéries lactiques.

Figure 5. Principales étapes et enzymes participant dans la dégradation des protéines du muscle et dans le catabolisme des acides aminés (Talon et al., 2002).

Figure 6. Modèle du mode d'action de la nisine (Breukink et al., 2003).

Figure 7. Formation des biofilms microbiens.

Figure 8. Les cibles des produits désinfectants (Molinier, 1985).

Figure 9. Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible mol % G+C et les genres gram-positif non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

Figure 10. Clef d'identification des bactéries lactiques (Montel et al., 1991).

Figure 11. Principe de la fluorescence.

Figure 12. Dispositifs de spectroscopie de fluorescence frontale et à angle droit.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Liste des produits chimiques autorisés au contact des denrées alimentaires

Annexe 2 : Principaux désinfectants utilisés dans l'agro-alimentaire

Annexe 3 : Liste des publications

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	i
RESUME	ii
ABSTRACT	iii
LISTE DES ABREVIATIONS	iv
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	v
LISTE DES ANNEXES	vi
PRESENTATION GENERALE	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I.- Ecosystèmes microbiens des ateliers fermiers de salaison	5
1. Origines des contaminations	5
1.1. Manipulations post-abattage	5
1.2. L'environnement, les surfaces et l'équipement de l'atelier	6
2. Microbiologie du saucisson sec	6
2.1. Définition du saucisson sec	6
2.2. Flore microbienne du saucisson sec et évolution	6
2.2.1. Flore d'intérêt technologique	7
2.2.1.1. Les bactéries lactiques	7
2.2.1.2. Les staphylocoques/Kocuria	8
2.2.1.3. Les levures/moisissures	9
2.2.2. Flore mixte	9
2.2.3. Flore d'altération	9
2.3. La floreensemencée	9
2.3.1. Définition	10
2.3.2. Principales espèces utilisées comme ferments de maturation	10
2.3.3. Critères de sélection des ferments de maturation	10
2.4. Incidence des ferments sur les qualités hygiénique et organoleptique du produit	12
2.4.1. Incidence des staphylocoques/Kocuria	12
2.4.1.1. La couleur	12
2.4.1.2. La flaveur	13
2.4.1.3. La qualité hygiénique	13
2.4.2. Incidence des levures/moisissures	13
2.4.2.1. La couleur	13
2.4.2.2. La flaveur	14
2.4.2.3. La qualité hygiénique	14
2.4.3. Incidence des bactéries lactiques	14
2.4.3.1. Fermentation des glucides	14
2.4.3.2. Incidence des bactéries lactiques sur les propriétés sensorielles du produit	15
2.4.3.2.1. La texture	15
2.4.3.2.2. La couleur	16
2.4.3.2.3. La flaveur	16
2.4.3.2.3.1. Incidence du métabolisme des glucides	16
2.4.3.2.3.2. Incidence du métabolisme des protéines	17
2.4.3.2.3.3. Incidence du métabolisme des lipides	17

2.4.3.3. Incidence des bactéries lactiques sur la qualité hygiénique du produit	18
2.4.3.3.1. Inhibition de la flore indésirable	18
2.4.3.3.1.1. Par production d'acides organiques.	18
2.4.3.3.1.2. Par production de bactériocines.	19
2.4.3.3.1.3. Par production d'autres métabolites.	21
2.4.3.3.2. Dégradation des amines biogènes	21
3. Maîtrise de l'hygiène dans les ateliers fermiers : Les biofilms et leur élimination	22
3.1. Formation des biofilms	22
3.2. Physiologie des cellules biofilmées	23
3.3. Biofilms et impact dans les ateliers de production	24
3.4. Elimination des biofilms	25
3.4.1. Nettoyage	25
3.4.1.1. Etapes du nettoyage	25
3.4.1.2. Agents de nettoyage	26
3.4.2. Désinfection	26
3.4.2.1. Les agents de désinfection	27
3.4.2.2. Mécanismes de la désinfection	27
3.4.3. Limites des pratiques de nettoyage et de désinfection	28
3.4.3.1. Les substances interférentes	28
3.4.3.2. La conception des équipements	28
3.4.3.3. Les phénomènes de résistance aux désinfectants	28
3.4.3.4. Destruction non sélective des flores	29

II.- Bactéries lactiques : Principales caractéristiques, taxonomie et méthodes

d'identification	30
1. Définition	30
2. Principales caractéristiques	30
3. Taxonomie et classification	30
4. Méthodes d'identification des bactéries lactiques	32
4.1. Analyse phénotypique	32
4.2. Analyse sérologique	33
4.3. Méthodes chimio-taxonomiques	33
4.3.1. Analyse des protéines cellulaires solubles par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)	33
4.3.2. Analyse des acides gras de paroi par chromatographie en phase gazeuse	34
4.4. Méthodes étudiant la structure des acides nucléiques	34
4.4.1. Contenu en guanine et cytosine de l'ADN chromosomique	34
4.4.2. Hybridation ADN-ADN	35
4.4.3. Séquençage de l'ARNr 16S et utilisation	35
4.4.4. Méthodes de typage basé sur l'ADN	36
4.4.4.1. RAPD	36
4.4.4.2. AFLP	37
4.4.4.3. ARDRA	37
4.5. Méthodes spectroscopiques	38
4.5.1. Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)	38
4.5.2. Spectroscopie de fluorescence	39
4.5.2.1. La fluorescence	39
4.5.2.2. La spectroscopie de fluorescence	39
4.5.2.3. Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence	40
4.5.2.4. Les sondes fluorescentes	40

III.- Présentation du sujet **42**

METHODOLOGIE, RESULTATS ET DISCUSSION	43
I.- Description de l'écosystème microbien de l'atelier étudié	43
1. Ecologie microbienne d'un atelier fermier de salaison	43
1.1. Objectifs	43
1.2. Résultats et discussion	44
1.3. Conclusion	45
II.- Identification des bactéries lactiques	55
1. Identification phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées d'un atelier fermier de salaison	55
1.1. Objectifs	55
1.2. Résultats et discussion	55
1.3. Conclusion	57
2. Identification par spectroscopie de fluorescence des bactéries lactiques isolées d'un atelier fermier de salaison	68
1.1. Objectifs	68
1.2. Résultats et discussion	68
1.3. Conclusion	69
III.- Caractérisation et sélection des bactéries lactiques par rapport à leur propriétés technologiques	82
1. Activités antibactériennes des bactéries lactiques à l'encontre de bactéries d'altération et pathogènes isolées aussi du même atelier fermier de salaison : 1- Détection et caractérisation des produits antibactériens	82
1.1. Objectifs	82
1.2. Résultats et discussion	83
1.3. Conclusion	84
2. Caractérisation et sélection de souches de <i>Lactobacillus sakei</i> isolées du saucisson sec fermier, en vue de leur utilisation comme ferments	93
1.1. Objectifs	93
1.2. Résultats et discussion	93
1.3. Conclusion	94
IV.- Amélioration de la qualité hygiénique de l'atelier étudié	105
1. Etude de l'effet bactéricide sélectif de solutions de décontamination sur des biofilms bactériens incluant des bactéries utiles, d'altération et/ou pathogènes	105
1.1. Objectifs	105
1.2. Résultats et discussion	105
1.3. Conclusion	106
2. Activités antibactériennes des bactéries lactiques à l'encontre de bactéries d'altération et pathogènes isolées du même atelier fermier de salaison : 2- Comportement des bactéries pathogènes et d'altération dans des biofilms artificiels binaires incluant une bactérie lactique productrice de bactériocine.	114
1.1. Objectifs	114
1.2. Résultats et discussion	114
1.3. Conclusion	115
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	vii
ANNEXES	ix

PRESENTATION GENERALE

La fermentation est une technique ancienne et universelle de préservation des produits agricoles (Zeuthen, 1995). L'origine des produits fermentés serait l'Orient et remonterait à la préhistoire. Au début, les procédés de fermentation (fermentations acétique, alcoolique et lactique, etc.) étaient principalement utilisés pour préserver les aliments d'origine animale ou végétale. Mais, suite au développement de systèmes de stérilisation et de congélation, les procédés de fermentation ont perdu leur importance comme méthodes de préservation dans les pays industrialisés.

Toutefois, les fermentations sont beaucoup plus que des méthodes de préservation. En effet, les produits fermentés présentent des propriétés sensorielles (arôme, goût, aspect, texture, consistance) plus appréciables que celles des matières premières. L'acidification de la viande hachée pendant la production de saucissons secs peut être obtenue par l'addition de glucono-delta-lactone ou par la fermentation. Dans les deux cas, la durée de vie, l'hygiène et la fermeté du saucisson seront acquises, mais le goût et l'arôme de saucisson sec peuvent être obtenus seulement par la fermentation (Buckenhüskes, 1993).

Au cours du temps, les producteurs ont appris à maîtriser les procédés de fermentation et les produits fermentés sont devenus une classe indépendante d'aliments. L'avènement de l'industrie agroalimentaire, surtout depuis la fin de la deuxième guerre mondiale, a entraîné un changement d'échelle considérable par rapport à l'époque artisanale antérieure. L'industrie et la distribution en aval ont aujourd'hui des exigences focalisées sur le contrôle et la standardisation des produits et non sur leur typicité.

Les récentes crises alimentaires (ESB, etc.) et la standardisation des procédés et des produits se sont traduits par une méfiance des consommateurs envers les produits de l'industrie et par une nostalgie envers les produits d'autrefois (Sylvander, 1994). Ainsi, il y a une tendance au retour au « traditionnel », au « terroir » ou à la recherche de produits à forte identité. Cette authenticité est représentée par les produits fermiers tant au niveau de l'image que du goût (Pujol, 1995). La recherche par le consommateur de produits naturels et authentiques, ainsi que la baisse de l'emploi dans beaucoup de secteurs industriels (Lagrange & Lelièvre, 1995) ont fait que le volume des productions traditionnelle et fermière mises en marché augmente au niveau de toute l'Europe à partir des années 1980 (François, 1995). De plus, ces productions représentent aussi un enjeu socio-économique : la transformation des

produits agricoles de la ferme représente une source supplémentaire de revenu pour les agriculteurs qui pérennise durablement les exploitations et favorise la croissance dans les zones rurales (Lagrange & Lelièvre, 1994).

Parmi les produits fermentés français, on distingue le saucisson sec. C'est une charcuterie crue, fermentée, séchée et maturée. La production européenne de saucisson, qui avoisine 700 000 tonnes, place l'Allemagne au premier rang des producteurs suivi de l'Italie et de l'Espagne. La France occupe la quatrième position avec une production de 95000 tonnes qui comprend essentiellement des produits non fumés (Fischer & Palmer, 1995). Les régions Rhône Alpes et Auvergne assurent plus de 70% de cette production qui est largement artisanale voire fermière.

A l'heure actuelle, il est difficile d'établir des différences entre les produits industriels, artisanaux et fermiers. Le saucisson industriel est additionné de sucres et de ferments et est étuvé. Il est fabriqué selon des procédés standardisés. Un produit artisanal peut être fabriqué à partir de matières premières de différentes origines. La fermentation est liée à une flore qui est soitensemencée par les apports de viande issue des fabrications précédentes, soitensemencée par addition de ferments. Il est additionné de sucre et étuvé. Un produit fermier est fabriqué à partir de matières premières produites au niveau de la ferme et n'est pasensemencé par des ferments. Il n'est généralement ni additionné de sucres ni étuvé. Par conséquent, il présente une faible fermentation et une longue durée de maturation. Ce produit a une saveur très développée et présente une forte irrégularité de qualité (Calvin & Giey, 2000).

La qualité du saucisson sec est définie par son équilibre microbien et par la matière première mise en œuvre. Afin de prévenir les accidents de fabrications et d'accélérer le processus de maturation, l'utilisation de ferments sélectionnés par rapport à des critères de maîtrise technique globale (acidification, vitesse de séchage, couleur, etc.) est devenue une pratique de plus en plus courante. L'introduction de flore exogène de type ferments industriels modifie toutefois la dynamique des communautés microbiennes endogènes à l'atelier fermier et on assiste à des pertes de typicité du saucisson sec fermier. Or une partie de la valeur ajoutée d'un produit fermier provient justement de sa spécificité organoleptique, liée à la flore de l'atelier.

Les salaisonniers sont aujourd'hui confrontés au durcissement de la réglementation concernant la mise aux normes des établissements à faible capacité de production (Directive 93/43 CEE) (Jouve, 1994). Les producteurs fermiers doivent prouver que les produits qu'ils

commercialisent au niveau des marchés sont de bonne qualité hygiénique. Pour cela, les producteurs doivent mettre en place un système de maîtrise des risques selon la méthodologie HACCP. Parallèlement à la mise en place de plans de nettoyage et de désinfection, il apparaît souvent une perte de goût et de typicité des produits. En effet, les procédés de décontamination utilisés dans toute l'industrie agroalimentaire sont drastiques ; éliminant toutes les flores sans distinction. L'inhibition ou la destruction de la flore d'intérêt technologique, responsable des qualités sensorielles du produit, se traduit donc par une perte d'arôme et de saveur, voire même par des problèmes de fabrications lorsque la mûlée n'est pasensemencée par des ferments (Labadie, 1998).

L'Unité de Recherches Typicité des Produits Alimentaires de l'ENITA de Clermont-Ferrand a mis en place un programme de recherche pluridisciplinaire dont l'objectif est de maîtriser la qualité hygiénique et technologique des saucissons secs fermiers tout en maintenant leur typicité ainsi que leur diversité. Dans un premier temps, une typologie des ateliers fermiers de salaison du Massif Central a été établie selon divers critères : matières premières, ingrédients et procédé de fabrication (étapes, durée, températures, etc.). Ces critères ont permis de classer ces ateliers fermiers en six groupes. Chaque groupe étant composé d'ateliers ayant des pratiques similaires (ingrédients, matières premières, procédé de fabrication) (Rason et *al.*, 2004). Des profils sensoriels réalisés sur les produits ont permis de valider ces groupes au niveau organoleptique (Rason et *al.*, 2003). Dans un second temps, l'approche visait à décrire les écosystèmes microbiens de ces ateliers fermiers. Un des objectifs de l'identification des flores d'intérêt technologique est le développement de ferments. Ces ferments élaborés uniquement à partir des flores endogènes de ces ateliers seraient une voie pour préserver la typicité et la diversité des saucissons secs fermiers. Enfin, nous avons envisagé les conditions pour mettre en place des procédures de décontamination sélectives capables de détruire les flores pathogène et d'altération tout en préservant la flore d'intérêt technologique ; de façon à assurer de bonnes qualités hygiénique et organoleptique des saucissons secs fermiers. Mes travaux de recherches, menés dans le cadre de 2 programmes, régional (financement FNADT) et européen (Tradisausage), se sont structurés autour de ces axes de recherches.

Ce manuscrit est organisé en deux parties principales. La première partie est une revue bibliographique faisant le point sur les écosystèmes microbiens des ateliers de salaison, ainsi que sur les bactéries lactiques et leur incidence dans la fabrication du saucisson sec. La deuxième partie présente, sous formes de publications scientifiques, la méthodologie et les

résultats discutés. Dans un premier temps, l'écosystème d'un atelier fermier de salaison a été décrit. L'étape suivante a consisté à identifier la flore lactique. Par la suite, les isolats lactiques ont été caractérisés dans un but de sélection de souches pouvant entrer dans l'élaboration d'un ferment fermier. Enfin, des solutions de décontamination sélective et des souches pouvant jouer le rôle de « flore barrière » ont été sélectionnées dans un but de maîtrise de l'hygiène au niveau de l'atelier. Des perspectives sont proposées conjointement à la conclusion générale.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.- Ecosystèmes microbiens des ateliers fermiers de salaison

La fermentation dans les saucissons secs fermiers est réalisée par la flore naturelle de la matière première et par la flore endogène propre à chaque atelier. La fermentation n'étant pas contrôlée, les qualités sensorielles typiques des produits fermiers dépendent étroitement de la dynamique des communautés microbiennes endogènes. Décrire, de façon détaillée l'écosystème microbien de l'atelier de production est une étape préalable au développement des qualités hygiénique et organoleptique du produit fermenté (Duthoit et *al.*, 2003). Certaines questions fondamentales, d'ordre écologique, nécessitent alors des réponses (Fleet, 1999) :

- ❖ Quelles espèces/souches microbiennes sont associées à la production, « de la ferme jusqu'à la fourchette » ou « de l'étable à l'assiette » ?
- ❖ D'où viennent elles ?
- ❖ Quels facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques de production affectent leurs survie et croissance ?
- ❖ Quelles sont leurs activités biochimiques ?
- ❖ Comment la croissance et l'activité de chaque organisme influencent la qualité du produit et sa fonctionnalité ?
- ❖ Quels organismes sont essentiels à la production et lesquels sont nuisibles ?

1. Origines des contaminations

1.1. Manipulations post-abattage

Lors de l'abattage, de l'éviscération et de la découpe de l'animal, les micro-organismes entrent en contact avec la viande saine et la contaminent. Les germes les plus importants quantitativement sont ceux présents dans l'air ambiant de l'atelier, sur le cuir et sur les poils des animaux (Fournaud & Lauret, 1985).

Les viandes, lors de leur découpe et diverses préparations, sont souvent souillées par les bactéries commensales de l'homme (Sheridan et *al.*, 1992). Elles ont pour origine les mains, la cavité bucco-nasale et/ou les vêtements. Parallèlement, le non respect des mesures

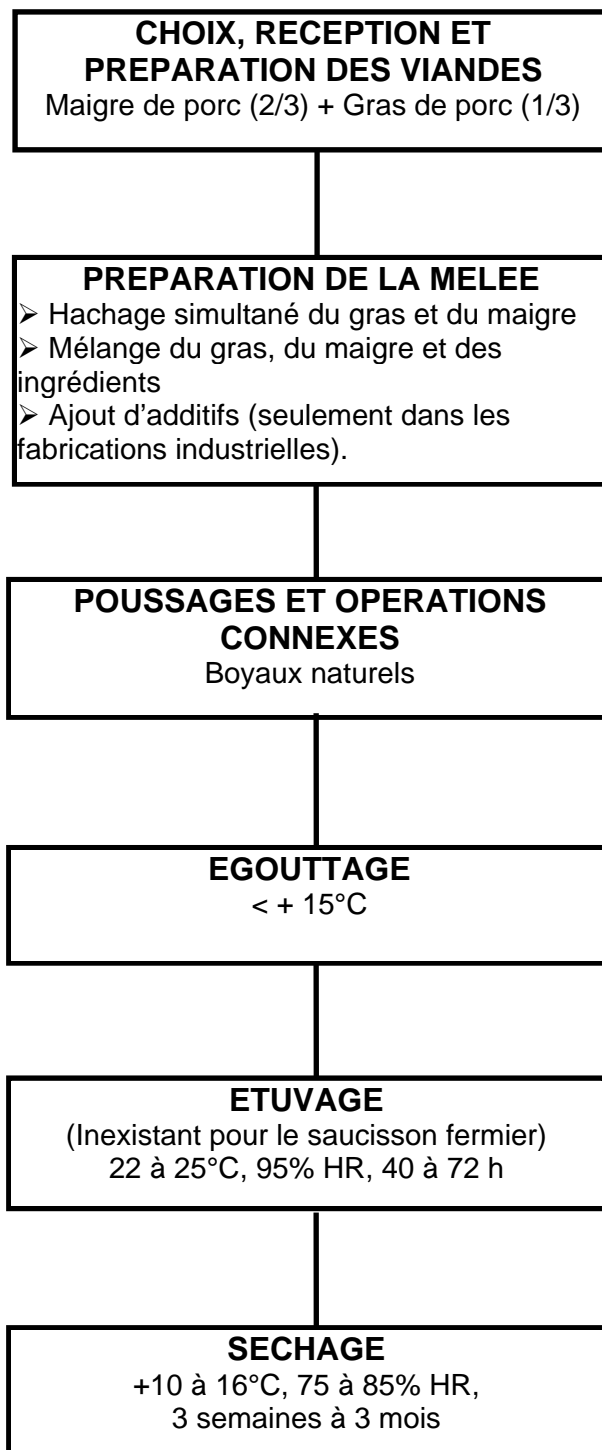


Figure 1. Diagramme de fabrication du saucisson sec (Baracco et *al.*, 1990)

d'hygiène du personnel telles que la propreté corporelle, le port de charlotte, de masques, de gants ou de tabliers propres, est une source potentielle de contamination (Leyral et *al.*, 1994).

L'eau d'adduction qui contient en suspension des micro-organismes endogènes, est aussi une source de contamination. Ces micro-organismes peuvent aussi provenir du sol et, parfois, des matières fécales (*Enterobacterium*, *Clostridium* spp.) de l'homme et des animaux, conséquences d'une pollution domestique (Ingham & Moody, 1990).

1.2. L'environnement, les surfaces et l'équipement de l'atelier

Beaucoup d'études ont montré que lorsque les animaux sont abattus, une flore microbienne reste attachée à la surface des carcasses (Borch et *al.*, 1996 ; Gill & Jones, 2000) et en dépit des procédés de décontamination (emploi d'eau chaude, d'acide organique, ou de solutions de phosphate), une partie de la flore microbienne survit (Bell, 1997 ; Yu et *al.*, 1999). Cette flore résiduelle entre en contact avec les surfaces des équipements dans les salles de découpe (Rahkio & Korkeala, 1996 ; Giovannacci et *al.*, 2001). Elle colonise alors les surfaces et va souiller les produits sains en contact. Haeghebaert et *al.* (1998) ont suggéré que 40,5% des toxi-infections alimentaires enregistrées en France, en 1996, ont été liées à une contamination par les équipements ; d'où l'intérêt de maîtriser cette contamination.

2. **Microbiologie du saucisson sec**

2.1. Définition du saucisson sec

Le saucisson sec est défini comme un mélange de maigre et de gras additionné de sel, nitrate et/ou nitrite, sucre et épices (poivre noir au moins), qui est embossé dans des boyaux, et qui est sujet à un temps de fermentation et puis à un processus de séchage (Fig. 1). L'acidification engendrée par la fermentation des sucres ainsi que la diminution de l' a_w suite à l'addition de sel et au séchage, favorisent l'inhibition des bactéries pathogènes et d'altération. Le produit fini est donc caractérisé par une longue durée de conservation (Hugas & Monfort, 1997).

2.2. Flore microbienne du saucisson sec et évolution

La flore microbienne endogène du saucisson a pour origine principale la contamination de la matière première et la flore endogène propre à l'atelier (Buckenhüskes, 1993). La mêlée est contaminée par des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Kocuria* (*Micrococcus*), *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brochothrix*, ainsi que des entérobactéries, des levures et des

Tableau 1. Fréquence des germes rencontrés dans la môle (Fournaud, 1982)

GRAM	SENSIBILITE A L'OXYGENE	DOMINANTS	SOUS DOMINANTS	RARES
Gram positif	aérobies	<i>Micrococcus</i> <i>Bacillus</i>	<i>Arthrobacter</i> <i>Kurthia</i> <i>Corynebacterium</i>	
	aérobies facultatifs	<i>Staphylococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Brochothrix</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Bacillus</i> <i>Enterococcus</i>	<i>Pediococcus</i> <i>Leuconostoc</i>
	anaérobies		<i>Clostridium</i>	
Gram négatif	aérobies	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinobacter</i> <i>Flavobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Alteromonas</i> <i>Chromobacterium</i>
	aéro-anaérobies	<i>Flavobacterium</i> <i>Entérobactéries</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Alteromonas</i> <i>Chromobacterium</i>

Tableau 2. Evolution de l' A_w , du pH et de la perte de poids du saucisson au cours de sa maturation

Facteur physique	Etape de fabrication	Etape de maturation	
		Après étuvage	Après séchage
A_w ^a	0,94 – 0,98	0,90 – 0,93	0,84 – 0,88
pH ^b	6,1 – 5,7	5,0 – 5,4	5,1 – 5,9
Perte de poids ^a	0 – 6%	6 – 20%	15 – 30%

a : Baracco et al. (1990).

b : Viallon (1996).

moisissures (Fournaud, 1976 ; Montel et *al.*, 1994). Le Tableau 1 détaille leur fréquence dans la mêlée. La flore endogène propre à l'atelier se montre plus ou moins complexe, avec des charges bactériennes variables d'un atelier à l'autre (Fournaud, 1976).

Les conditions environnementales favorisent la croissance d'une flore microbienne spécifique (Grazia et *al.*, 1986; Hammes et *al.*, 1990). Ainsi, les associations microbiennes endogènes qui dominent au niveau du saucisson sont sélectionnées par le pH, l'activité de l'eau (Tab. 2), le potentiel d'oxydoréduction, la concentration en sel, la disponibilité des nutriments et par les relations existants entre les différentes populations bactériennes (Rebecchi et *al.*, 1998). Les équilibres et les cinétiques de croissance sont régis en partie par l'activité plus ou moins élevée des lactobacilles et de la flore lactique en général : une forte activité couplée à une baisse rapide du pH entraîne une inhibition importante de tous les autres germes y compris les coques ; ce qui peut entraîner des défauts de couleur et d'insuffisance d'arôme.

D'une manière générale, lorsque le produit final présente de bonnes caractéristiques hygiénique et organoleptique, trois grands groupes de bactéries peuvent être distingués.

2.2.1. Flore d'intérêt technologique

Ce groupe comprend essentiellement les bactéries lactiques, les staphylocoques/*Kocuria* ainsi que les levures/moisissures qui se développent dès le début de l'étuvage (Fournaud, 1976). Leur rôle dans la fabrication du saucisson sec est détaillé dans le paragraphe 2.4.

2.2.1.1. Les bactéries lactiques

Les principaux genres lactiques isolés des saucissons secs sont *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* et *Enterococcus* (Montel *al.*, 1991, Papamanoli et *al.*, 2003). *Lactobacillus* est dominant dans les saucissons ; néanmoins dans certains saucissons faiblement acidifiés, les populations de *Lactobacillus* et d'*Enterococcus* sont presque équilibrées (Dellapina et *al.*, 1994).

Lactobacillus sakei, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum* et *Weissella viridescens* sont les espèces les plus fréquemment isolées des produits carnés (Laban et *al.*, 1978, Montel & Talon, 1986, Montel et *al.*, 1991). *Lactobacillus farciminis* et *Lactobacillus alimentarius* peuvent être occasionnellement isolées. Toutefois, c'est l'espèce *Lb. sakei* qui domine la flore lactique des saucissons produits en Europe du Sud (Coppola et *al.*, 1998, Samelis et *al.*, 1998; Santos et

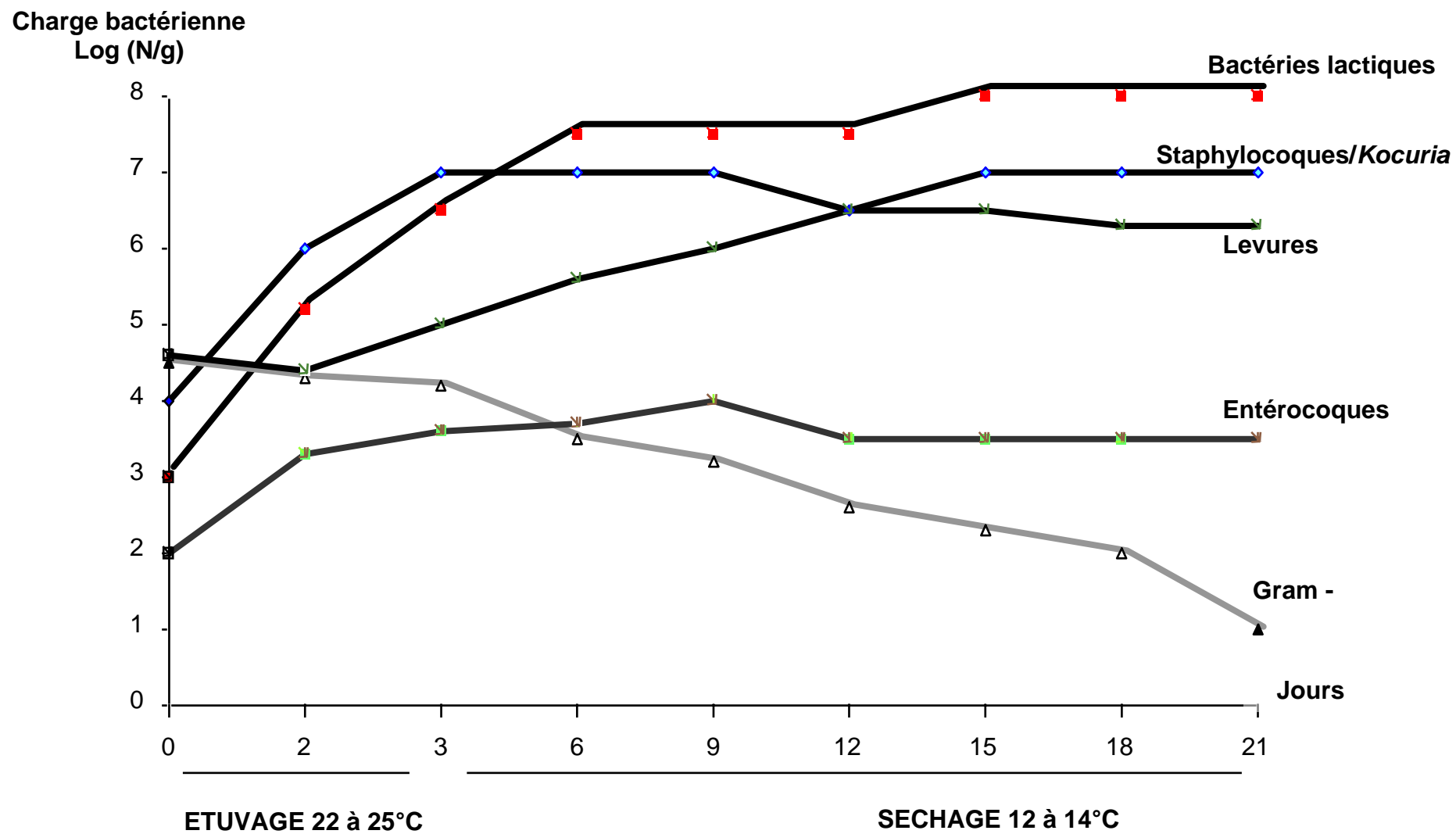


Figure 2. Evolution de la flore microbienne d'un saucisson (Fadda, 2002)

al., 1998 ; Parente et *al.*, 2001). Les autres espèces ne représentent qu'une faible proportion de la flore lactique, même si elles sont fréquemment isolées. Dans les conditions régnant dans le saucisson fermenté, *Lb. sakei* a montré qu'elle était plus compétitive que *Lactobacillus pentosus*, présentant une courte phase de latence, un taux de croissance maximal et une population finale plus nombreuse (Dossmann et *al.*, 1996).

Les bactéries lactiques, qui sont généralement présentes en faible nombre (10^2 - 10^3 u.f.c/g) dans les matières premières (Parente et *al.*, 2001), dominent rapidement dès la mise en place du processus de la fermentation grâce à l'environnement anaérobique, la présence de sel, de nitrate et de nitrite et surtout du fait de leur aptitude à réduire le pH (en produisant de l'acide lactique à partir des glucides) et à produire des bactériocines (Hammes & Knauf, 1994). Au cours du séchage, leur taux peut atteindre 10^6 à 10^9 u.f.c/g (Fig. 2) alors que les *Carnobacterium* disparaissent (Montel et *al.*, 1994).

Dans certains saucissons fermiers étuvés à basse température, l'explosion des lactobacilles n'a lieu que vers le 10^{ème} jour de séchage et la concurrence bactérienne ne protège pas les saucissons pendant ces premiers jours : la flore initiale reste stable à 10^5 germes et sa composition spécifique entraînerait les goûts spécifiques de chaque fabrication (Bannari, 1998).

2.2.1.2. Les staphylocoques/Kocuria

Les staphylocoques et plus occasionnellement *Kocuria* sont présents tout au long de la fabrication et sont plus nombreux que les lactobacilles en début d'étuvage. Leur concentration est d'environ 10^6 u.f.c/g au départ, puis en fin de maturation leur taux reste stable ou décroît légèrement (10^5 à 10^6 u.f.c/g) (Nychas & Arkoudelos, 1990) (Fig. 2). Alors que les *Kocuria* sont aérobies, les staphylocoques sont aérobies facultatifs et s'adaptent mieux au milieu saucisson sec. De ce fait, les staphylocoques sont beaucoup plus abondants que les *Kocuria* dans le saucisson (Coppola et *al.*, 1997; Papamanoli et *al.*, 2002).

Staphylococcus xylosus semble être l'espèce dominante, quel que soit le type de fabrication (Larpen-Gourgand et *al.*, 1993; Coppola et *al.*, 1997). Cette espèce est capable de résister en présence de 15% de sel à des a_w basses de 0,86. *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus warneri* sont aussi fréquemment isolés (Montel et *al.*, 1992). *Kocuria varians* et *Kocuria kristinae* semble être les principales *Kocuria* isolées du saucisson sec (Coppola et *al.*, 1997; Papamanoli et *al.*, 2002).

2.2.1.3. Les levures/moisissures

Les levures sont halotolérantes (15 à 20% de sel) et tolèrent une a_w basse (0,87). L'espèce dominante est *Debaryomyces hansenii* (Téléomorphe de *Candida famata*) (Metaxopoulos et al., 1996; Encinas et al., 2000; Gardini et al., 2001). D'autres levures sont aussi isolées du saucisson sec, il s'agit de *Candida zeylanoides* (Boissonnet et al., 1994; Encinas et al., 2000), *Candida deformans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* (Encinas et al., 2000; Gardini et al., 2001) et *Pichia* (Larpent-Gourgaud et al., 1993).

Parmi les moisissures isolées du saucisson, on distingue *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium olsonii*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus candidatus* (Grazia et al., 1986 ; Sunesen & Stahnke, 2003).

2.2.2. Flore mixte

Ce groupe comprend les bactéries à Gram positif telles que *Brochotrix* qui se multiplient pendant la phase d'étuvage puis tendent à diminuer ou à se stabiliser pendant la maturation (Fournaud, 1976).

2.2.3. Flore d'altération

Ce groupe comprend essentiellement les bactéries d'altération à Gram négatif (*Acinetobacter*, *Pseudomonas* et les entérobactéries) et à Gram positif (*Arthrobacter*). Un développement excessif de cette flore associé à de mauvaises conditions de fabrication peut être à l'origine de saucissons dont les qualités sont défectueuses. Ainsi, un défaut à l'embossage favorise le développement des *Pseudomonas* qui altèrent alors la texture du produit (saucisson mou). En outre, une forte contamination en entérobactéries de la mûlée peut entraîner la formation de cavités (saucisson creux).

Pendant le séchage, les bactéries à Gram-négatif, comme *Pseudomonas*, voient leur nombre diminuer rapidement, alors que les entérobactéries voient leur nombre diminuer plus lentement et certaines survivent en fin de séchage, ce qui peut être le cas des salmonelles (Fournaud, 1976). Le nitrite exerce une action bactériostatique, voir bactéricide, notamment sur les *Clostridium* (*perfringens* et *botulinum*) et les salmonelles (Dabin & Jussiaux, 1994).

2.3. La flore ensemencée

La qualité du saucisson sec est largement tributaire de son équilibre microbien. Afin de prévenir les accidents de fabrications (défauts de texture, de couleur, de flaveur et des

Tableau 3. Les principaux micro-organismes utilisés comme ferments en salaison (Nychas & Arkoudelos, 1990; Smith & Palumbo, 1983 et Hammes & Hertel, 1998).

Bactéries lactiques	Staphylocoques/<i>Kocuria</i>	Levures	Moisissures
<i>Lactobacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Candida</i>	<i>Penicillium</i>
<i>sakei</i>	<i>carnosus</i>	<i>lipolytica</i>	<i>nalgiovense</i>
<i>curvatus</i>	<i>xylosus</i>	<i>famata</i>	<i>chrysogenum</i>
<i>plantarum</i>			
<i>pentosus</i>	<i>Kocuria varians</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	
<i>Pediococcus</i>			
<i>acidilacticii</i>			
<i>pentosaceus</i>			

gonflements dus à la production de CO₂), de prévenir les contaminations par des bactéries pathogènes et d'accélérer le processus de maturation, des ferments sélectionnés sont utilisés.

2.3.1. Définition

Les ferments sont des micro-organismes vivants utilisés dans la fabrication d'un produit pour en assurer la stabilité et les qualités sensorielles, tout en respectant la sécurité du consommateur (Buckenhüskes, 1993).

2.3.2. Principales espèces utilisées comme ferments de maturation

Les ferments utilisés dans la fabrication du saucisson sec sont souvent des associations de plusieurs groupes microbiens: bactéries lactiques, staphylocoques/*Kocuria* et levures/moisissures. Les principales espèces utilisées sont résumées dans le Tableau 3. Ces ferments sont généralementensemencés à un taux de 10⁶ germes revivifiables/g de mêlée (Baracco et al., 1990).

2.3.3. Critères de sélection des ferments de maturation

Les buts recherchés lors de l'utilisation d'un ferment dans la production du saucisson sont l'obtention d'arômes et de saveurs typiques, une longue durée de conservation, un fort antagonisme contre les bactéries pathogènes, une formation rapide de la couleur de salaison et un meilleur aspect et une meilleure tenue du produit (Lücke et al., 1990). Aux vues de ces objectifs, il est possible de définir des critères de sélection pour l'utilisation de micro-organismes dans la fermentation du saucisson (Buckenhüskes, 1993):

1. Absence de pathogénicité et de toxicité : Un soin particulier est apporté à la sélection des staphylocoques dont certaines espèces peuvent libérer des toxines et présenter un risque de pathogénicité. C'est le cas de certaines souches de *Sc. xylosus* (Vernozy-Rozand et al., 1996). Un soin particulier est aussi apporté à la sélection des moisissures dont certaines espèces de *Penicillium* ou d'*Aspergillus* sont toxigènes (Sunesen & Stahnke, 2003).
2. Une production rapide d'acide lactique au début de la fermentation afin de contribuer à l'inhibition des flores indésirables, au développement de la couleur, de la texture et de la saveur du produit. Néanmoins l'acidification ne doit pas être excessive de façon à prévenir les problèmes de décoloration (due à l'inhibition des staphylocoques/*Kocuria*) et de formation de gaz.

3. Des espèces homofermentaires, étant donné que les espèces hétérofermentaires produisent une grande quantité d'acide acétique induisant une odeur âcre. En plus la formation de grandes quantités de CO₂ génère le développement de cavités dans le produit fini.
4. Croissance à différentes températures, taux de sel et valeurs de pH : Les ferments utilisés dans la production du saucisson sec doivent être capables de se développer en anaérobiose, en présence de sel et de nitrite, à des pH acides (pH<6) et à des températures comprises entre 13°C et 25°C. Le but étant de s'adapter aux conditions de fabrication et d'être plus compétitives durant la fermentation.
5. Persistance pendant toute la durée de fermentation et de maturation afin de contrôler la fermentation et prévenir tout problème de fabrication. Ces ferments doivent dominer la flore et présenter une vitesse de croissance plus importante que celle de la flore naturelle (Lücke & Hechelmann, 1987).
6. Pas de formation de peroxyde afin de prévenir les problèmes de décoloration et de rancidité (cf. paragraphe 2.4.1.1.).
7. Catalase positive afin de dégrader les peroxydes d'hydrogène produits par d'autres bactéries, notamment lactiques (cf. paragraphes 2.4.1.1. et 2.4.3.2.2.).
8. Lactose négatif afin de prévenir un excès d'acidification consécutif à la fermentation, aussi, de la poudre de lactose sur lesquelles la bactérie est fixée.
9. Activités aminopeptidasiques afin de contribuer à la saveur du produit (cf. paragraphe 2.4.3.2.3.2.).
10. Pas de formation d'amines biogènes afin de prévenir des problèmes de santé pour les consommateurs (cf. paragraphe 2.4.1.3.).
11. Pas de formation d'exopolysaccharides : Certaines souches de *Lb. sakei* ont été caractérisées comme capables de former des exopolysaccharides (Mäkelä, 1992), ce qui peut influencer la texture des saucissons.
12. Tolérance ou même synergie à d'autres souches microbiennes du ferment : En effet, certaines souches de *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* peuvent inhiber, en plus des bactéries

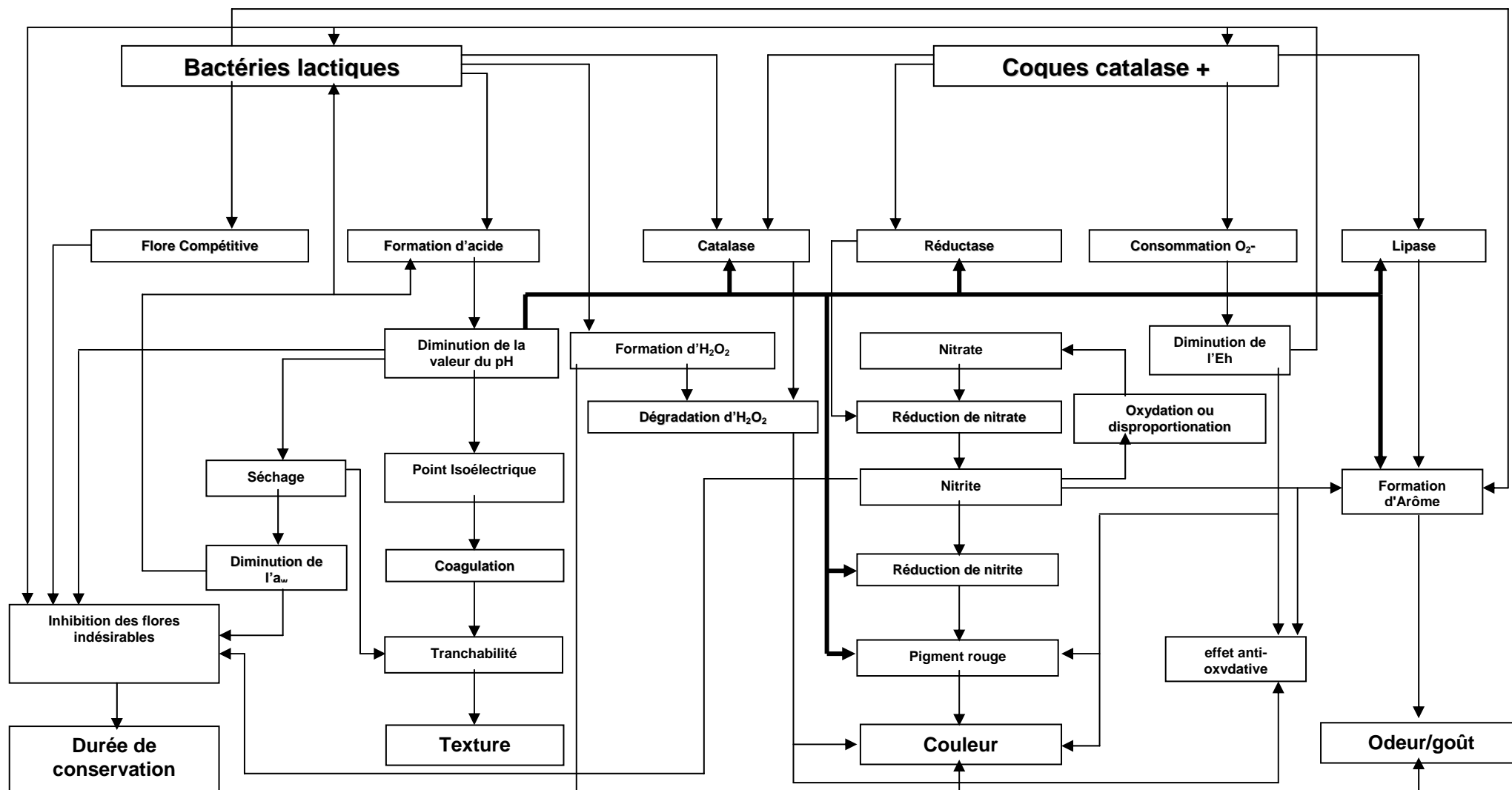


Figure 3. Rôle des bactéries lactiques et des coques à coagulase-négative dans la production du saucisson sec (Buckenhüskes, 1993).

indésirables, des bactéries utilisées dans la préparation de ferments tel *K. varians* (Hammes et al., 1990).

13. Production de bactériocines contre les flores pathogènes et d'altération afin d'inhiber les bactéries pathogènes et d'altération (cf. paragraphe 2.4.3.3.1.2.).

2.4. Incidence des ferments sur les qualités hygiénique et organoleptique du produit

Les rôles des principaux acteurs de la production du saucisson sec, en l'occurrence les bactéries lactiques et les staphylocoques sont résumés dans la figure 3. Nous présenterons de façon succincte le rôle des staphylocoques/*Kocuria* et celui des levures/moisissures, puis nous détaillerons celui des bactéries lactiques.

2.4.1. Incidence des staphylocoques/*Kocuria*

Les principaux rôles des staphylocoques/*Kocuria* sont le développement de la couleur et de la flaveur typique de salaison ainsi que la contribution à l'amélioration de la qualité hygiénique du saucisson.

2.4.1.1. La couleur

L'activité nitrate réductase des staphylocoques/*Kocuria* permet de réduire le nitrate en nitrite. Ce dernier, va s'oxyder sous l'action du pH ou par l'activité nitrite réductase des bactéries pour donner de l'oxyde d'azote (Nychas & Arkoudelos, 1990). L'oxyde d'azote interagit avec la myoglobine (Mb) pour former la nitrosomyoglobine (NOMb) et la metmyoglobine (MetMb), qui se réduit en NOMb au cours du séchage (Chasco et al., 1996; Hugas & Monfort, 1997). NOMb est le pigment responsable de la couleur rouge typique de salaison.

L'activité catalase des staphylocoques/*Kocuria* permet de détruire les peroxydes d'hydrogène produits par certaines bactéries lactiques et qui peuvent interagir avec NOMb pour former un pigment vert appelé cholemyoglobine. Ce dernier est responsable des problèmes de verdissement pouvant être observés sur certains saucissons (Nychas & Arkoudelos, 1990). Par conséquent, les staphylocoques/*Kocuria* contribuent au développement et à la stabilité de la couleur.

2.4.1.2. La flaveur

Les espèces les plus recherchées en salaison sont *Sc. xylosus* et *Sc. carnosus* car elles développent un arôme de salaison prononcé. Ces espèces sont caractérisées par des propriétés antioxydantes évitant le rancissement des produits (Talon et al., 2002). Elles dégradent les acides aminés en composés aromatiques (aldéhydes, alcools, acides, etc.). Elles synthétisent des méthyle cétones impliquées dans la flaveur des salaisons (Montel et al., 1996; Talon et al., 2002 ; Stahnke et al., 2002).

2.4.1.3. La qualité hygiénique

Les amines biogènes peuvent être présentes en grandes concentrations dans les produits fermentés obtenus à partir de matières premières contenant une grande quantité de protéines (Martuscelli et al., 2000). Les amines biogènes, principalement l'histamine, la tryptamine, la tyramine, la cadavérine, la putrécine et la phényléthylamine sont considérées comme des composés indésirables à cause de leurs éventuels effets toxiques (Silla Santos, 1996). Une consommation excessive de ces amines peut conduire à des problèmes de santé suite à leurs actions sur les systèmes nerveux, gastrique et intestinal et sur la pression artérielle (Suzzi & Gardini, 2003).

Certains staphylocoques/*Kocuria* sont capables de produire des amines biogènes. C'est le cas de certaines souches de *Sc. xylosus* (Masson et al., 1996) et de *Sc. carnosus* (Eerola et al., 1996). Au contraire, certaines souches de *Sc. xylosus* et de *K. varians* (Martuscelli et al., 2000 ; Fadda et al., 2001) sont capables de dégrader ces amines grâce à leur activité amine oxydase (Gardini et al., 2002).

En outre, Certaines souches de *Sc. xylosus* et *Sc. carnosus* sont aussi caractérisées par des activités anti-*Listeria* (Papamanoli et al., 2002), ce qui peut contribuer à l'amélioration de la qualité hygiénique des saucissons secs.

2.4.2. Incidence des levures/moisissures

Les levures et/ou moisissures contribuent à la fleur de surface et participent essentiellement au développement de la flaveur de salaison.

2.4.2.1. La couleur

Les levures et moisissures présentent des activités catalase et peroxydase capables de consommer l'O₂ et de dégrader les peroxydes d'hydrogène, ce qui prévient les problèmes de verdissement et de rancissement (Sunesen & Stahnke, 2003).

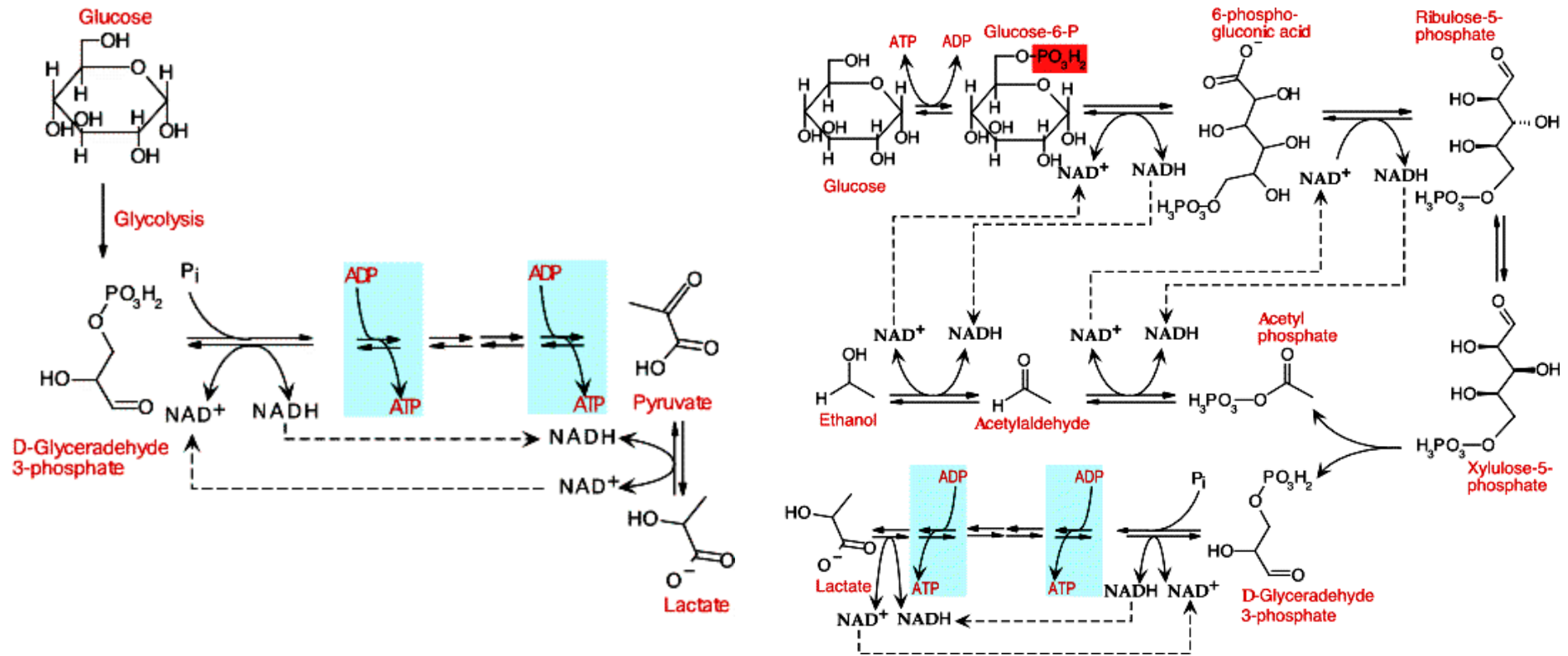


Figure 4. Principales voies de fermentation des sucres chez les bactéries lactiques

4-1. Voie homofermentaire

4-2. Voie hétérofermentaire

2.4.2.2. La flaveur

Les levures ont une action lipolytique et jouent un rôle dans l'aromatisation du produit en produisant des composés volatiles aromatiques (Olesen & Stahnke, 2000). *D. hansenii* est capable d'augmenter le pH en assimilant l'acide lactique lorsque les réserves glucidiques sont épuisées.

Les moisissures contribuent à la formation du goût et de la flaveur typique du saucisson sec, résultant de l'oxydation des lactates, de la protéolyse, de la dégradation des acides aminés, de la lipolyse et de la β -oxydation (Grazia et al., 1986).

2.4.2.3. La qualité hygiénique

Certaines souches de *P. nalgiovensis* présentent des activités anti-bactériennes à l'encontre de *Listeria monocytogenes* (Glenn et al., 1989).

2.4.3. Incidence des bactéries lactiques

Lb. sakei, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Pediococcus acidilacticii* et/ou *Pediococcus pentosaceus* sont utilisés comme ferments en salaison. Ces bactéries ont comme principal rôle de fermenter les glucides afin d'acidifier le milieu. Elles participent ainsi amplement aux qualités hygiénique et organoleptique du saucisson sec. Elles assurent une durée longue de conservation du produit et participent au développement de la texture, la couleur et la flaveur du produit fermenté (Fig. 3).

2.4.3.1. Fermentation des glucides

Deux principales voies de fermentation d'hexoses (ex: glucose) peuvent être distinguées chez les bactéries lactiques (Fig. 4). La glycolyse (Voie d'Embden-Meyerhof) engendre, en général, exclusivement de l'acide lactique comme produit final (espèces homofermentaires). Elle est caractérisée par la scission du fructose-1,6-diphosphate (FDP), moyennant une FDP aldolase, en deux trioses phosphate, glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en équilibre. Le GAP est, en premier lieu, converti en 2 molécules de pyruvate, qui sont ensuite réduites en acide lactique (Axelsson, 1998; Kandler, 1983). La voie 6-phosphogluconate / phosphocétolase engendre, en plus de l'acide lactique, des quantités non négligeables de produits finaux comme l'éthanol, l'acide acétique et le CO₂ (espèces hétérofermentaires). Elle est caractérisée par l'oxydation du glucose-6-phosphate suivie d'une décarboxylation. Le pentose est scindé en une molécule C-3 (glyceraldéhyde-3-phosphate) et

une molécule C-2 (acétyl-phosphate) moyennant une phosphocétolase. Il en résulte la formation de quantités équimolaires de CO₂, de lactate et d'éthanol à partir de l'hexose.

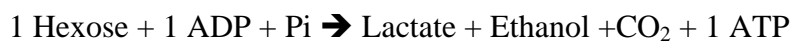
Les bactéries lactiques hétérofermentaires ont l'aptitude d'utiliser les accepteurs d'électrons externes pour régénérer le NADH et donc gagner plus d'énergie. Suite à cette voie métabolique alternative, l'acétate sera formé à la place de l'éthanol (Axelsson, 1998)

Les principales voies de fermentation des hexoses peuvent être résumés comme suit :

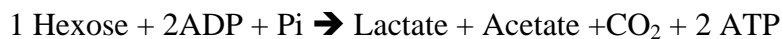
Homofermentation:



Hétérofermentation:



ou (si accepteurs d'électron externes)



En se basant sur les caractéristiques fermentaires, les lactobacilles peuvent être divisés en 3 groupes: homofermentaires stricts, hétérofermentaires stricts et hétérofermentaires facultatifs. Les lactobacilles strictement homofermentaires dégradent les hexoses, exclusivement, en acide lactique et ne fermentent pas les pentoses ou le gluconates. Les lactobacilles strictement hétérofermentaires dégradent les hexoses en acide lactique et en d'autres produits comme l'acide acétique, l'éthanol et le CO₂; et dégradent les pentoses en acides lactique et acétique. Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs fermentent les hexoses en acide lactique et peuvent produire CO₂ à partir de gluconate et non à partir de glucose. Ils fermentent aussi les pentoses pour produire les acides lactique et acétique.

La flore lactique homofermentaire est la plus recherchée en salaison; alors que la flore hétérofermentaire n'est pas désirée du fait qu'elle peut entraîner des goûts acides et des défauts technologiques par production de gaz.

2.4.3.2. Incidence des bactéries lactiques sur les propriétés sensorielles du produit

2.4.3.2.1. La texture

En fermentant les glucides en acide lactique, les bactéries lactiques favorisent une diminution du pH de la mûlée. Ce dernier, diminue jusqu'à s'approcher du point isoélectrique des protéines. Les protéines du muscle coagulent alors formant ainsi un gel protéique, ce qui entraîne une perte de jutosité et de poids. Parallèlement le sel, ajouté à la mûlée, favorise la solubilisation des protéines permettant ainsi la liaison lors de la formation du gel et la tenue

du produit (Ordóñez et *al.*, 1999). Il en résulte une modification de la texture responsable de la tranchabilité, de la fermeté (subjectivement perçue) et de la cohésion retrouvées dans le produit final (Hugas & Monfort, 1997).

2.4.3.2.2. La couleur

Comme mentionné précédemment, l'activité nitrate réductase des staphylocoques/*Kocuria* est responsable de la réduction des nitrates en nitrites. Ces derniers seront réduits en oxyde d'azote qui va réagir avec la myoglobine pour donner la nitrosomyoglobine, responsable de la couleur de salaison. L'étape de réduction des nitrites en oxyde d'azote peut être réalisée de façon marginale grâce à des nitrites réductases ; néanmoins, les nitrites sont spontanément réduits en conditions acides (pH 5.0 – 5.5) (Nychas & Arkoudelos, 1990). Ainsi, les bactéries lactiques participent au développement de la couleur des salaisons en acidifiant le milieu (Chasco et *al.*, 1996; Hugas & Monfort, 1997).

Parallèlement au fait que certaines bactéries lactiques produisent du peroxyde d'hydrogène pendant le catabolisme des lactates, en présence de l'oxygène. Certaines espèces ont été caractérisées comme possédant une activité catalase hème-dépendante, qui peut être active dans les produits carnés étant donné que ces substrats contiennent d'abondantes sources héminiques (Hertel et *al.*, 1998). Cette activité hydrolyse le peroxyde d'hydrogène et prévient ainsi les problèmes de décoloration et de rancidité (Hertel et *al.*, 1998). *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* et *Pc. acidilacticii* utilisés comme ferments dans la production de saucisson ont été caractérisés comme possédant cette activité (Mares et *al.*, 1994). Les gènes *katA* et *katL* codant pour une activité catalase hème-dépendante chez *Lb. sakei* (Knauf et *al.*, 1992) et *Lb. plantarum* (Abriouel et *al.*, 2004) respectivement, ont été séquencés. Récemment, Noonpakdee et *al.* (2004) ont montré que l'expression du gène *katA* de *Lb. sakei* dans une souche catalase-déficiente de *Lb. plantarum* (TISTR850) isolée du saucisson, permettait à la souche déficiente de dégrader le peroxyde d'hydrogène et l'activité catalase était 3 fois supérieure à celle produite par la souche naturelle de *Lb. sakei*. De plus, lorsque le gène était exprimé, l'oxydation des lipides était significativement inférieure par rapport au cas où la souche catalase-déficiente est utilisée.

2.4.3.2.3. La flaveur

2.4.3.2.3.1. Incidence du métabolisme des glucides

Le métabolisme des glucides engendre principalement la formation d'acide lactique, particulièrement l'acide D-lactique, qui confère un goût acide au saucisson (Talon et *al.*,

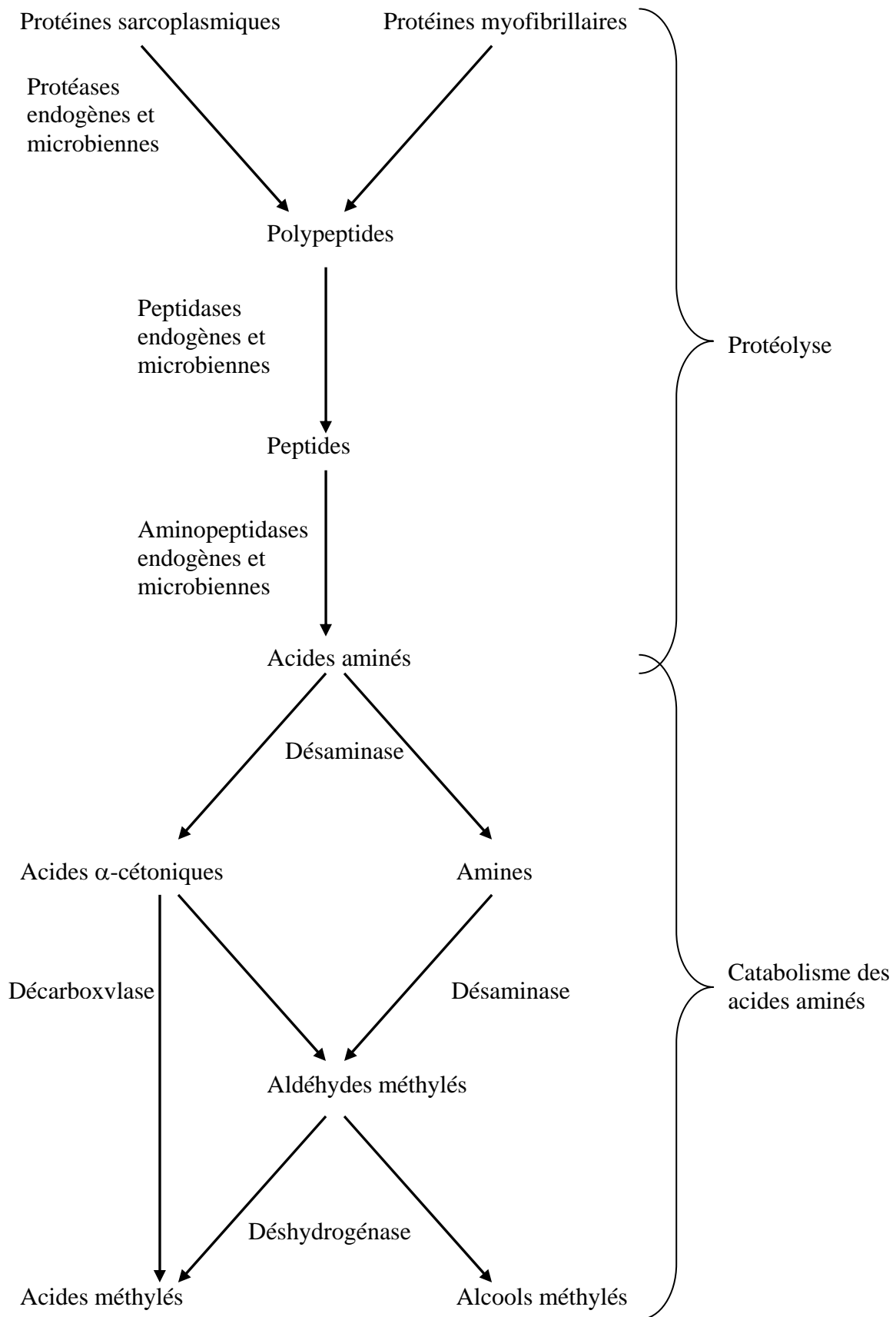


Figure 5. Principales étapes et enzymes participant dans la dégradation des protéines du muscle et dans le catabolisme des acides aminés (Talon et *al.*, 2002)

2002). Les quantités d'acide lactique (D-lactate) sont de l'ordre de 90 $\mu\text{mol/g}$ de matière sèche au début du procédé et peuvent atteindre 260 $\mu\text{mol/g}$ de matière sèche après 40 jours de maturation (Dainty & Blom, 1995). L'acide acétique joue aussi un rôle important dans l'arôme du saucisson en apportant une note de vinaigre ; néanmoins un excès peut engendrer un goût acide piquant (Bucharles et *al.*, 1984).

2.4.3.2.3.2. Incidence du métabolisme des protéines

Les matières premières constituant la mûlée de départ sont constituées d'environ 70% du tissu musculaire, principale source de composés azotés (Talon et *al.*, 2002). Les protéines du muscle sont divisées en 3 groupes : protéines sarcoplasmiques (enzymes de la glycolyse, pigments, protéines des organelles cellulaires), protéines myofibrillaires (actine, myosine) et protéines du tissu conjonctif (collagène, élastine). Le catabolisme des protéines consiste en 2 principales étapes : la protéolyse, qui couvre la dégradation des protéines en peptides et des peptides en acides aminés et le catabolisme des acides aminés (Fig. 5).

Les bactéries lactiques ont une faible activité protéolytique sur les protéines myofibrillaires (Molly et *al.*, 1997 ; Sanz et *al.*, 1999b) ; néanmoins, elles contribuent indirectement à la protéolyse en réduisant le pH, qui augmente l'activité de la cathepsine D (Molly et *al.*, 1997). En outre, certaines souches de *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. sakei* contribuent amplement à l'hydrolyse des protéines sarcoplasmiques (Fadda et *al.*, 1999a ; 1999b ; Sanz et *al.*, 1999a). Les bactéries lactiques participent aussi à la dégradation des peptides en acides aminés. Des activités peptidases et amino-peptidases ont été rapportées chez *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* et *Lb. plantarum* isolées de la viande (Fadda et *al.*, 1999a ; 1999b).

Le catabolisme des acides aminés peut résulter en la formation d'amines, ammoniac ou d'autres produits dont certains ont des propriétés aromatiques comme les aldéhydes méthylés, les acides méthylés et les alcools méthylés (Fig. 11) (Talon et *al.*, 2002). Certains lactobacilles, notamment *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* et *Lb. plantarum* sont dotées de leucine et valine amino-peptidases), contribuant ainsi à la formation de la saveur du produit par les acides aminés et les petits peptides produits (Papamanoli et *al.*, 2003).

2.4.3.2.3.3. Incidence du métabolisme des lipides

Les bactéries lactiques sont très faiblement lipolytiques (Montel et *al.*, 1998 ; Papamanoli et *al.*, 2003). La dégradation des triglycérides et des phospholipides est assurée

par les staphylocoques/*Kocuria* (Talon et al., 2002). Les levures et moisissures participent aussi à la lipolyse (Olesen & Stahnke, 2000).

2.4.3.3. Incidence des bactéries lactiques sur la qualité hygiénique du produit

2.4.3.3.1. Inhibition de la flore indésirable

2.4.3.3.1.1. Par production d'acides organiques.

Les bactéries lactiques utilisées en salaison sont sélectionnées pour leurs propriétés acidifiantes, phénomène déterminant dans l'inhibition des flores pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium*) et des germes d'altération (*Pseudomonas*, *Brochotrix* et les entérobactéries) (Smith & Palumbo, 1983; Schillinger & Lücke, 1990). Leurs propriétés inhibitrices sont attribuées à la production d'acides organiques, notamment lactique et acétique. L'effet inhibiteur de ces acides est étroitement lié à la diminution du pH du milieu qui atteint, en fin d'étuvage, des valeurs situées entre 5 et 5,4 dans les fabrications françaises (Montel, 1999) et aussi à la fraction acide non dissociée. La diminution du pH cause une acidification du cytoplasme cellulaire (Kashket, 1987) qui se traduit par une inhibition de la flore acido-sensible telle que les *Pseudomonas* (Talon et al., 1980; Weber, 1994). La fraction acide non dissociée, étant lipophile, peut diffuser passivement à travers la membrane et détruire le gradient électrochimique de proton ou altérer la perméabilité de la membrane ce qui engendrerait une perturbation des systèmes de transport de substrats (Snijders 1985; Earnshaw, 1992).

L'acide lactique est le métabolite majeur produit par les bactéries lactiques. Au cours de la fermentation, ces formes dissociée et non dissociée sont en équilibre et l'amplitude de la dissociation dépend du pH. A bas pH, une grande quantité de l'acide lactique est contenue dans sa forme non dissociée et est toxique pour beaucoup de bactéries, levures et moisissures. Lindgren & Dobrogosz (1990) ont montré qu'à différentes valeurs de pH, la concentration minimale inhibitrice (MIC) de la forme non dissociée était différente à l'encontre de *Clostridium tyrobutyricum*, *Enterobacter* sp. et *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii*. En outre, les stéréo-isomères d'acide lactique diffèrent aussi dans l'activité antimicrobienne. L'acide L(+)-lactique est plus inhibiteur que l'isomère D(-) (Benthin & Villadsen, 1995).

L'acide acétique, produit à faible échelle lors de la fermentation du saucisson, peut interagir avec les membranes cellulaires et causer une acidification intracellulaire et une dénaturation protéique (Huang et al., 1986). Son activité antimicrobienne est plus efficace que

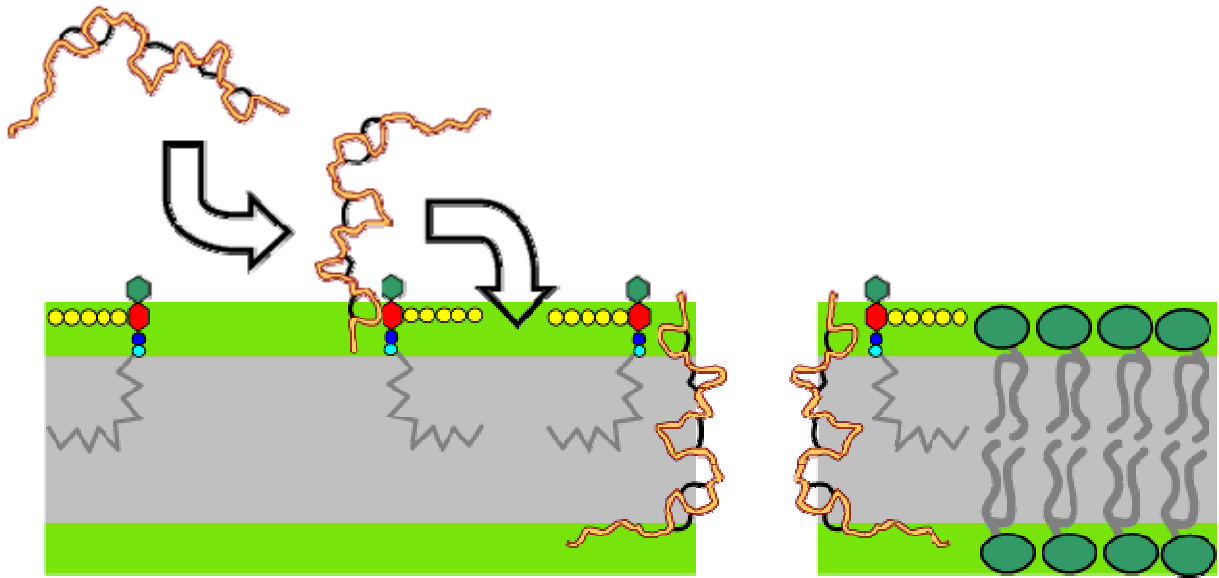


Figure 6. Modèle du mode d'action de la nisine (Breukink et *al.*, 2003)

celle de l'acide lactique étant donné sa plus grande valeur de pKa (acide lactique 3.08 et acide acétique 4.75) et son grand pourcentage en forme non dissociée par rapport à l'acide lactique à un pH donné (Earnshaw, 1992). L'acide acétique est plus inhibiteur de *L. monocytogenes* que l'acide lactique (Ahmad & Marth, 1989). L'acide acétique agit de manière synergétique avec l'acide lactique. En effet, l'acide lactique abaisse le pH du milieu favorisant ainsi l'augmentation de la toxicité de l'acide acétique.

2.4.3.3.1.2. Par production de bactériocines.

Les ferments sont aussi sélectionnés pour leurs propriétés bactériocinogéniques. Pendant les 15 dernières années, les études sur les bactériocines se sont accrues et beaucoup d'auteurs ont caractérisé certaines souches isolées du saucisson sec comme productrices de bactériocines à l'encontre des bactéries Gram-positif potentiellement pathogènes (*L. monocytogenes*, *Sc. aureus*, etc.). A titre d'exemples, c'est le cas de *Lb. sakei* (Sobrino et al., 1991; Tantillo et al., 2002), *Lb. curvatus* (Tichaczek et al., 1992), *Lb. plantarum* (Enan et al., 1996), *Lb. casei* (Vignolo et al., 1993), *Pc. acidilacticii* (Foegeding et al., 1992), *Lactococcus lactis* (Rodriguez et al., 1995), *Enterococcus faecium* (Callewaert et al., 2000; Herranz et al., 2001), *Sc. xylosus* (Villani et al., 1997; Papamanoli et al., 2002), *Sc. carnosus* (Papamanoli et al., 2002), etc.

Les bactériocines sont des peptides ou des complexes de peptides (généralement 30 à 60 acides aminés) synthétisés au niveau du ribosome et qui ont un effet bactéricide ou bactériostatique sur d'autres espèces souvent taxonomiquement proches (Garneau et al., 2002). Dans tous les cas, la cellule productrice est immunisée vis-à-vis de l'action de sa propre bactériocine. Il est généralement admis que les bactériocines agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en s'y insérant et en s'y regroupant, causant ainsi la formation de pores et donc une fuite d'ions, d'ATP et d'autres métabolites. Par conséquent, la force proton-motrice (PMF) des cellules sensibles diminue ou s'épuise (Fig. 6) (Abee et al., 1995 ; Montville et al., 1995).

On distingue quatre classes de bactériocines (Abee et al., 1995 ; Montville et al., 1995) :

1. Classe I : les lantibiotiques, sont de petits peptides hydrophobes qui agissent au niveau de la membrane et contiennent des acides aminés non usuels comme les lantionines β -methyllantionine et des résidus comme la dihydroalanine ou ladihydrobutirine. La nisine produite par certaines espèces de *Lactococcus lactis*, appartient à cette classe de bactériocines.

Classe II : Elle comprend une plus grande variété de structures, ce qui a nécessité la création de plusieurs sous groupes. Ce sont de petites bactériocines (PM inférieur à 10 kDa) thermostables non modifiées ;

Classe III : Elle a été créée pour rassembler les bactériocines de taille supérieure à 10 kDa. Elles sont thermolabiles (elles sont inactivées suite à un chauffage à 60°-100°C pendant 10 à 15 min) ;

Classe IV : Elle regroupe des bactériocines plus complexes et exigent la présence de parties glucidiques ou lipidiques ou l'occurrence de deux peptides pour exprimer leur activité (Klaenhammer, 1993).

Parmi les bactériocines, la nisine est la plus anciennement connue et la seule légalement autorisée en alimentation humaine (Hansen, 1994). Son efficacité a été probante dans certains fromages (Richard 1996), mais son application dans les produits carnés n'a pas été réussie étant donné sa faible solubilité et son manque de stabilité. De nombreuses autres bactériocines ont été décrites depuis 20 ans : lacticine, helveticine, sakacine, divercine, pisciocine, pediocine, carnicine, linenscine (Moll *et al.*, 1999). Toutes ou presque sont efficaces *in vitro* ou dans des fabrications expérimentales à l'échelle du laboratoire (Hugas, 1998). Il semble que quelle que soit la bactériocine considérée, des résistances croisées aux bactériocines puissent apparaître rapidement (Song & Richard 1997). D'autres travaux existent et montrent qu'il n'y a pas d'apparition de résistance croisée lorsque les bactériocines considérées sont de classes différentes (Rasch & Knochel, 1998 ; Schillinger *et al.*, 1998).

L'influence de ces bactériocines dans le saucisson apparaît être limitée étant donné qu'elles sont souvent attachées à la matrice (principalement la matière grasse) et sont dégradées par les protéases du tissu (Schillinger *et al.*, 1996). Néanmoins, dans des saucissons modèles, la population de *L. monocytogenes* a été réduite par 1,5 à 2,5 log en présence de souches productrices de bactériocines comme *Pc. acidilacticii* (Luchansky *et al.*, 1992) ou *Lb. sakei* (Schillinger *et al.*, 1991). En outre, certains ingrédients utilisés dans la production du saucisson influencent la synthèse des bactériocines. En effet, le sel et les additifs de salaison sembleraient diminuer la production de bactériocines produites par les bactéries lactiques contre celles pathogènes et d'altération (Leroy & de Vuyst, 1999 ; Aymerich *et al.*, 2000). Les poivres, quant à eux peuvent influencer positivement ou négativement, selon les souches la production, de la bactériocine (Aymerich *et al.*, 2000 ; Hugas *et al.*, 2002).

2.4.3.3.1.3. Par production d'autres métabolites.

D'autres produits antimicrobiens sont produits par les bactéries lactiques. Il s'agit du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, du diacétyl, de l'acétaldéhyde et des acides gras. Néanmoins, c'est surtout le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les acides gras qui peuvent être rencontrés dans les saucissons.

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques en présence de l'oxygène comme résultat de l'action des flavoprotéines oxydases ou de l'*NADH* peroxydase. L'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène résulterait de l'oxydation des groupes sulfhydriques causant une dénaturation d'un nombre d'enzymes. Il résulterait aussi de la peroxydation des lipides membranaires augmentant ainsi la perméabilité de la membrane (Kong & Davidson, 1980). H_2O_2 peut être aussi un précurseur de la production de radicaux libres bactéricides comme le superoxide (O_2^-) et l'hydroxyle (OH^\cdot). Ces radicaux peuvent endommager l'ADN (Byczkowski & Gessner, 1988). Il a été montré que la production de H_2O_2 par des souches de *Lactobacillus* ou *Lactococcus* inhibait *Sc. aureus*, *Pseudomonas* sp. et d'autres microorganismes psychrotrophes dans les aliments.

Le diacétyl est produit suite à la dégradation du citrate. Il réagit avec la protéine-arginine et agit donc sur l'utilisation de l'arginine (Jay, 1986). Les bactéries à Gram-négatif sont plus sensibles au diacétyl que celles à Gram-positif (Jay, 1982).

Les acides gras insaturés sont actifs contre les bactéries à Gram-positif et peuvent présenter une activité antifongique dépendante de longueur des ramifications, la concentration et le pH du milieu (Gould, 1991). L'action antimicrobienne des acides gras serait due à la molécule non dissociée et pas l'anion, étant donné que le pH conditionne largement cette activité. Un bas pH favorise une destruction rapide des microorganismes cibles (Kabara, 1993).

2.4.3.3.2. Dégradation des amines biogènes

Les bactéries lactiques capables de produire des amines biogènes appartiennent aux espèces : *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Cb. piscicola*, *Cb. divergens* (Masson et al., 1996), *Ec. faecium* (Kalac et al., 2000), *Pc. pentosaceus* (Eerola et al., 1996).

Bien que les bactéries lactiques soient les premières incriminées dans la production d'amines biogènes. Certaines souches de *Lb. casei* et de *Lb. plantarum* isolées du saucisson sec, ont été caractérisées comme dotées d'un grand potentiel de dégradation des amines

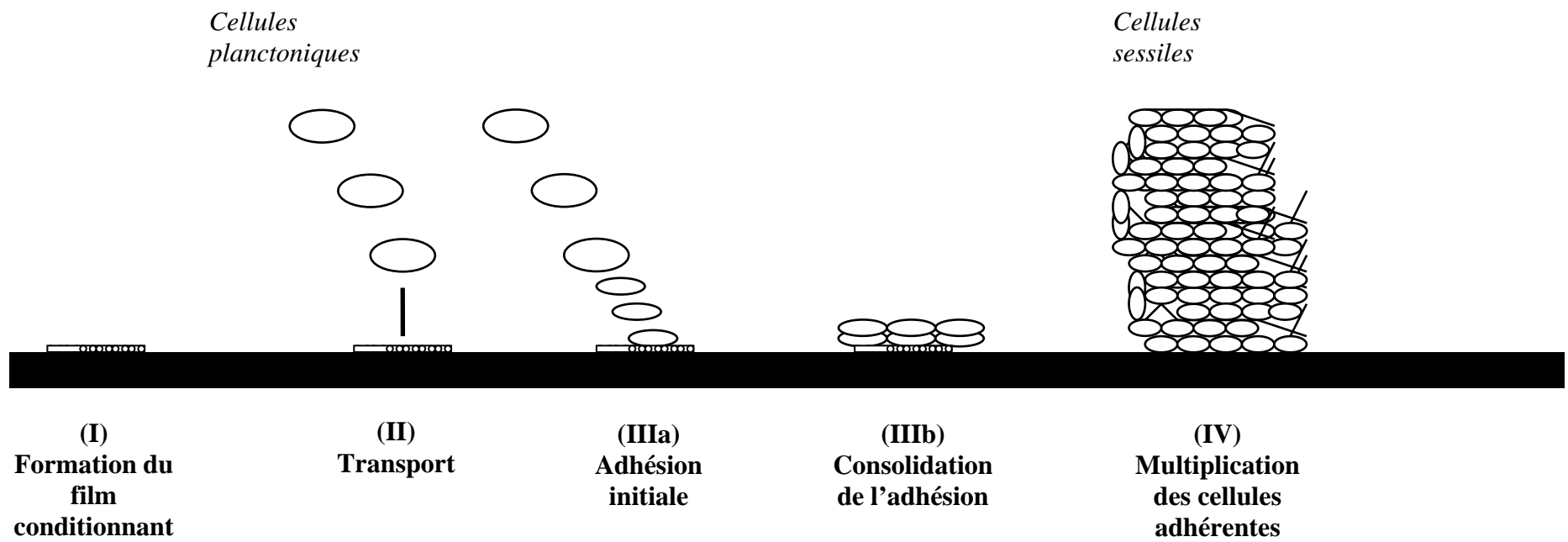


Figure 7. Formation des biofilms microbiens

biogènes tout en étant décarboxylase-négative (Fadda et *al.*, 2001). Les bactéries lactiques ont aussi un effet indirect sur les amines biogènes dans le sens où en favorisant l'acidification, elles diminuent la production de ces composés (Bover-Cid et *al.*, 2001; González-Fernández et *al.*, 2003).

3. Maîtrise de l'hygiène dans les ateliers fermiers : Les biofilms et leur élimination

Dans la nature, les micro-organismes sont majoritairement trouvés fixés à des supports. Les bactéries libres ne représentent ainsi que 0,5% de la population bactérienne totale. Les bactéries attachées aux surfaces tendent à s'associer en communautés en s'entourant d'une matrice de polymères organiques ; elles forment ce qu'on appelle des biofilms (Briandet, 1999). Un biofilm est défini comme une communauté microbienne immobilisée sur une surface et souvent enfouie dans une matrice fibreuse de polymères extracellulaires (Characklis, 1990).

3.1. Formation des biofilms

La formation des biofilms passe par quatre étapes principales (Zottola, 1997) (Fig. 7) :

① Formation du film conditionnant : formé à base de résidus de souillures alimentaires et de produits de nettoyage et de désinfection, il modifie à la fois la charge électrostatique et l'énergie libre des surfaces, et donc le comportement de celles-ci vis-à-vis du phénomène d'adhésion (Bourion, 1996).

② Transport des micro-organismes : Ce transport est le résultat de facteurs physiques et microbiologiques tels que le mouvement Brownien, les forces de gravité, les caractéristiques hydrodynamiques du fluide environnant (régime statique, turbulent ou laminaire) ou encore du chimiotactisme des cellules microbiennes (mobilité par l'intermédiaire de flagelles) (Briandet, 1999).

③ Adhésion des micro-organismes : Elle met en jeu des interactions physico-chimiques entre la surface du matériau, la bactérie et le milieu environnant. Elle se fait généralement selon un mécanisme se déroulant en deux étapes :

☞ Une adhésion réversible qui consiste en un transport en suspension des bactéries tout près de la surface pour pouvoir y être adsorbées.

☞ Une adhésion irréversible qui survient après un certain temps de latence et qui consiste en une production de Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) par les micro-organismes, ce qui favorise leur attachement à la surface (Marshall, 1992).

④ La colonisation du support : Elle dépend principalement du métabolisme microbien et se déroule donc lentement par rapport à la phase d'adhésion. Elle correspond à la multiplication des micro-organismes et se fait en plusieurs heures ou plusieurs jours. Elle peut s'accompagner de la formation d'une couche muqueuse (glycocalix) par fusion des SPE produits par chacun des germes. Cette matrice peut représenter entre 50 et 90% du carbone organique d'un biofilm et 75 à 95% de son volume (Christensen, 1989).

La formation des biofilms est influencée par certains facteurs inhérents aux micro-organismes comme la nature des SPE produites par les bactéries, qui peuvent aussi être favorables à la fixation d'autres espèces microbiennes (Williams & Wimpenny, 1978) et l'âge de la culture bactérienne (Stanley, 1983 ; Little *et al.*, 1986). D'autres facteurs sont liés aux propriétés physico-chimiques des surfaces de contact, à savoir la charge de surface (forces de Van der Waals et électrostatiques) et le caractère hydrophile ou hydrophobe de celle-ci (Hood & Zottola, 1995 ; Briandet *et al.*, 1999). Et enfin, d'autres facteurs sont liés aux caractéristiques du milieu d'immersion comme le pH (Fletcher 1988), la présence ou non de cations mono-, di- ou trivalents (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} ou Al^{3+}) (Turakhia & Characklis, 1989) et les conditions d'écoulement (turbulent ou laminaire) (Bourion, 1996).

3.2. Physiologie des cellules biofilmées

L'observation des biofilms par microscopie confocale à balayage laser a permis de mettre en évidence une structure coalescente en surface et laissant paraître, en dessous, des «galeries» par lesquelles les fluides environnementaux peuvent circuler. Ces fluides agissent comme des transporteurs de nutriments, débarrassant la colonie de ses déchets, et conduisant les signaux chimiques de part et d'autre du biofilm (Wimpenny *et al.*, 2000). Les biofilms peuvent atteindre plusieurs centaines de micromètres d'épaisseur. La production d'une matrice de SPE permet de protéger les populations bactériennes et, de par sa charge négative, de «capter» des particules organiques ou inorganiques (sédiments, métaux, etc.) (Decho, 2000).

Différentes études ont mis en évidence que l'adhésion d'un micro-organisme à un support pouvait s'accompagner de profondes modifications physiologiques des cellules. Ainsi, Deretic *et al.* (1994) ont montré l'existence d'un facteur sigma responsable des modifications physiologiques entre cellules planctoniques et cellules adhérentes. Selon cette

hypothèse, ce facteur permettrait de gouverner l'expression des gènes nécessaires à la formation du biofilm, et en particulier, la synthèse des SPE, mais aussi tous ceux impliqués dans la survie à long terme des bactéries biofilmées.

Généralement, la physiologie des cellules microbiennes dépend des paramètres physico-chimiques du milieu environnant (diffusion de l'oxygène, pH, nutriments, etc.). Ces cellules ne bénéficient pas toutes du même "micro-environnement" physico-chimique, et en conséquence ne sont pas toutes dans le même état physiologique (Matin, 1991). Les micro-organismes les plus superficiels auront par exemple un accès beaucoup plus "direct" aux éléments nutritifs et pourront rejeter aisément leurs déchets métaboliques dans le fluide extérieur. Ces cellules, qui présentent un taux de croissance généralement supérieur à celui des cellules présentes à proximité du support, seront néanmoins les plus exposées aux agressions du milieu extérieur tels que les agents désinfectants (Briandet, 1999).

En outre, il a été démontré l'existence d'une communication chimique entre les cellules d'un biofilm. Ce type de communication ou "quorum sensing", permettrait, à partir d'une densité cellulaire seuil, de modifier l'expression de certains gènes dans le but de structurer l'édifice, et de gérer les compétitions entre espèces sur des surfaces largement colonisées (Davies et al., 1998). Ainsi, des homosérines lactones acylées (acyl.HSL), produites à partir d'une densité cellulaire comprise entre 10^6 et 10^8 cellules/ml, servent de signal à l'ensemble de la population environnante. Ces molécules que chaque bactérie produit en infime quantité, et qui lorsqu'elles se concentrent (début de la colonisation), activent les gènes à l'origine de la matrice (McLean et al., 1997) ; initiant la mise en place du phénotype biofilm (Borchardt et al., 2001). La production de signaux chimiques est plus rare lorsque les bactéries se trouvent désolidarisées, car la probabilité qu'une molécule signalétique atteigne une autre bactérie devient alors très faible. Cette méthode de signalisation intercellulaire trouve son efficacité lorsque les cellules se regroupent dans un milieu diffusif qui représente la matrice. Mais nombre de ces molécules restent encore à découvrir. La mise en évidence de molécules toxiques produites par certaines colonies en cas de compétition spatiale pourrait être d'un grand intérêt pour combattre la formation des biofilms.

3.3. Biofilms et impact dans les ateliers de production

Les biofilms microbiens, lorsqu'ils sont constitués de bactéries pathogènes ou d'altération, peuvent avoir des conséquences importantes dans le secteur alimentaire, tant sur le plan économique qu'hygiénique. *L. monocytogenes* est une bactérie à Gram-positif,

pathogène, régulièrement impliquée dans les toxi-infections alimentaires pour lesquelles la viande était le produit incriminé (Hibma et al., 1996 ; Salvat et al., 1997). Ce micro-organisme adhère et forme des biofilms sur de nombreuses surfaces (Herald & Zottola, 1988 ; Mafu et al., 1990), généralement en association avec d'autres micro-organismes tels que des espèces de *Pseudomonas*.

Les biofilms peuvent représenter une source importante de contamination des équipements ou des viandes entrant en contact avec eux (Jeong & Frank, 1994a ; Jeong & Frank, 1994b). Plusieurs études ont prouvé que les cellules bactériennes sessiles sont plus résistantes aux changements et aux traitements environnementaux de nettoyage ou de désinfection (Lee & Frank, 1991 ; Ronner et al., 1993 ; Sagripanti & Bonifacino, 2000). D'où l'intérêt accru de prévenir et d'éliminer ce mode de croissance dans les ateliers agroalimentaires.

3.4. Elimination des biofilms

3.4.1. Nettoyage

Le nettoyage est une opération d'élimination des salissures (particulières, biologiques, liquides, etc.) à l'aide d'un procédé faisant appel, dans des proportions variables, aux facteurs suivants : action physico-chimique (détergence), action chimique (par exemple action des enzymes), action mécanique (jets, brosses), temps d'action et températures (Isoard, 1988).

3.4.1.1. Etapes du nettoyage

On admet généralement que le nettoyage résulte de quatre mécanismes, seuls ou combinés, contribuant à séparer la souillure de la surface et à la disperser dans le détergent (Bellon-Fontaine & Cerf, 1988) :

- 1. Solubilisation:** Les substances contaminantes sont absorbées par le liquide de nettoyage et s'y dissolvent ;
- 2. Emulsification:** Les molécules tensioactives du détergent s'adsorbent à la surface des produits contaminants et abaissent leur tension superficielle. Le film encrassant se rétracte sur lui-même et les gouttelettes formées sont entraînées dans la solution ;
- 3. Micellisation:** Les molécules tensioactives forment des micelles hydrophiles à l'extérieur et hydrophobes à l'intérieur. Les molécules hydrophobes des substances contaminantes forment des gouttelettes qui sont emprisonnées dans les micelles et sont entraînées avec elles ;
- 4. Action mécanique :** L'énergie cinétique du liquide de nettoyage contribue à l'arrachement

Tableau 4. Choix de l'agent nettoyant (Hyginov, 1995)

Composants de la souillure	Agent nettoyant		
	Famille	Exemples d'agents	Caractéristiques
Sucres solubles	Alcalins	◆ Soude ◆ Potasse	♣ Solubilisant ♣ Saponifiant
Autres glucides	Alcalins		
	Produits enzymatiques		♣ Hydrolysant ♣ Désagrégant
Protéines	Alcalins	◆ Soude ◆ Potasse	♣ Solubilisant ♣ Saponifiant
	Produits enzymatiques	◆ Lipases	♣ Hydrolysant ♣ Désagrégant
Matières grasses	Tensioactifs	◆ Anioniques ◆ Cationiques ◆ Non ioniques	♣ Mouillant ♣ Emulsifiant
	Produits enzymatiques	◆ Lipases	♣ Hydrolysant ♣ Désagrégant
Minéraux	Acides	◆ Chlorhydrique ◆ Nitrique ◆ Phosphorique	♣ Solubilisant
	Séquestrants (Chélatants)	◆ EDTA ◆ Polyphosphates ◆ Gluconate	♣ Séquestrant
Tartre Eonologique	Alcalins	◆ Soude	♣ Solubilisant

d'agrégats de substances contaminantes.

3.4.1.2. Agents de nettoyage

Les produits de nettoyage sont le plus souvent formulés avec plusieurs principes actifs, généralement un composé alcalin ou acide agissant respectivement sur les souillures organiques et les dépôts minéraux, des agents tensioactifs responsables de l'action détergente, des séquestrants et des chélatants, des anti-moussants et enfin des inhibiteurs de corrosion (Bellon-Fontaine & Cerf, 1988).

En France, un arrêté ministériel (Annexe 1) décrit comme "liste positive" les composés chimiques de base, utilisables en décontamination bactériologique et chimique des surfaces pouvant se trouver au contact des denrées alimentaires.

Au stade expérimental, quelques substances sont connues pour améliorer le détachement des biofilms. C'est le cas de l'EDTA et de l'EGTA qui chélatent les cations et en particulier le calcium dont le rôle dans la cohésion du biofilm a été démontré (Turakhia & Characklis, 1989). Les enzymes protéolytiques et glycolytiques peuvent aussi partiellement détacher les biofilms (Wiatr, 1991).

Le choix d'un détergent dépend des paramètres liés à son utilisation, à savoir, la nature de la souillure, le support, la qualité de l'eau, la température de nettoyage et l'action mécanique et/ou le procédé de nettoyage (Vasseur, 1999) (Tab. 4).

L'action chimique des produits de nettoyage est insuffisante sur les biofilms car même dans le meilleur des cas, les contaminations résiduelles restent très importantes. Une action mécanique (brosse, jets à moyenne et haute pressions) s'avère bien plus efficace pour l'élimination des biofilms (Bourion, 1996). Cependant la structure des équipements ne rend pas toujours ce type de nettoyage possible.

3.4.2. Désinfection

La norme NF T 72-101 (AFNOR, 1981) définit le terme de désinfection comme une opération, au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés.

Tableau 5. Liste des produits chimiques autorisés en désinfection (Maris, 1995)

Famille chimique	Exemples(s)	Mode d'action
Produits chlorés	Hypochlorites alcalins	♣ Dénaturation des protéines
Dérivés iodés	Chlorure d'iode	♣ Halogénéation des composés soufrés des protéines ♣ Blocage de la chaîne respiratoire
Oxydants	♦ Peroxyde d'hydrogène ♦ Eau oxygénée	♣ Oxydation non sélective des constituants organiques
Aldéhydes	Formaldéhyde	♣ Dénaturation des protéines par formation de ponts méthylène ♣ Alkylation des acides nucléiques
	Glutaraldéhyde	♣ Les groupements aldéhydes interfèrent avec les groupements aminés des cellules microbiennes
Ammoniums Quaternaires	Chlorure de benzalkonium	♣ Le cation réagit avec les groupements ioniques des acides aminés et entraîne des perturbations stériques
Amphotères	Amines grasses	♣ Antagonistes des acides aminés
Biguanidine		♣ Lésions membranaires et fuite du matériel cellulaire
Acide peracétique		♣ Oxydation des protéines et lipides des micro-organismes
Composés phénoliques	Hexachlorophénol	♣ Inactivation des enzymes transmembranaires
Ozone		♣ Oxydation

Tableau 6. Spectre d'activité des principaux désinfectants (Isoard, 1988)

Désinfectants	Bactéries		Mycobactéries	Spores	Moisissures	Levures	Virus phages
	G(-)	G(+)					
Acide peracétique	+++	+++		++	++	++	++
Alcools	++	++		0	++	++	+
Alcool à 70°	++	++	0	+	+	++	+
Aldéhydes : Glutaraldéhyde	+++	+++	++	+	+++	++	++
Ammoniums quaternaires	+++	+*	0	0	+	+	+
Amphotères	+++	+		0	+	+	0
Biguanidine	++	++		0	(+)	(+)	0
Chloroexidine	+++	++	+	0	+	+	0
Chlore	+++	+++	++	++	++	++	++
Dérivés mercuriels	++	++	0	0	+	+	
Dérivés phénoliques	Activité variable selon le composé						
Eau oxygénée	+++	+++		+	+	+	0
Iode	+++	+++	++	++	++	++	++

*: Inactif sur *Pseudomonas sp.*

+ : Activité moyenne

0 : Activité nulle

++ : Bonne activité

(+) : Activité inconstante

+++ : Très bonne activité

3.4.2.1. *Les agents de désinfection*

Il existe à l'heure actuelle de nombreux agents de désinfection tant chimiques (Tab. 5) que physiques :

- **Les agents chimiques** : Classés en six grands groupes (les halogènes, les oxydes et peroxydes, les aldéhydes, les agents tensioactifs, les acides et bases et les alcools) (Annexe 2), ils sont souvent inadaptés en tant que désinfectants, car ils agissent trop lentement ou ne développent qu'une action inhibitrice (Vasseur, 1999).

Le choix du désinfectant dépend principalement de son spectre d'activité (Tab. 6), alors que l'efficacité de la désinfection est conditionnée par la concentration du produit, le mode d'application, la température et le temps d'application.

- **Les agents physiques** : La désinfection par la chaleur (sèche ou humide) est un des procédés d'élimination des micro-organismes les plus utilisés. La chaleur a pour effet de coaguler les protéines cellulaires et donc de détruire les organismes vivants. Il existe par ailleurs d'autres procédés de désinfection non thermiques comme les traitements par ultraviolets de longueur d'onde de 200 à 280 nanomètres, qui sont utilisés pour les petits ustensiles et les traitements par rayonnements ionisants (Cobalt⁶⁰, Césium¹³⁷) utilisés à la surface des emballages ou directement sur des denrées alimentaires (Vasseur, 1999).

3.4.2.2. *Mécanismes de la désinfection*

L'inactivation des micro-organismes résulte de dénaturation, de lyse, d'altération, etc. d'un ou plusieurs éléments vitaux de la cellule tels la membrane, la paroi, le chromosome, les plasmides, les enzymes, etc. (Briandet, 1999).

Dans le cas de la désinfection chimique, la première étape des interactions entre le désinfectant et la cellule bactérienne consiste en la fixation du produit sur la capsule ou la paroi cellulaire de celle-ci et au franchissement de ces enveloppes. On assiste alors ensuite, soit à une altération de la membrane cytoplasmique qui assure les fonctions essentielles à la vie des bactéries (production d'énergie, transport actif des nutriments, etc.), soit à une atteinte des constituants intracellulaires, telles que les protéines de structure; phénomène qui provoque une désorganisation du métabolisme, une fuite des substances, la dégénérescence de la cellule et finalement sa mort (Pieto & Bardoneschi, 1990). Notons en outre que les cibles sont variables selon le groupe auquel appartient le désinfectant (Molinier, 1985) (Fig. 8).

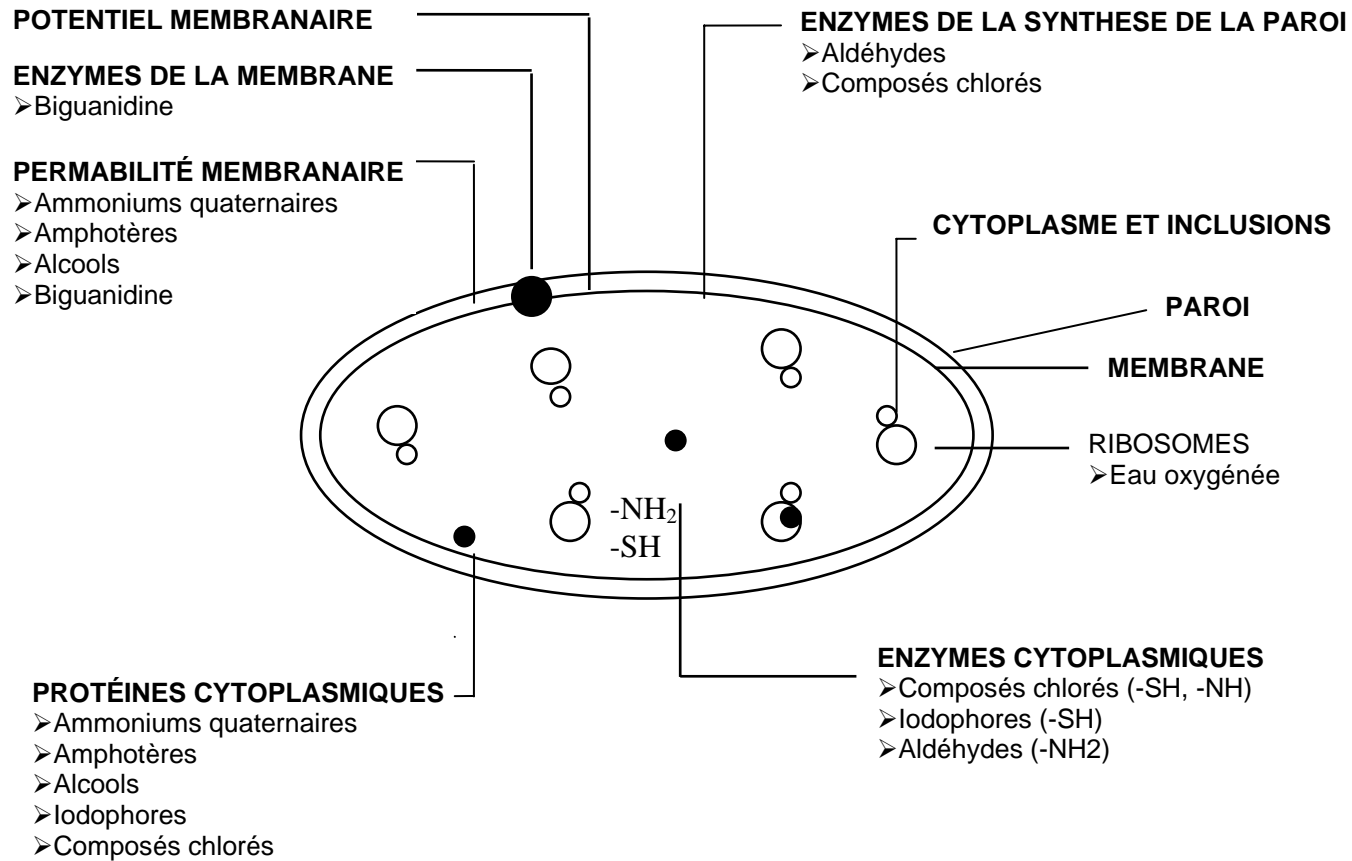


Figure 8. Les cibles des produits désinfectants (Molinier, 1985)

3.4.3. Limites des pratiques de nettoyage et de désinfection

3.4.3.1. Les substances interférentes

Les matières organiques sont antagonistes de la majorité des familles de désinfectants (Isoard, 1988). Ces substances sont récapitulées dans le tableau 7.

3.4.3.2. La conception des équipements

Les équipements, tant sur les plans de structure que des matériaux, doivent être conçus de telle sorte qu'ils puissent être facilement nettoyés et démontés si nécessaire.

Au niveau de la structure, la présence d'angles ou de bras morts peut favoriser l'implantation de micro-colonies bactériennes et de réservoirs de contaminants. Quant au matériau, son choix influence celui du désinfectant, non seulement pour le risque potentiel de corrosion, mais aussi pour l'efficacité en soi du produit. En effet, Gélinas et Goulet (1983) ont montré que la désinfection des surfaces en aluminium ou en polypropylène nécessitent des concentrations dix fois plus élevées que celles utilisées sur des surfaces en acier inoxydable.

3.4.3.3. Les phénomènes de résistance aux désinfectants

Différents types de résistance bactérienne peuvent être définis :

1. **La résistance naturelle** : La présence d'une couche muqueuse de nature, généralement, polyanionique, pourrait entraver la progression des composés anti-bactériens cationiques tels que les antibiotiques glycosylés (Anwar & Costerton, 1992). Il faut rattacher à ce phénomène la possibilité de détoxification des substances toxiques, par l'action combinée des enzymes telles que les β -lactamases présentes en forte teneur au sein de la matrice polysaccharidique (Anwar & Costerton, 1992). Ainsi, Ntsama-Essomba (1996) rapporte que la dislocation des biofilms ou la suppression de la matrice pourrait entraîner, dans certains cas, une augmentation de la sensibilité des micro-organismes vis-à-vis des agents anti-microbiens; élément qui a été vérifié sur *Pseudomonas aeruginosa*, mais pas sur *Escherichia coli*. Par conséquent, la résistance aux agressions extérieures serait favorisée par le rôle protecteur de la matrice exocellulaire et/ou par l'état physiologique spécifique de ces cellules biofilmées.
2. **La résistance acquise adaptative (les protéines de stress)** : Lorsqu'un micro-organisme est soumis à un stress comme un choc thermique chaud, il déclenche une augmentation

Tableau 7. Antagonismes et synergies des principaux désinfectants (Isoard, 1988)

Famille	Antagonismes	Synergies
Halogènes ♣ Composés chlorés ♣ Composés iodés	Matières organiques Thiosulfates Sulfures Sels ferreux Acides forts Matières organiques Composés mercuriels Thiosulfate de Na	Savons Ammoniums quaternaires
Aldéhydes (Glutaraldéhyde)	Ammoniaque	Degré d'hygrométrie > 50%
Alcools	Matières organiques	Eau Composés iodés
Phénols	Matières organiques Ammoniums quaternaires Savons pour certains phénols Alcool pour l'hexachlorophène	Sels de sodium et potassium Sels métalliques
Tensioactifs ♣ Anioniques (savons) ♣ Cationiques (Ammonium IV) ♣ Amphotères	Matières organiques Ammoniums quaternaires Matières organiques Graisses, savons, calcium Savons	Crésols
Dérivés mercuriels	Matières organiques Composés soufrés	Tensioactifs
Biguanides	Matières organiques Savon, lécithine, liège	Ammoniums quaternaires Amphotères
Carboamilides	Matières organiques	Tensioactifs
Permanganates de potassium	Matières organiques	

notable, rapide et transitoire du taux de transcription d'un petit nombre de gènes spécifiques et par conséquent, de la synthèse de protéines dites "protéines de choc chaud" ou "heat shock proteins" (Hsps) (Morimoto et al., 1990). Ces protéines protégeraient les protéines cellulaires des effets toxiques du stress en s'y fixant pour les empêcher de coaguler. D'autres protéines de stress sont synthétisées dans le cas de chocs alcalin ou acide (Vasseur, 1999).

3. Acquisition génétique de la résistance : Une bactérie exposée, à plusieurs reprises, à des concentrations sublétales de désinfectants, peut acquérir une résistance à ce produit à la suite d'une ou plusieurs mutations. De ce fait, si la structure ou la surface modifiée chez le mutant est la cible d'un désinfectant, celui-ci devient résistant au produit (Vasseur, 1999). Les germes peuvent aussi acquérir une résistance par transfert de facteurs de résistance portés par des plasmides, au sein de la population microbienne. Ces plasmides peuvent coder pour de nombreux caractères, entre autres pour la résistance à plusieurs anti-microbiens. Ces facteurs de résistance sont conservés, mais peuvent aussi être transmis à d'autres bactéries. De ce fait, une population résistante à un produit peut être sélectionnée et s'implanter dans les lieux où celui-ci est utilisé (Vasseur, 1999).

3.4.3.4. Destruction non sélective des flores

L'application des mesures d'hygiène, dans le secteur alimentaire, a permis une augmentation de la sécurité alimentaire et des délais de conservation, ainsi qu'une extension des marchés de distribution. Néanmoins, l'amélioration de l'hygiène, bien sûr bénéfique pour les consommateurs, a aussi eu comme conséquence une perte de saveur de nombreux produits fermentés traditionnels. Cette perte est incontestablement due à l'élimination d'une partie de la flore d'intérêt technologique par les procédures de nettoyage et de désinfection (Labadie, 1998).

II.- Bactéries lactiques : Principales caractéristiques, taxonomie et méthodes d'identification

1. Définition

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (requièrent des molécules organiques complexes comme source énergétique) (DE Roissart, 1986).

2. Principales caractéristiques

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacilles ou coccobacilles à Gram-positif qui ont moins de 55 mol% de contenu G+C dans leur ADN (à l'exception des bifidobactéries). Elles sont asporulées, généralement non mobiles, anaérobies mais aérotoleérantes, ne possèdent ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et *al.*, 1994; González et *al.*, 2000).

3. Taxonomie et classification

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries unies par une constellation de caractéristiques morphologiques, métaboliques, et physiologiques. Elles appartiennent à la lignée des Firmicutes, à la classe des *Bacilli*, et à l'ordre des *Lactobacillales* (Garrity & Holt, 2001). Phylogénétiquement, elles appartiennent au phylum des *Clostridium* des bactéries gram-positif (G+C < 50 mol%). Traditionnellement le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > 50 mol% et affecté au phylum des *Actinomyces*. Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Klein et *al.*, 1998). En outre, Bien qu'il y ait des applications de certaines souches du genre *Sporolactobacillus*, en l'occurrence

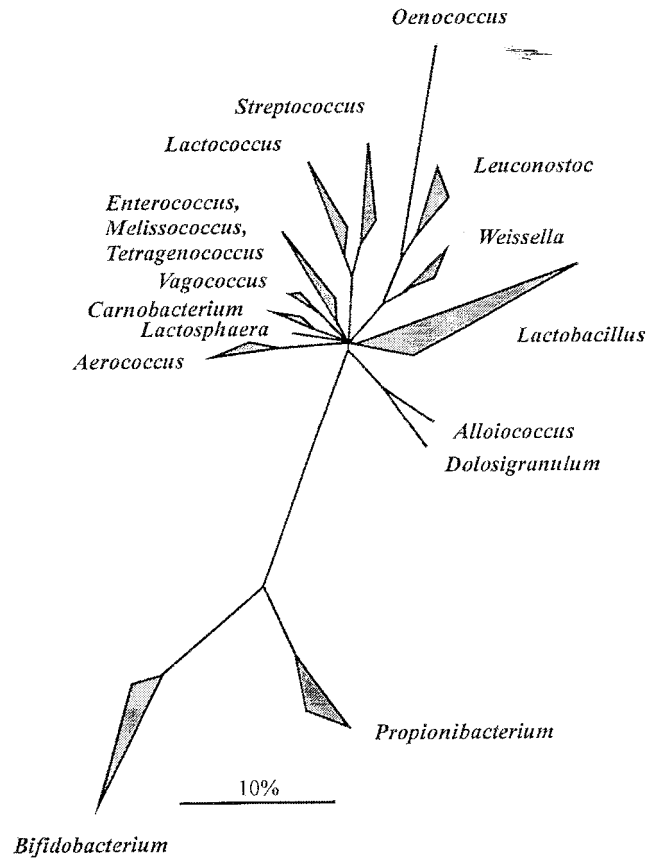


Figure 9. Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible mol % G+C et les genres gram-positif non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

S. cellulosolvens ou *S. inulinus*, dans la fermentation conduisant à la production d'acide lactique (Kanwar et al., 1995 ; Abelyan & Abelyan, 1997), les sporolactobacilles ne sont pas des bactéries lactiques.

Selon Stiles & Holzapfel (1997) et Axelsson (1998), les bactéries lactiques englobent les genres suivants: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Néanmoins, c'est surtout *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* et à grande échelle *Lactobacillus*, qui ont une certaine importance dans les aliments (Vandamme et al., 1996). Une description détaillée de la plupart de ces genres en ce qui concerne leur rôle dans la fermentation des aliments, dans les maladies humaines et dans l'altération des aliments a été rapportée par Stiles et Holzapfel (1997). La relation phylogénétique entre les différents genres des bactéries lactiques est représentée dans la figure 9 et est basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S. *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Lactosphaera* sont étroitement apparentés les uns aux autres. *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent comme relativement apparentés, alors que *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct.

Récemment 15 nouveaux genres lactiques ont été décrits (*Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Desemzia*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactibacillus*, *Trichococcus*, *Atopobacter*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>). Le genre *Lactosphaera* a été reclassé comme appartenant au genre *Trichococcus*. Parmi ces 15 nouveaux genres, seul *Paralactobacillus* est d'origine alimentaire. En effet, l'espèce qui compose ce genre, en l'occurrence *Paralactobacillus selangorensis*, a été isolée d'un ingrédient malaysien (Leisner et al., 2000).

En outre, il est à signaler que le nombre d'espèces lactiques d'origine alimentaire ne cesse d'augmenter. Très récemment 2 nouvelles espèces lactiques ont été isolées d'un milieu viande. Il s'agit de *Lactobacillus versmoldensis* (Krockel et al., 2003) et *Vagococcus carniphilus* (Shewmaker et al., 2004). Ces deux espèces ont été respectivement isolées du saucisson cru et de la viande hachée. Parallèlement, *Carnobacterium piscicola* a été reclassée

Tableau 8. Les tests phénotypiques les plus pertinents pour identifier les bactéries lactiques au niveau du genre

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Paralactobacillus</i>
Morphologie	Bacilles	Bacilles	Coques ovales	Coques/bacilles	Coques	Coques	Coques	Coques	Bacilles
Gaz à partir de glucose	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-
Croissance à									
10°C	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	-	-
45°C	+/-	-	-	+/-	+	-	+/-	+	-
Isomère d'acide lactique	D, L, DL	L	D	DL, D	L	L	L, DL	L	DL
Hydrolyse d'arginine	+/-	+	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-
<i>mDAP</i>	+/-	+	-	-	-	-	-	-	ND ^b
Croissance sur gélose Rogosa SL	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-

^a Dérivé à partir de Shaw et Harding, 1984; Holzapfel et Schillinger, 1992; Wood et Holzapfel, 1995; Axelsson, 1998; Leisner et *al.*, 2000.

^bND, non déterminé.

comme *Cb. maltaromaticum* (Mora et al., 2003). Koort et al. (2004) a montré quant à lui que *Lb. curvatus* subsp. *melibiosus* est un synonyme de *Lb. sakei* subsp. *carneus*.

4. Méthodes d'identification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont de nombreuses propriétés métaboliques dont les industriels et les nutritionnistes cherchent à tirer le meilleur parti. Ces propriétés (technologiques, sensorielles, antimicrobiennes ou probiotiques) sont spécifiques de l'espèce ou de la souche bactérienne, ce qui implique qu'on puisse les mettre en évidence par des techniques d'identification et de différenciation. Cela est d'autant plus important que certaines bactéries lactiques ont un caractère pathogène (pour exemple : streptocoques type D).

4.1. Analyse phénotypique

Les tests traditionnels phénotypiques constituent la base de description, de différenciation et d'identification des bactéries lactiques. Différents tests clefs sont largement adoptés. La morphologie ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/biochimiques et chimiotaxonomiques sont les plus utilisées. Les méthodes physiologiques incluent, principalement, la croissance à certaines températures, à certaines concentrations de sel et sur gélose acétate. Les méthodes métaboliques/biochimiques incluent, principalement, la production de gaz à partir de glucose (Sperber & Swan, 1976), le profil d'hydrolyse des sucres, l'hydrolyse de l'arginine (Montel & Champomier, 1987) et la détermination de la configuration de l'acide lactique (Gutmann & Wahlfeld, 1974). Les méthodes chimiotaxonomiques incluent, principalement, la détection de l'acide *meso*-diaminopimelique (*mDAP*) dans le peptidoglycane (Bousfield et al., 1985 ; Marconi et al., 2000). Le tableau 8 présente les principaux tests utilisés pour identifier les bactéries lactiques au niveau du genre.

Schillinger & Lücke (1987) ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques de la viande basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et biochimiques typiques des différentes espèces. Néanmoins cette clef permettait uniquement d'orienter l'identification et non une identification précise. Elle différenciait aussi entre *Lactobacillus carnis* et *Lactobacillus piscicola* alors que ces microorganismes ont été génétiquement désignés comme *Cb. maltaromaticum* (ex. *Cb. piscicola*) (Collins et al., 1987). Montel et al. (1991) ont proposé par la suite une simple clef pour l'identification des *Lactobacillus* et *Carnobacterium* homofermentaires de la viande (Figure 10). Cette clef, basée sur des tests biochimiques, physiologiques et chimiotaxonomiques mentionnés en dessus, a

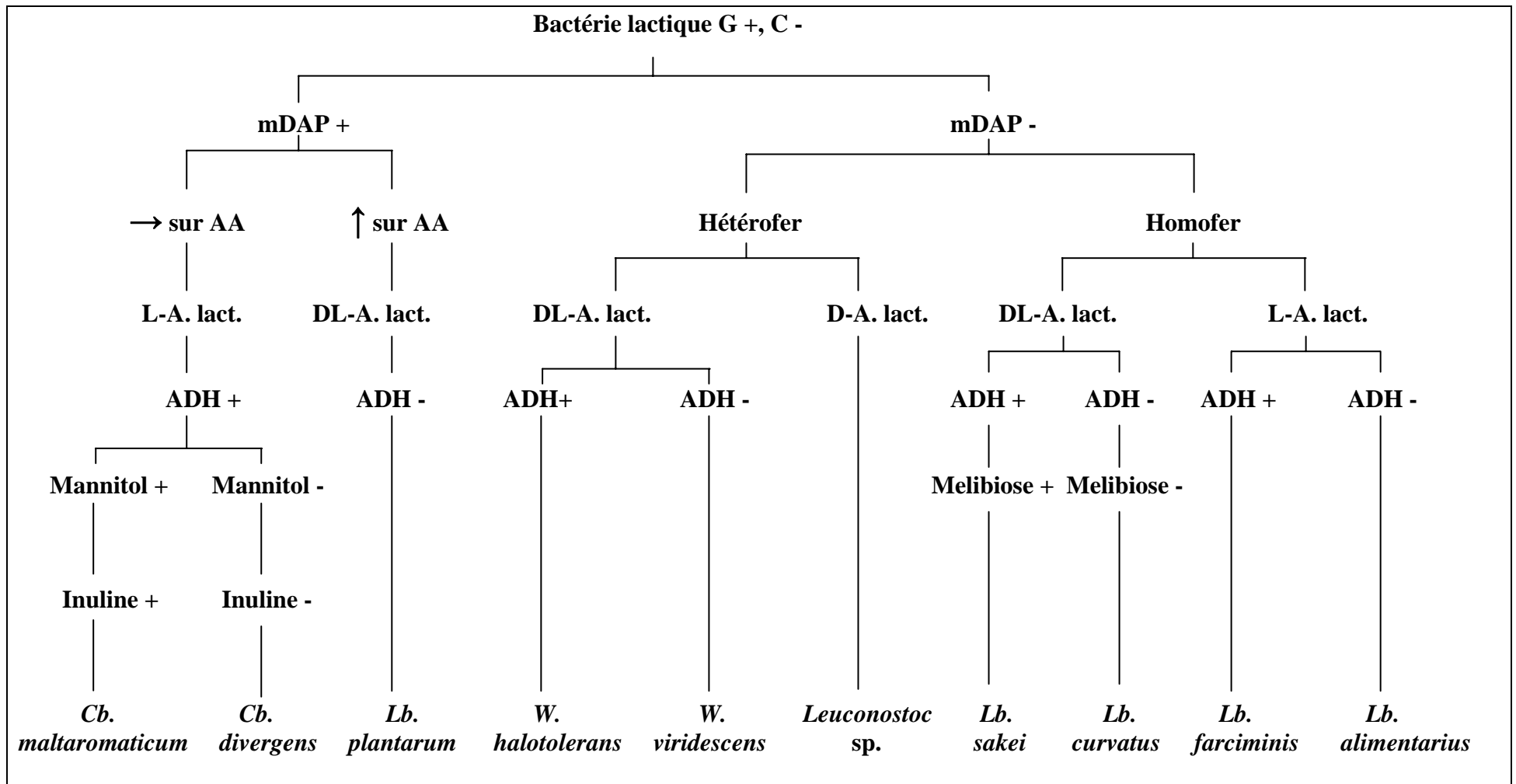


Figure 10. Clef d'identification des bactéries lactiques (Montel et *al.*, 1991).

été vérifiée par hybridation ADN-ADN et reste encore valable, si ce n'est le fait que *Lactobacillus viridescens* et *Lactobacillus halotolerans* ont été reclassés dans un autre genre, en l'occurrence *Weissella* (Collins et al., 1993). Aussi, *Cb. piscicola* a été reclassé comme *Cb. maltaromaticum* (Mora et al., 2003).

4.2. Analyse sérologique

Les techniques sérologiques dépendent de la capacité des constituants chimiques de la cellule bactérienne à se comporter comme des antigènes. Pour les bactéries lactiques, l'analyse sérologique se fait principalement suivant la méthode de Lancefield (1933), basée sur l'utilisation de polysaccharides de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigènes (Knox & Wicken, 1976). Bien que le sérotypage ait été largement utilisé dans le passé pour l'identification des bactéries lactiques, son utilisation est devenue très rare à l'exception de l'identification des streptocoques pathogènes.

4.3. Méthodes chimio-taxonomiques

4.3.1. Analyse des protéines cellulaires solubles par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

Le principe de cette méthode repose sur le fait que deux souches bactériennes possédant un niveau d'hybridation ADN-ADN de 90 à 100% et cultivées dans les mêmes conditions, produisent un même ensemble de protéines visualisé sous la forme d'une empreinte. Ainsi, leurs électrophorégrammes (ou profils protéiques) résultant de la séparation du mélange de protéines cellulaires par PAGE ne présenteront que des différences minimales. Les souches partageant une homologie d'ADN d'au moins 70%, présentent des empreintes protéiques ayant aussi un niveau élevé de similitude et produisent des électrophorégrammes encore assez semblables (Kerstens, 1985). Des banques de profils ont été créées grâce au développement d'un protocole très standardisé (Pot et al., 1994) et d'outils informatiques adaptés facilitant les comparaisons et les regroupements à l'aide de coefficients de similitude (Vauterin & Vauterin, 1992). L'électrophorèse des protéines est donc une méthode très sensible qui permet de différencier les bactéries lactiques à un niveau taxonomique fin, en l'occurrence la sous-espèce (Gatti et al., 2001) ou la souche (Sánchez et al., 2003). Cette méthode a été appliquée pour la différenciation entre *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* isolés de produits carnés fermentés (Dykes & van Holy, 1995).

4.3.2. Analyse des acides gras de paroi par chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des acides gras (A.G) des parois bactériennes par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse est une méthode rapide, sensible et sélective, permettant l'identification des bactéries lactiques moyennant une comparaison des chromatogrammes obtenus à des banques de données de profils d'A.G (Dykes et *al.*, 1995). Néanmoins les conditions de culture (apport nutritionnel, température de croissance, âge de la culture) doivent bien être établies et normalisées (Gilarová et *al.*, 1994).

Les bactéries lactiques contiennent différents types d'A.G. Les lactobacilles et les pédiocoques sont principalement caractérisés par une prépondérance d'A.G à longues chaînes linéaires saturées ou mono-insaturées, très souvent à nombre pair d'atomes de carbone et d'A.G. cyclopropanoïques. Les A.G. à chaîne ramifiées iso ou antésio et les A.G. hydroxyliques ou polyinsaturés sont absents de ce type de bactéries (ou à l'état de traces) (Rizzo et *al.*, 1987; Rementzis & Samelis, 1996). Cette méthode a été utilisée pour la différenciation entre *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* isolés de produits carnés fermentés (Rementzis & Samelis, 1996).

4.4. Méthodes étudiant la structure des acides nucléiques

4.4.1. Contenu en guanine et cytosine de l'ADN chromosomique

L'intérêt de la mesure du contenu en G+C (mol %) est liée à la grande diversité de la composition en guanine et en cytosine de l'ADN des micro-organismes, puisqu'elle va de 25% pour *Mycoplasma capricolum* à 75% pour *Micrococcus luteus* (Muto & Osawa, 1987). On peut conclure que deux isolats bactériens sont d'espèces différentes que si la différence de leur contenu G+C est d'au moins 5%; toutefois, deux souches ayant le même G+C ne sont pas forcément semblables parce que cette valeur ne prend pas en compte l'arrangement linéaire des nucléotides dans l'ADN.

Le contenu G + C des bactéries lactiques est généralement inférieur à 50 mol% étant donné qu'elles appartiennent au phylum *Clostridium*. Le genre *Lactobacillus* montre une grande diversité génétique. En effet, le contenu G + C varie entre un minimum de 32% pour *Lactobacillus mali* et un maximum de 54% pour *Lactobacillus fermentum* ou *Lactobacillus pontis*. Cette amplitude est deux fois plus grande que le seuil de 10% proposé pour l'identité du genre (Schleifer et Stackebrandt, 1983). En outre, ces contenus G + C maximum excèdent les 50 mol% proposés comme seuil de séparation entre les phylums des *Clostridium* et des

Actinomyces. Le contenu G + C de *Lb. sakei* est de l'ordre de 42-44% (Champomier-Vergès et al., 2002).

4.4.2. Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN repose sur la dénaturation de molécules d'ADN totaux appartenant à deux souches, puis à leur réappariement. La formation d'hétéroduplex (brin de chaque souche) sera gouvernée par le degré de ressemblance des deux génomes. Le pourcentage de réassociations hétérologues est ensuite calculé. La stabilité thermique est également un paramètre important car elle permet de mesurer le degré de mauvais réappariement au sein de l'hétéroduplex. 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 varie selon le genre bactérien (Zakrzewska-Czerwinska et al., 1988).

Cette méthode a été utilisée pour l'identification des bactéries lactiques fréquemment isolées de la viande. En l'occurrence *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. farciminis*, *Lb. alimentarius*, *Weissella halotolerans*, *W. viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Cb. divergens* et *Cb. piscicola* (Montel et al., 1991).

4.4.3. Séquençage de l'ARNr 16S et utilisation

Les séquences ribosomiques reflètent le génotype des bactéries. La stratégie de séquencer l'ARNr contenant des morceaux de régions variables et d'effectuer une analyse comparative de la séquence avec celles contenues dans des bases de données déjà existantes permet de déterminer les régions présentant une variabilité. Ces régions variables sont utilisées pour la synthèse de sondes oligonucléotides ou d'amorces PCR.

C'est principalement l'ARNr 16S pour lequel un grand nombre de séquences sont données. Malgré que la région de l'ARNr 16S spécifique à l'espèce est localisée dans les régions V1 à V3, l'identification est plus précise, si tout le gène est séquencé (Stackebrandt & Goebel, 1994). Dans certains cas l'analyse de séquence de la région entre les gènes 16S et 23S (Intergenic Spacer Region = ITS) a une expression beaucoup plus forte concernant la spécificité de l'espèce, que l'ARNr 16S lui même et souvent des espèces comme *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* et *Lactobacillus pseudoplantarum* ou *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus* peuvent être discriminées (Berthier & Ehrlich, 1998 ; Tannock et al., 1999). D'autres gènes spécifiques au genre (Ke et al., 1999) ou à l'espèce (Dutka-Malen et al., 1995) ont été aussi séquencés.

Ainsi, des amorces espèce-spécifiques ont été développées pour la plupart des bactéries lactiques fréquemment isolées de la viande et des produits carnés : *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* (Berthier & Ehrlich, 1998), *Lb. farciminis*, *Lb. alimentarius* (Rachman et al., 2003), *Cb. divergens*, *Cb. piscicola* (Rachman et al., 2004), *Ec. faecium* (Dutka-Malen et al., 1995), *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Moschetti et al., 2000).

4.4.4. Méthodes de typage basé sur l'ADN

Contrairement aux méthodes décrites ci-dessus, ces méthodes sont basées sur la génération d'empreintes issues d'une séparation électrophorétique des fragments d'ADN. Aujourd'hui les plus importantes méthodes utilisées pour distinguer les bactéries au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce sont l'ADN polymorphe amplifié au hasard (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), le polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) et l'analyse de restriction de l'ADN ribosomique amplifié (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA). Elles comportent une restriction enzymatique successive à une étape PCR. D'autres méthodes, aussi basées sur l'analyse des acides nucléiques, sont l'analyse de restriction de l'ADN génomique (genomic DNA restriction analysis), les profils plasmidiques (plasmid profiling) et le ribotypage (ribotyping) (Rodtong & Tannock, 1993).

4.4.4.1. RAPD

Introduite par Williams et al. en 1990, elle consiste à amplifier les fragments d'ADN en utilisant comme amorce un oligonucléotide d'une dizaine de bases. Afin de permettre l'hybridation de l'amorce à l'ADN cible, l'étape d'hybridation est réalisée sous faibles conditions astringentes. Il en résulte la génération de séquence d'amorces non spécifiques à l'espèce ainsi qu'une empreinte spécifique à la souche. Cette méthode présente un avantage en absence de données de séquences sur le génome en question ; néanmoins, elle doit être particulièrement standardisée pour être reproductible (Tailliez et al., 1998).

Cette méthode a été appliquée pour l'identification des bactéries lactiques fréquemment isolées des produits fermentés charcutiers, notamment *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* (Berthier & Ehrlich, 1999 ; Andrighetto et al., 2001).

4.4.4.2. AFLP

Elle a été introduite au début par Vos et *al.* (1995) pour l'analyse des génomes des plantes. Comme la technique RAPD, cette méthode est basée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et de polymorphisme d'hybridation d'une amorce de séquence arbitraire. Le principe de cette méthode repose sur le fait que des variations dans les profils de bandes reflètent une relation génétique entre les souches bactériennes examinées et donc que ces profils de bandes peuvent être considérés comme des empreintes génétiques pouvant être analysées numériquement dans un but d'identification et de caractérisation (Janssen et *al.*, 1996). Le concept AFLP consiste en trois étapes :

- (i) L'ADN génomique est coupé à l'aide de deux enzymes de restriction qui donnent des extrémités cohésives. Les enzymes ciblent, pour l'une, des sites de coupures fréquemment rencontrés sur le génome (4 pb) et pour l'autre, des sites moins fréquents (6 pb) ;
- (ii) Des adaptateurs d'une vingtaine de paires de bases ayant les extrémités cohésives correspondantes sont ligaturés aux fragments d'ADN coupés ;
- (iii) Des amorces ciblant ces adaptateurs sont utilisées de manière à amplifier par PCR les fragments coupés. Ces amorces contiennent à l'extrémité 3' (lieu d'attachement de la polymérase) une, deux ou trois bases supplémentaires choisies au hasard, permettant d'effectuer une sélection parmi les fragments d'ADN disponibles lors de la PCR réalisée en conditions non astringentes.

La technique peut évoluer en échangeant les enzymes de restriction, le nombre et la nature des bases supplémentaires accrochées à l'amorce. Une seule des amorces est marquée pour permettre la détection. Les fragments sont séparés par une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les profils sont révélés en fonction de la procédure de marquage utilisée (Aarts et *al.*, 1999 ; Janssen et *al.*, 1996).

Cette méthode a été utilisée pour l'identification de bactéries lactiques isolées de produits fermentés à base de poudre de Sorghum, notamment *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* (Kunene et *al.*, 2000). Aucune étude utilisant cette méthode n'a concerné l'identification des bactéries lactiques isolées des produits fermentés charcutiers.

4.4.4.3. ARDRA

C'est une technique combinant d'une part, la connaissance des séquences d'ARN ribosomiques et leur amplification spécifique et d'autre part la caractérisation des souches

avec leur profile de restriction. Ce type de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) a été nommé ARDRA par Vaneechoutte et *al.* (1992). L'avantage principal de cette méthode est qu'aucune information de séquence de l'ARN 16S amplifié n'est nécessaire (Weidner et *al.*, 1996). L'ADN génomique total de la communauté microbienne est extrait sans cultiver les micro-organismes participants. La présence de séquences universelles conservées aux extrémités 5' et 3' permet l'amplification de presque tous les fragments des gènes ARNr 16S de l'ADN extrait. Le produit PCR peut donc être cloné et la bibliothèque de gène ARNr 16S résultante peut être testée par différentes méthodes. Une hybridation de colonies peut être utilisée moyennant des amorces spécifiques. Les inserts peuvent être amplifiés et caractérisés par une digestion restrictive. Alternativement, un séquençage à une ligne peut être fait pour permettre une détection de grande résolution (Ward et *al.*, 1990) suivi par un séquençage complet et une identification comme décrit avant.

Cette méthode a été appliquée pour l'identification des bactéries lactiques isolées des vins (Rodas et *al.*, 2003) et pour la différenciation entre les sous-espèces de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et subsp. *lactis* (Giraffa et *al.*, 1998).

4.5. Méthodes spectroscopiques

4.5.1. Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les propriétés d'absorption des cellules bactériennes entières dans le moyen infra-rouge (4000 à 500 cm^{-1}) constituent un moyen d'identification des souches bactériennes, dans la mesure où chaque individu bactérien possède un spectre IRTF spécifique et reproductible (Naumann et *al.*, 1988). Ces spectres correspondent aux caractéristiques vibrationnelles de tous les constituants cellulaires : paroi, membrane, protéines cellulaires, polysaccharides, acides gras, acides nucléiques, etc.

Cette méthode permet une différenciation intergénérique et interspécifique. En effet, Amiel et *al.*, (2000) a réussi à discriminer des bactéries lactiques isolées de fromages au niveau du genre (100%) et au niveau de l'espèce (86%). C'est une méthode rapide et sensible, facilement informatisable et permet d'étudier en parallèle un grand nombre de souches bactériennes.

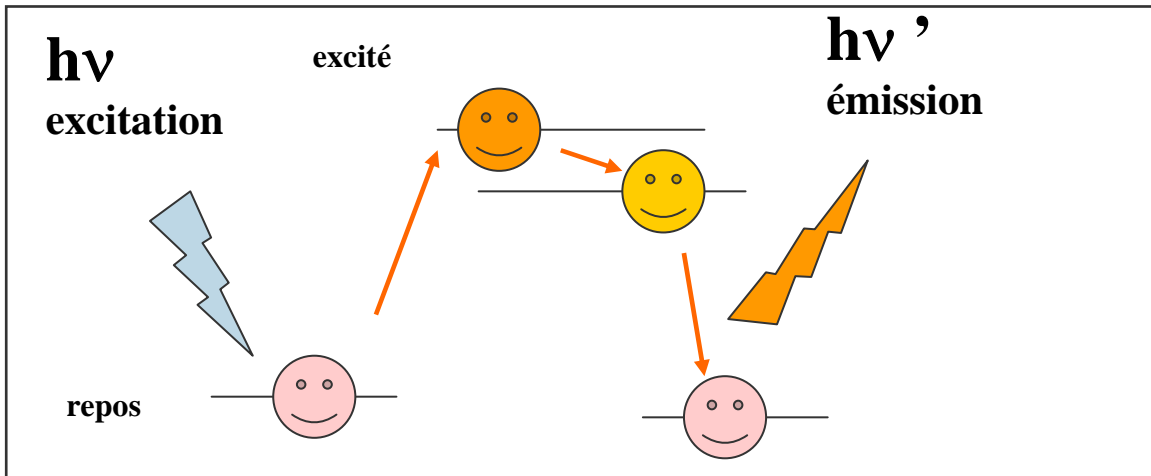


Figure 11. Principe de la fluorescence

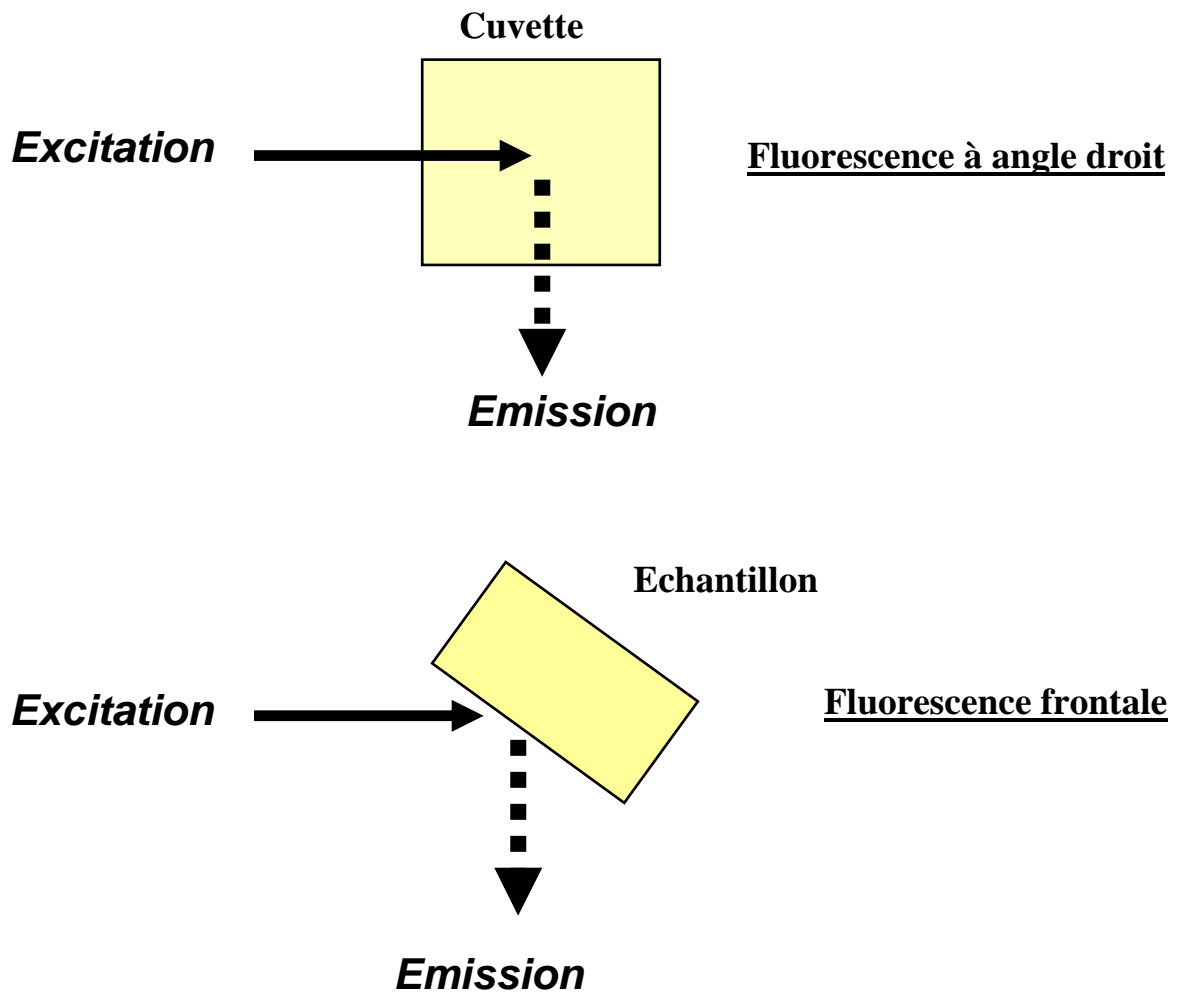


Figure 12. Dispositifs de spectroscopie de fluorescence frontale et à angle droit

4.5.2. Spectroscopie de fluorescence

4.5.2.1. La fluorescence

La luminescence est une des méthodes d'analyse les plus anciennes puisque les premières observations ont été faites dès le seizième siècle. Le phénomène de luminescence se décompose toujours en deux phases : l'excitation du système électronique de la substance et sa désexcitation (Fig. 11) au cours de laquelle l'émission lumineuse se produit. La fluorescence se produit rapidement (10^{-9} seconde) après l'irradiation. Dès 1852, Stokes décrit les phénomènes d'absorption et d'émission de la lumière et appelle fluorescence le phénomène qui résulte de l'émission de photons par une molécule après excitation de celle-ci à l'aide d'une radiation lumineuse dans l'U.V ou le visible.

Il s'agit donc de l'émission de photons de plus faible énergie, donc de plus grande longueur d'onde que les photons absorbés (Lakowicz, 1983). La fluorescence représente un outil puissant d'analyse utilisé dans un grand nombre de domaines (chimie, biologie, médecine, etc.) du fait de sa grande sensibilité et de sa spécificité. En effet, les méthodes fluorimétriques permettent de détecter des substances aux concentrations inférieures à 1 ppm, ce qui représente une sensibilité 1000 fois supérieure aux autres techniques d'absorption. La spécificité de la fluorescence est le résultat de deux facteurs (Eisinger & Flores, 1979) :

- Il y a beaucoup moins de molécules qui fluorescent que de molécules qui absorbent.
- Deux longueurs d'onde sont utilisées en fluorométrie (excitation et émission), et une seule en spectrophotométrie (absorbance). Deux molécules qui absorbent à la même longueur d'onde ne réémettront pas forcément à la même longueur d'onde. La différence entre les pics d'excitation et d'émission peut varier de 10 à 280 nm.

4.5.2.2. La spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une méthode rapide et sensible qui fournit des informations sur la présence de certaines molécules et sur leur environnement dans des échantillons biologiques. Elle peut être utilisée de deux façons différentes en fonction de la nature de l'échantillon (Fig. 12, Genot et *al.*, 1992) :

- Si l'échantillon se présente sous forme d'une solution diluée dont l'absorbance est inférieure à 0,1, les mesures de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un système dit « à angle droit ». C'est la spectroscopie de fluorescence classique. Avec cette technique, le faisceau d'excitation traverse la cuve et on collecte les photons émis perpendiculairement à l'excitation. Ce système est majoritairement utilisé.

- Si l'échantillon est concentré (densité optique > 2) ou de nature solide et opaque, on utilise la spectroscopie de fluorescence frontale où le faisceau d'excitation pénètre seulement quelques microns de la surface de l'échantillon. Les photons émis sont collectés à un angle de 54° par rapport à l'échantillon afin de minimiser la collection de photons réfléchis.

4.5.2.3. Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence

Les données de fluorescence sont généralement présentées sous forme de spectres (d'excitation ou d'émission) constitués de plusieurs centaines de points de mesure. Contrairement aux spectres IRTF, les spectres de fluorescence présentent souvent une seule bande avec un seul maximum. Les conditions utilisées sont en général spécifiques d'un seul fluorophore. Le spectre d'émission correspond pour chaque longueur d'onde d'émission au nombre de photons émis suite à l'excitation d'un fluorophore. L'allure du spectre d'émission d'un fluorophore varie en fonction de la structure chimique de la molécule mais également en fonction des caractéristiques physico-chimiques de son environnement proche. Les modes de traitements traditionnels des données spectrales en fluorescence reposent sur la seule détermination de l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission ou celle de la surface soutendue par le spectre (Lakowicz, 1983). De même, peuvent être considérés les déplacements du maximum se produisant lorsque l'environnement du fluorophore est modifié.

4.5.2.4. Les sondes fluorescentes

Il existe un grand nombre de molécules fluorescentes. Les sondes fluorescentes extrinsèques comme l'acridine orange ou encore la fluorescéine sont des molécules que l'on ajoute à un échantillon et qui sont capables de s'insérer dans diverses molécules de la cellule étudiée autorisant la détermination d'activités enzymatiques, du potentiel membranaire, du pH intracellulaire ou encore de la viabilité des cellules (Larsen *et al.*, 1996 ; Lebrun *et al.*, 2001 ; Rapposch *et al.*, 2000). Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, histidine, tyrosine et tryptophane) des protéines, les purines, les pyrimidines, certains cofacteurs enzymatiques, comme le NADH ainsi qu'un grand nombre de vitamines présentent des propriétés de fluorescence (Dawson *et al.*, 1986 ; Louisot, 1983). Ces molécules intrinsèques possèdent de nombreuses doubles liaisons conjuguées. La capacité d'absorption et d'émission de la lumière par une molécule dépend de l'arrangement des électrons autour des noyaux constituant sa structure. Pour cette raison, il est envisageable d'utiliser la

fluorescence intrinsèque de ces composants bactériens afin de caractériser les diverses activités de la cellule.

En utilisant cette approche, Leblanc & Dufour (2002) ont pu discriminer certaines lactobacilles et staphylocoques au niveau du genre et de l'espèce. Ils ont aussi montré une discrimination des staphylocoques au niveau de la souche.

III.- Présentation du sujet

La diversification des entreprises agricoles dans la valorisation des produits de leur exploitation représente une source de revenu importante. C'est le cas des productions fermières charcutières dans le Massif Central.

Néanmoins, les salaisonniers sont aujourd'hui confrontés au durcissement de la réglementation concernant la mise aux normes des établissements à faible capacité de production (Directive 93/43 CEE), dans la mesure où les producteurs fermiers doivent prouver que les produits qu'ils commercialisent au niveau des marchés sont de bonne qualité hygiénique. Pour cela, il est effectivement demandé aux producteurs de mettre en place un système de maîtrise des risques selon la méthodologie HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point).

La tendance vers "l'ultra propre" ne convient pas forcément aux produits fermentés traditionnels (fromage, saucisson, etc.). En effet, certaines flores qui survivent dans l'environnement de fabrication participent au développement des caractéristiques organoleptiques de ces produits. Suite à la mise en place de plans de nettoyage et de désinfection drastiques, on assiste à des pertes de typicité des produits, voir même à des problèmes de fabrication. L'environnement de ces ateliers devrait donc être "maîtrisé", mais pas stérilisé.

Afin de préserver la typicité des produits fermiers, une démarche de type écologie microbienne dirigée peut être envisagée. Elle permettrait d'assurer une bonne qualité hygiénique, tout en maintenant la spécificité organoleptique des saucissons. Une partie de la valeur ajoutée d'un produit fermier provient justement de sa spécificité organoleptique, liée à la flore endogène de l'atelier. Cette démarche consisterait à sélectionner des solutions de décontamination sélective pouvant permettre de préserver la flore technologique, notamment la flore lactique, tout en éliminant les flores néfastes. Elle consisterait aussi à sélectionner à partir de la flore endogène de l'atelier, des ferments pouvant assurer une maîtrise globale de la fermentation. Une utilisation de ferments industriels modifierait la dynamique des communautés microbiennes endogènes aboutissant probablement à une perte de typicité du produit. Cette approche inclut également la sélection des bio-préservateurs pouvant jouer le rôle de « flore barrière » à la croissance des micro-organismes indésirables au niveau des surfaces et des équipements de l'atelier.

METHODOLOGIE, RESULTATS ET DISCUSSION

I.- Description de l'écosystème microbien de l'atelier étudié

1. Ecologie microbienne d'un atelier fermier de salaison

Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis à « Food Control » : Chevallier, I., Ammor, S., Laguet, A., Labayle, S., Castanet, V., Dufour, E. & Talon, R. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Control*, *accepté sous réserve*.

1.1. Objectifs

Comme mentionné dans l'étude bibliographique, le saucisson sec fermier n'est pasensemencé par des ferments. Sa qualité est donc étroitement liée à la flore contaminant les matières premières et à celle endogène à l'atelier. Décrire l'écosystème microbien d'un atelier est une étape primordiale dans le développement des qualités hygiénique et organoleptique du saucisson sec qui y est produit.

Dans le cadre d'un programme régional réalisé en collaboration avec la Chambre d'Agriculture de Haute-Loire, nous avons sélectionné un atelier fermier pour l'étude. Le principal critère de sélection était la non utilisation de ferments. L'objectif de ce chapitre est de décrire l'écosystème microbien de cet atelier fermier. Une étude basée sur l'approche HACCP a permis de choisir 17 points de contrôle (Calvin & Giey, 2000). Douze points de contrôle concernaient les surfaces et équipements de l'atelier (table A, table B, mur, billot, chambre froide, bassines, couteaux, mur du séchoir, barres du séchoir, hachoir, mélangeur et poussoir) et cinq portaient sur les matières premières et le produit à différents stades de fabrication (carcasses, maigre+gras, mûlée, saucisson après 1 semaine et saucisson après 9 semaines). Les prélèvements de surfaces ou de produits, ainsi que les enregistrements des caractéristiques physiques (température et hygrométrie ambiantes, pH, type de matériau, état et humidité apparente) des sites de prélèvement ou des échantillons de produits ont été effectués 4 fois au cours d'une année (Février, Mars, Avril et Mai) afin de tenir compte de l'effet saison (hiver et printemps) sur l'écosystème microbien de cet atelier.

1.2. Résultats et discussion

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 12 points de contrôle portant sur les surfaces et équipements de l'atelier, seuls le billot et le poussoir constituaient des points de contrôle critiques étant donné leurs taux de contamination élevés. Les autres points de contrôle contenaient une faible population bactérienne. Le poussoir présente des bras morts favorisant l'implantation de réservoirs de contaminants. Le billot est fabriqué en bois et présente beaucoup de rayures susceptibles d'abriter des niches microbiennes.

Les prélèvements au niveau des surfaces et des équipements ont été effectués après les opérations de nettoyage et de désinfection. Les résultats obtenus ont montré que ces opérations détruisaient presque toutes les bactéries, y compris les bactéries lactiques.

Les matières premières constituaient la principale source de contamination retrouvée dans le produit final. Leur contamination était significativement influencée par la saison. En effet, les populations des *Pseudomonas* et des entérobactéries présentaient des taux supérieurs de presque $3 \log_{10}$ u.f.c/g au printemps par rapport à l'hiver. Par conséquent, le produit final présentait des taux de contamination par la flore d'altération plus élevés au printemps qu'en été. Des valeurs similaires ont été trouvées dans d'autres ateliers fermiers : projet européen « Tradisausage » regroupant 10 partenaires et portant sur 50 ateliers fermiers. Des taux élevés de contamination par la flore d'altération peuvent entraîner des problèmes de fabrication et donc des pertes économiques importantes. Chevallier & Leriche (1999) ont noté des pertes de fabrications avoisinant les 25% de production à certaines périodes de l'année.

L'absence d'acidification du produit surtout durant la fermentation (le pH du saucisson 1 semaine = 6,1 - 6,2), due probablement au non ajout de sucres à la mûlée, a probablement contribué au maintien de la flore d'altération et même pathogène (*Sc. aureus*) au niveau du produit final. En effet, en l'absence de glucides, les bactéries lactiques et à moindre échelle les staphylocoques/*Kocuria*, produisent une très faible quantité d'acide lactique. En plus, l'acide lactique peut être assimilé par les levures qui remontent le pH. Ceci pourrait expliquer que le pH du produit en automne est passé de 6,2 après une semaine de fabrication à 6,5 dans le produit final. De ce fait, la flore indésirable acido-sensible n'est pas inhibée et continue même à se développer. L'absence de glucides représente un facteur limitant pour la flore d'intérêt technologique qui se développe très lentement.

Il est intéressant de noter que le séchage est une étape clef pour la qualité et de la durée de conservation du saucisson fermier. Au cours de cette étape, les lactobacilles et les staphylocoques/*Kocuria* se développent et deviennent majoritaires. En effet, en l'absence d'une acidification, seul le séchage a permis de réduire les taux de contamination par les flores d'altération et pathogène. Bien que les entérobactéries aient pu se maintenir du fait du taux de contamination initial élevé, les *Pseudomonas*, sensibles à l'anaérobiose et à l'action conjointe du séchage, ont vu leur nombre décroître.

Les résultats obtenus dans cette partie confirment la problématique énoncée dans la présentation générale. Néanmoins, Il faut noter que ces résultats obtenus par des méthodes conventionnelles ne sont représentatifs que de la flore cultivable. Or, il a été estimé que dans certains écosystèmes, moins de 1% des micro-organismes sont cultivables (Amann et *al.*, 1995). Le passage par une étape de culture engendre donc la non détection des bactéries viables mais non cultivables et des bactéries qui pourraient être cultivées si un milieu approprié était disponible (Duthoit et *al.*, 2003). En outre, afin de tenir compte des interactions qui existent entre les micro-organismes, il est important d'étudier l'écosystème dans son ensemble. Il est donc souhaitable d'utiliser simultanément à l'approche conventionnelle, des méthodes moléculaires directes basées sur la PCR afin de s'affranchir de la culture d'isolats.

1.3. Conclusion

Aux vues des résultats obtenus dans cette partie, on peut conclure que la qualité du saucisson sec est étroitement liée à la flore contaminant les matières premières et à la flore endogène à l'atelier. Elle est aussi étroitement liée au procédé de fabrication. L'addition de sucres à la mûlée pourrait être d'une utilité importante dans l'amélioration de la qualité hygiénique du saucisson sec fermier. Néanmoins, une question reste posée : est ce que l'ajout de sucres à la mûlée ne changerait pas la typicité du produit ? Par ailleurs, il est clair que les procédés de nettoyage et de désinfection utilisés, efficaces dans le cas de fabrications de produits frais, ne sont pas adaptés à ce type de production, qui dépend d'une flore assurant la fermentation. Les faibles taux de bactéries lactiques au niveau des surfaces et des équipements de cet atelier en témoignent.

La maîtrise de l'hygiène dans cet atelier fermier pourrait être acquise si l'écologie microbienne de ce dernier était dirigée. Diriger l'écologie microbienne consisterait à élaborer des ferments spécifiques à cet atelier afin de maîtriser la fermentation sans pour autant altérer

la typicité du produit. Il consisterait aussi à mettre en place une flore barrière endogène à l'atelier, de façon à prévenir le développement de la flore indésirable au niveau des surfaces et équipements de l'atelier, tout en préservant la typicité du produit. Enfin, il serait envisageable de mettre en place des procédures de désinfection sélectives capables de détruire la flore pathogène et celle d'altération sans trop affecter la flore d'intérêt technologique.

A partir des dénombrements effectués, un soucier des flores d'intérêt technologique, d'altération et pathogène a été constitué. Nous nous sommes intéressés, pour la suite de l'étude, à la flore lactique, alors que notre partenaire (Equipe de microbiologie, de la SRV, INRA-Theix) s'est intéressé aux staphylocoques/*Kocuria*.

Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage

I. Chevallier ^{a,*}, S. Ammor ^a, A. Laguet ^a, S. Labayle ^a, V. Castanet ^a,
E. Dufour ^a, R. Talon ^b

^a *Unité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires, ENITA-CF, site de Marmilhat, 63370 Lempdes, France*

^b *Unité de Recherche sur la Viande, INRA-Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France*

Received 1 September 2004; received in revised form 4 February 2005; accepted 7 February 2005

Abstract

The microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage (without addition of starter cultures) was investigated at 17 control points (12 processing surfaces and equipments samples, 5 raw materials and products samples) and at different periods: winter and spring.

Technological flora (lactic acid bacteria, staphylococci/*Kocuria* and yeast/moulds) populations were low in processing surfaces and equipments (below 10^2 c.f.u/cm²), but reached a level of about 10^6 – 10^7 c.f.u/g for lactic acid bacteria and staphylococci/*Kocuria* and about 10^4 c.f.u/g for yeasts/moulds in the final product. Counts of enterococci were low in most of processing surfaces and equipments and increased in the batter and the sausage-1 week; but declined after 8 weeks of ripening.

Differences in temperatures of the processing facility recorded in winter and in spring influenced the hygienic quality of raw materials. *Pseudomonas* and Coliforms populations enumerated from raw materials in spring were about $3 \log_{10}$ c.f.u/g superior compared to enumeration results recorded in winter. While *Pseudomonas* population declined remarkably in the final product, Coliforms population remained higher. *Staphylococcus aureus* was undetected in spring; however in winter, its population was about $2.5 \log_{10}$ c.f.u/g in the final product after 9 weeks ripening. One isolate originating from the stuffing machine was identified as *Listeria monocytogenes*. Finally, 9 presumptive *Salmonella* were identified as belonging to *Hafnia alvei*, *Providencia alcalifaciens*, *Proteus vulgaris*, *P. penneri* and *Morganella morganii* species.

These results emphasize the necessity of improving the general hygienic conditions and also technological process of sausage production in this processing facility.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Microbial ecology; Small-scale facility; Traditional dry sausage; Hygiene

1. Introduction

Traditional dry sausage production has increased overall Europe since the 1980's (François, 1995). The development is due to several factors such as the decrease of employment in many industrial sectors and the consumer's request for natural and authentic prod-

ucts (Lagrange & Lelièvre, 1995). France with an annual production of approximately 100,000 tons, is the fourth producer of dry sausage in Europe (Fisher & Palmer, 1995). The Rhone-Alpes and Auvergne regions ensure more than 70% of this production, which is largely traditional.

Traditional producers must be in agreement with EC Directive 93/43 (Council of the European Communities, 1993) and others Directives referring to meat, which imposes limits on practice, ensuring that safe products are

* Corresponding author. Tel.: +33 4 7398 1393; fax: +33 4 7398 1390.
E-mail address: chevallier@enitac.fr (I. Chevallier).

delivered. However, in spite of this directive, the hygiene management in small-scale facilities is still very variable (Gauer, Legoff, Leriche, & Chevallier, 1998). Few sporadic studies on traditional meat products have shown that hygienic shortcomings can lead to 25% of product loss with high economic consequences and may undermine consumer confidence for traditional products (Chevallier & Leriche, 1998).

Traditional dry sausage fermentation relies on natural contamination of raw materials by environmental flora. This contamination occurs during slaughtering and increases during manufacturing. Each processing facility has a specific house flora, composed of useful microorganisms for the fermentation and flavour of sausage, as well as of spoilage and pathogenic flora. Thus, the characterization of this house flora is crucial because safety (pathogenic flora), acceptability (spoilage flora) and sensorial quality (technological flora) of the product depend totally on it.

All papers on the microbial ecology of traditional dry sausage considered only the product and did not investigate the global microbial ecology of the processing facility. Therefore, the aim of this study was to survey the typical house flora of a small-scale facility producing traditional dry sausage without addition of starter cultures.

2. Materials and methods

2.1. Samples collection

Samples used in this study were collected from a meat small-scale facility located in a mountain farm (altitude: 1080 m; Haute-Loire region, France). Dry sausage was manufactured with pork lean (2/3), pork fat (1/3), NaCl (2.5%) and spices, mainly pepper, but without inoculation of starter cultures to the batter. The batter was stuffed into natural casings, fermented for 1 week at 12 °C and dried 8 weeks in a natural dryer.

Samples were collected at 17 control points determined at the basis of previous work dealing with the application of HACCP approach in this processing facility (Chevallier, Talon, Laguet, Labayle, & Labadie, 2001). Twelve samples were collected from processing surfaces and equipments (tables A and B, wall, block, cold room, bowls, knives, dryer wall, dryer bars, mincing, mixing and stuffing machines) (Fig. 1). Sampling was performed after the cleaning and disinfection procedures and before the manufacturing process to have a better representation of the residual flora. Sampling was carried out under aseptic conditions. A delimited area of 169 cm² was swabbed by sterile rags (13 × 13 cm²) containing 15 ml of neutralizing solution (10% v/v) (ATL®, Laboratories Humeau, La Chapelle-sur-Erdre, France) to remove the inhibiting action

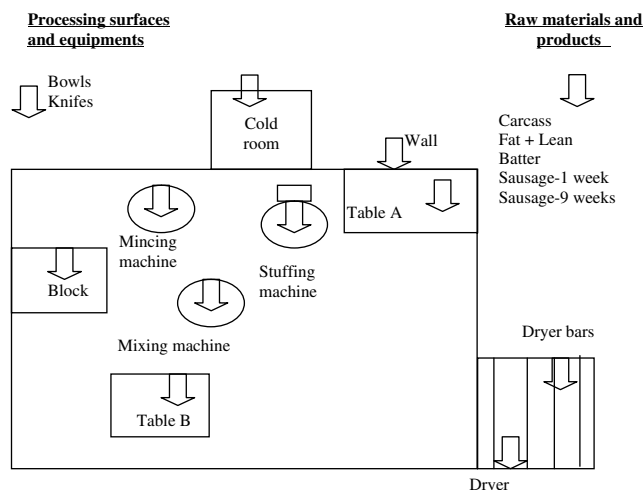


Fig. 1. Scheme of the control points position in the studied small-scale facility (CP1: table A, CP2: table B, CP3: wall, CP4: block, CP5: cold room, CP6: bowls, CP7: knives, CP8: dryer wall, CP9: dryer bars, CP10: mincing machine, CP11: mixing machine, CP12: stuffing machine, CP13: carcass, CP14: batter, CP15: fat + lean, CP16: sausage-1 week, CP17: sausage-9 weeks).

of the residual disinfectant. Rags were then placed in sterile stomacher bags (AES Laboratories, Combourg, France) containing 100 ml of saline tryptone (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and kept at 4 °C before analysis.

Five samples of 65 g were collected from raw materials (carcass, fat and lean) and products (batter, sausage-1 week, dry sausage-9 weeks). They were kept at –20 °C before analysis. Each sample was placed in sterile stomacher bag as follow: 10 g in 90 ml of peptoned buffer (Biokar Diagnostics), 25 g in 225 ml Fraser 1/2 broth (Biokar Diagnostics), 25 g in 225 ml Selenite–cystine broth (Biokar Diagnostics) and 5 g in 25 ml of distilled water. The first was used for microbial flora enumeration, the second and the third ones for the detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*, respectively. The last one was used for measuring the pH of the product. Sampling was performed in four periods over one year: two repetitions in winter (February and March) and two repetitions in spring (May and June). A total of 68 samples were collected.

2.2. Microbiological analysis

Samples were stomached in Stomacher bags with a Lab Blender 400 Stomacher (Seward, UK) for 6 min. Serial dilutions were then pour plated in duplicate on the appropriate selective medium and incubated under the appropriate conditions (Table 1). Except Rambach agar which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), all other media were purchased from Biokar Diagnostics. The results were expressed in c.f.u/g for meat samples and in c.f.u/cm² for processing environmental samples.

Table 1

Normalized methods used for the enumeration of technological, spoilage and pathogenic flora in the environment and meat samples

Target flora	Guidance norm	Selective agar medium	Incubation conditions		
			Time (d)	T °C	An ^a /Ae ^b
Lactic acid bacteria	NF V 04-503 ^f	MRS + A ^c + B ^d	2	30	An
Staphylococci/ <i>Kocuria</i>		Chapman + A + B	2	37	Ae
Yeast and moulds	NF ISO 13681 ^f	PDA + C ^e	5	25	Ae
Enterococci		KEA	2	37	Ae
<i>Pseudomonas</i> spp.	NF V04-504 ^f	CFC	2	25	Ae
Coliforms	NF ISO 4832 ^f	VRBL	1	30	Ae
<i>Listeria</i> spp.	NF ISO 11290-2 ^f	Palcam	2	37	Ae
<i>Salmonella</i> spp.	NF ISO 6579 ^f	Rambach	2	37	Ae
<i>Staphylococcus aureus</i>	NF V08-014 ^f	Baird Parker	2	37	Ae

^a An: anaerobic.^b Ae: aerobic.^c A: nalidixic acid (40 mg/l) (Sigma-Aldrich Chemie, Germany) to inhibit Gram-negative bacteria.^d B: delvocid (200 mg/l) (Gist-Brocades, Netherlands) to inhibit yeast and moulds.^e C: oxytetracycline to inhibit the growth of bacteria.^f AFNOR (1998).

Colonies isolated from Palcam agar were checked for their belonging to *L. monocytogenes*. After preliminary tests (Gram-staining, oxydase and catalase activities), identification with the API *Listeria* gallery (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) was performed according to the manufacturer's instructions. Hemolytic activity was researched on Columbia agar (Biokar Diagnostics) added with a sheep blood (Capita, Alonso-Calleja, García-Fernández, & Moreno, 2001). Finally, a simple color test based on a DL-alanine-beta-naphthylamide reaction which differentiates *L. monocytogenes* from other *Listeria* species (Clark & McLaughlin, 1997) was carried out. *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* (CIP 7842T), *L. innocua* (CIP 20595) and *L. monocytogenes* (LO28) were used as reference strains.

Colonies isolated from Rambach agar were checked for their belonging to *Salmonella*. After preliminary tests (Gram-staining, oxydase and catalase activities), identification with the API 20E gallery (BioMérieux) was performed according to the manufacturer's instructions.

2.3. Evaluation of process control

The internal product temperature and pH were recorded using a temperature probe and a pH meter CG 840 (Schott, Mainz, Germany). The ambient temperature and relative humidity were measured with a digital thermometer and hygrometer (ATL). pH of surfaces were recorded using pH paper (Lyphan, Germany). Characteristics of surfaces were noted.

2.4. Statistical analysis

A principal component analysis (PCA) was applied on data of bacterial enumerations. The computer software used was XLSTAT (Addinsoft, Paris, France).

3. Results

3.1. Microbial ecosystem of the small-scale facility

Table 2 summarizes microbial counts of technological, spoilage and pathogenic flora in the processing surfaces and equipments samples (\log_{10} c.f.u/ml) and in raw materials and products samples (\log_{10} c.f.u/g).

Considering technological flora, lactic acid bacteria were not detected in most of processing surfaces and equipments. They were found in only the table B, the block, the dryer bars and wall and in the stuffing machine. However, they were isolated from raw materials and products. Their counts were low in processing surfaces and equipments and in raw materials (0.3–3.9 \log_{10} c.f.u/cm²) and increased considerably during the fermentation reaching levels of 6.5–7.7 \log_{10} c.f.u/g. *Staphylococci/Kocuria* were enumerated from the 17 samples. Their counts varied from 0.5 to 5.4 in processing surfaces and equipments and in raw materials, related to the season. In the final product, they reached levels varying between 6.2 and 7.3 \log_{10} c.f.u/g. Yeasts/moulds were detected in most of samples. Their counts were comprised between 2 and 4 \log_{10} c.f.u/cm² (c.f.u/g).

Counts of enterococci were low in most of processing surfaces and equipments and increased in the batter and in the sausage-1 week; but declined after 8 weeks of fermentation. Moreover their counts were dependent of the season.

Coliforms and *Pseudomonas* were isolated from tables A and B, the block, the stuffing machine, raw materials and products samples. Their counts were especially high in raw materials and products samples. While *Pseudomonas* declined in the sausage-9 weeks compared to the sausage-1 week, Coliforms populations stabilized at the same level in winter and increased slightly in spring reaching a level of about 5.6 \log_{10} /g.

Table 2
Microbial counts of technological, spoilage and pathogenic flora in the processing surfaces and equipments samples (\log_{10} c.f.u/ml) and in raw materials and products samples (\log_{10} c.f.u/cm²)

Control point	Lactic acid bacteria		Coagulase negative staphylococci		Yeast/moulds		Enterococci		Coliforms		<i>Pseudomonas</i>		<i>Sc. aureus</i>	
	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
<i>Processing surfaces and equipments</i>														
Table A	>0.30	>0.30	1.95	3.91	0.78	2.42	>0.30	1.39	0.86	1.19	1.39	2.06	>0.30	>0.30
Table B	1.02	1.02	2.25	2.52	3.54	3.72	1.77	1.11	2.70	1.79	1.43	1.76	>0.30	>0.30
Wall	>0.30	>0.30	0.54	0.51	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30
Block	2.64	0.54	4.11	4.41	3.01	3.10	0.48	1.11	3.65	3.95	1.95	1.95	0.69	0.87
Cold room	>0.30	>0.30	3.29	3.79	3.83	4.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30
Bowls	>0.30	>0.30	1.15	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	0.30	0.30	>0.30	>0.30
Knifes	>0.30	>0.30	2.58	3.06	0.95	1.29	>0.30	1.98	>0.30	>0.30	>0.30	1.67	>0.30	>0.30
Dryer wall	1.51	1.51	4.27	4.73	1.88	2.44	>0.30	1.43	>0.30	>0.30	0.70	0.70	>0.30	>0.30
Dryer bars	0.30	0.30	4.00	4.67	1.81	4.06	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30
Mincing machine	>0.30	>0.30	1.36	1.83	1.95	1.98	0.65	0.65	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30
Mixing machine	>0.30	>0.30	1.31	1.74	0.81	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30	>0.30
Stuffing machine	3.13	3.08	3.15	2.41	3.28	2.71	3.95	2.08	3.15	2.28	3.67	2.74	0.98	>0.30
<i>Raw materials and products</i>														
Carcass	1.03	1.34	1.87	1.32	>0.30	>0.30	3.67	0.70	2.66	1.44	3.37	1.59	>0.30	>0.30
Fat + lean	>0.30	>0.30	3.33	3.48	2.10	4.79	1.39	2.60	1.61	4.07	3.42	5.51	1.40	>0.30
Batter	1.91	3.94	1.80	5.46	2.20	4.92	2.69	3.82	1.97	5.56	3.59	5.57	3.18	3.48
Sausage-1 week	6.64	7.12	5.30	6.26	2.77	4.08	2.86	3.06	3.67	4.20	2.86	3.00	1.88	2.18
Sausage-9 weeks	6.50	7.74	6.23	7.32	4.23	4.09	1.70	1.30	3.00	4.39	1.70	1.87	2.51	>0.30

W: samples collected in winter (February, March); S: samples collected in spring (May, June).

It is interesting to note that spoilage and pathogenic flora was practically undetected from most of processing surfaces and equipments. However, their counts were relatively high in the block and the stuffing machine.

The pathogenic *Staphylococcus aureus* was present in most of raw materials and products samples, especially in winter. Its counts were high in the batter and decreased slightly during the fermentation. In spring, it was undetected; however in winter, its population was about $2.5 \log_{10}$ c.f.u/g, which is a very high level compared to the French norm (below 25 c.f.u/g).

Sixteen presumptive *Listeria* species were isolated from the stuffing machine, the block, dryer bars, carcass, the batter, the sausage-1 week and the sausage-9 weeks. However, only one originating from the stuffing machine was identified as *L. monocytogenes*. Nine presumptive *Salmonella* species grown on Rambach medium and isolated from the table A, the stuffing machine, the carcass, the batter, the sausage 1 week and the sausage-9 weeks, were identified as belonging to *Hafnia alvei*, *Providencia alcalifaciens*, *Proteus vulgaris*, *P. penneri* and *Morganella morganii* species.

To have a global view, a PCA was performed on \log_{10} c.f.u/g (c.f.u/cm²) cells counts enumerated for both seasons. Fig. 2 presents the factorial biplot defined by the principal components 1 and 2. The principal component 1 which took into account 58.5% of the total variance separated control points with relative high cell counts from those with relative low cell counts. The principal component 2 that accounted for 15.8% of the total variance separated between technological and spoilage flora. It clearly showed that the table B, the

block, the sausage-1 week and the sausage-9 weeks were positively correlated to the technological flora, while the batter, the stuffing machine and the fat and lean were positively correlated to the spoilage and pathogenic flora.

3.2. Evaluation of process control

Table 3 summarizes physical characteristics of the different control point. The seasonal period (winter or spring), influenced greatly the ambient temperature of the processing facility and consequently temperatures recorded in spring were superior of about 3 °C compared to those in winter. pH values of processing equipments and surfaces were lower in spring (5.5 ± 0.2) compared to winter (6.2 ± 0.2).

pH of sausage 1 week and 9 weeks remained high showing that there was no acidification of the product during the fermentation. Sausage-9 weeks sampled in spring had a particularly high final pH (6.5).

Concerning the state of equipment, the block made from wood and tables were characterized by many stripes and organic residues of raw material, which allow bacteria attachment. The stuffing machine was characterized by the presence of fatty layer which constitute a support for spoilage and pathogenic flora development.

The higher temperature in the processing facility in spring was certainly the major factor that explained the different initial contamination or survival of the microorganisms and then their different growth during the ripening (Table 2).

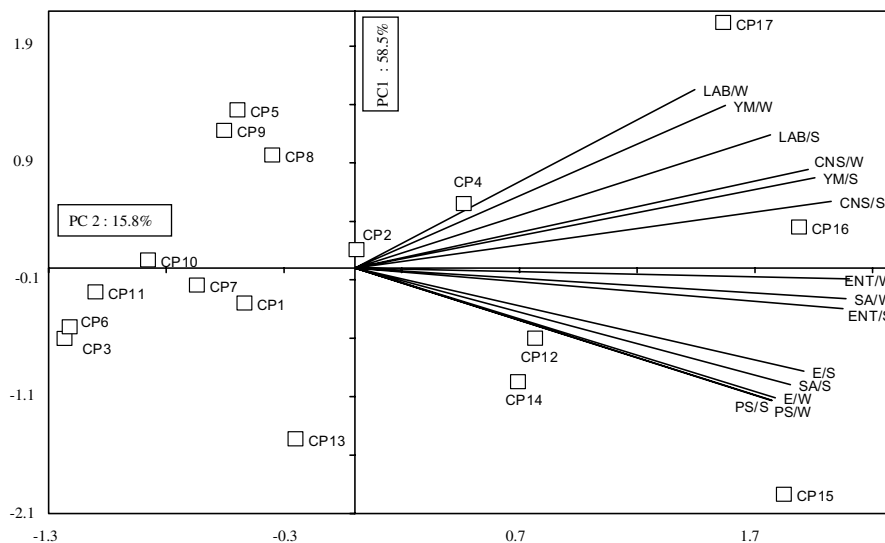


Fig. 2. Factorial biplot defined by the principal components 1 and 2 for viable counts of microorganisms in processing materials and equipments, in raw materials and in products, in winter and in spring. Coding for bacteria: SK: staphylococci/*Kocuria*; LAB: lactic acid bacteria; YM: yeasts/moulds; PS: pseudomonas; E: coliforms; ENT: enterococci. Coding for season: W: winter; S: spring. Coding for control points: TA: table A; TB: table B; W: wall; BL: block; CR: cold room; BW: bowls; K: knives; DW: dryer wall; DB: dryer bars; M: mincing machine; MM: mixing machine; SM: stuffing machine; CAR: carcass; F + L: fat + lean; BAT: batter; S1W: sausage-1 week; S9W: sausage-9 weeks.

Table 3
Physical characteristics of the different control points

Control point	Ambient temperature (°C)		Ambient relative humidity (% HR)		pH surface or product		Material	State	Apparent moisture
	W	S	W	S	W	S			
	Table A	12.4	16.5	70	79	6.3			
Table B	12.4	16.5	70	79	6.3	5.6	Resin	Striped + residues of raw materials	Constantly wet
Wall	12.4	16.5	70	79.5	6.3	5.7	Tiling	Smooth	Dry
Block	12.4	16.5	70	79	6.2	5.3	Wood	Damaged + striped + residues of raw materials	Constantly wet
Cold room	-0.4	-0.1	92	71	6.3	5.7	Tiles	Smooth + residues of raw materials	Wet, condensation
Bowls	12.4	16.5	70	79.5	6	5.3	Plastic	Fatty layer	Dry
Knifes	12.4	16.5	70	79.5	6	5.6	Stainless steel	Smooth	Dry
Dryer wall	11.7	11.8	85	82	6	5.5	Pebble-dash	Granuluous moulds	Wet, condensation
Dryer bars	11.8	11.8	88	82	6.1	5.7	Iron	Rusted + granuluous + moulds	Dry
Mincing machine	13.9	16.5	80	79.5	6.3	5.9	Stainless steel	Smooth + fatty layer	Dry
Mixing machine	6.5	9.5	80	79.5	5.8	6	Stainless steel	Smooth + fatty layer	Dry
Stuffing machine	13.9	16.5	80	79.5	6.3	5.5	Stainless steel	Smooth + fatty layer	Dry
Carcasses	2.3	3.4	60	90.5	6	5.9		Unsoiled	Dry
Fat + lean	2	3.1	77	72	5.7	5.8		Fresh	Wet
Batter	6.5	9.5	87	72	5.8	6		Fresh	Wet
Sausage-1 week	10.3	13	87.5	76.5	6.1	6.2		No moulds	Dry
Sausage-9 weeks	9.5	13.5	86	76.5	6.2	6.5		Moulds	Dry

W: winter (February, March); S: spring (May, June).

4. Discussion

Traditional dry sausage relies on natural contamination originating from raw material and from the processing facility house-flora. This includes useful microorganisms for the fermentation and the flavour of sausage, as well as of spoilage and pathogenic flora. The house-flora is determinate by the environmental characteristics of the processing facility. Among these characteristics, the ambient temperature, the apparent moisture of surfaces and the pH played an important role in the colonization of surfaces by microorganisms.

Most published works that investigate processing equipment flora, focused on the presence of pathogenic flora. In this study, although *Sc. aureus* was practically undetected in processing surfaces and equipments, the final sausage manufactured in winter was contaminated by *Sc. aureus*. The raw materials were the main source of this contamination. This bacterium is endemic in processing and can be widely disseminated in meats (Borch, Nesbakken, & Christensen, 1996). *L. monocytogenes* is ubiquitous and can adhere and forms biofilms on numerous surfaces (Mafu, Roy, Goulet, & Magny, 1990). (Salvat, Toquin, Michel, & Colin, 1995) had reported that more than 68% of environmental samples in a curing plants were positive and 17% remained positive after cleaning. European investigations mentioned between 12% to 16% *Listeria* findings in fermented industrial products (European report, 1999). In this study, the presence of *L. monocytogenes* was only con-

firmed on the stuffing machine, which was in addition contaminated by many other flora. This result was in agreement with those of Chasseignaux (1999) who showed that the presence of *L. monocytogenes* in meat processing facilities was associated with strong contamination by other flora. The presence of a fatty layer in the stuffing machine certainly supported the survival of *L. monocytogenes*. All presumptive *Salmonella* isolates were identified as belonging to mainly *Proteus* and *Morganella* species. *Proteus* species are responsible of uroinfections (Burne & Chen, 2000), while *M. morganii* are known to produce a large quantity of histamine which could cause food intoxications (Tham, Karp, & Danielsson-Tham, 1990).

At the beginning of the process, technological flora contaminated the batter at approximately $2 \log_{10}$ c.f.u./g in winter and between 4 and $5 \log_{10}$ c.f.u./g in spring. Then, LAB and staphylococci/*Kocuria* grew during the process and reached a final level ranging from $6 \log_{10}$ c.f.u./g (winter) to $8 \log_{10}$ c.f.u./g (spring). Their levels in the sausage manufactured in spring were quite similar to those of sausage inoculated with starter cultures (Coppola, Mauriello, Aponte, Moschetti, & Villani, 2000). Nychas and Arkoudelos (1990) showed that levels of staphylococci were similar in traditional and industrial productions.

Low levels of LAB recorded in raw meat were already reported by (Parente, Grieco, & Crudele, 2001) who showed that LAB are usually present in raw meat at maximum 10^2 – 10^3 c.f.u./g. LAB rapidly dominate during the fermentation due to the anaerobic environment and

the presence of NaCl, nitrate and nitrite (Hammes & Knauf, 1994).

In this study, the final pH of the sausage was not acid (pH 6.2–6.5). There was no acidification because no sugar was added to the batter. Many traditional dry sausages are manufactured without addition of starter cultures but often sugar is added. Thus the pH decreases from 5.8 to 5.2 during the fermentation period and stabilized at this level (Comi, Citterio, Manzano, Cantoni, & Bertoldi, 1992; Coppola et al., 2000) or increases up to 5.8 during ripening period (Viallon, 1996). Thus, *Pseudomonas* population disappears after 7 days of ripening and the level of Coliforms decrease (Solignat & Durand, 1999). In more acidified sausages (pH final about 4.5–5.0), Coliforms and *Pseudomonas* populations decline very quickly and are totally inhibited within 7 days (Lücke, 2000). In non acidified sausages, the safety and the shelf life are ensured by drying which decrease the a_w and thus constitute a limiting factor for growth of undesirable microorganisms. In this study, acidification was absent; drying allowed the decline of *Pseudomonas* but Coliforms remained at high level.

5. Conclusion

In conclusion, the decrease of water activity in traditional sausage is a key for ensuring the shelf life and the safety. However, high level of Coliforms can survive. Addition of sugar seems necessary to decrease the pH during the fermentation. It is necessary to improve hygiene in this processing facility by selecting disinfection procedures adapted to fermentation purposes. Moreover, the selection of appropriate starter cultures and barrier flora from the house flora of the small-scale facility would be a way to improve products safety without affecting their typicality.

Acknowledgment

This work is part of a program funded by FNADT. The Chambre d'Agriculture de la Haute-Loire and The CFPPA d'Yssingeaux are acknowledged for their collaboration to this program.

References

AFNOR (1998). La filière des viandes. Organisation de la qualité et maîtrise de la production. Paris: AFNOR.

Borch, E., Nesbakken, T., & Christensen, H. (1996). Hazard identification in swine slaughter with respect to food borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 9–25.

Burne, R. A., & Chen, Y. Y. (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection*, 2, 533–542.

Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, M. C., & Moreno, B. (2001). Comparison of the efficacy of different techniques, culture media, and sources of blood in determining the hemolytic activity of *Listeria* spp.. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 653–661.

Chasseignaux, E. (1999). Ecologie de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers de transformation de viandes de volailles et de porcs. Thèse de Docteur, Université Claude Bernard, Lyon I, France.

Chevallier I. & Leriche F. (1998). Etude technique de l'adaptation de la méthode HACCP aux ateliers de transformation fermière (viande). Synthèse ENITA Clermont-Ferrand/CRA Auvergne.

Chevallier, I., Talon, R., Laguët, A., Labayle, S., & Labadie, J. (2001). Application de la démarche d'écologie microbienne dirigée dans un atelier fermier charcutier (I). Inventaire de la flore de l'atelier et du produit, 213–218.

Clark, A. G., & McLauchlin, J. (1997). Simple color tests based on an alanine peptidase reaction which differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2155–2156.

Comi, G., Citterio, B., Manzano, M., Cantoni, C., & Bertoldi, M. (1992). Bewertung und Charakterisierung der *Micrococccaceae* Stämme in italienischen Rohwürsten. *Fleischwirtsch.*, 12, 1679–1683.

Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G., & Villani, F. (2000). Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a Southern Italian fermented sausage. *Meat Science*, 56, 321–329.

Council of the European Communities (1993). Directive 93/43/CEE, relative to the hygiene of the food products. OJEC L175, 1–11.

European report (1999). Opinion of the scientific committee on the veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*.

Fisher, S., & Palmer, M. (1995). Fermented meat production and consumption in the European Union. In G. Campbell-Platt & P. E. Cook (Eds.), *Fermented Meats* (pp. 217–233). London: Blakie Academic and Professional.

François, M. (1995). Agro-alimentaire Paysan Européen: Un projet de recherche sur les produits transformés à la ferme. In L. Lagrange (Ed.), *Différenciation et qualité des produits alimentaires* (pp. 73–78). Clermont-Ferrand: ENITA.

Gauer, O., Legoff, K., Leriche, F., & Chevallier, I. (1998). *Adaptation de la méthode de maîtrise des risques à l'atelier fermier d'Ally*. France: Etude ENITA Clermont-Ferrand/CRA Auvergne.

Hammes, W. P., & Knauf, H. J. (1994). Starters in the processing of meat products. *Meat Science*, 36, 155–168.

Lagrange, L. & Lelièvre, J. (1995). Propos sur la production fermière ou problématique de la production fermière. In *Différenciation et qualité des produits alimentaires*, Eds ENITA Clermont-Ferrand, Collection Actes (pp. 67–72).

Lücke, F. K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 56, 105–115.

Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., & Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53, 742–746.

Nychas, G. J., & Arkoudelos, J. S. (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *Society of Applied Bacteriology Symposium Series*, 19, 167S–188S.

Parente, E., Grieco, S., & Crudele, M. A. (2001). Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *Journal of Applied Microbiology*, 90, 943–952.

Salvat, G., Toquin, M. T., Michel, Y., & Colin, P. (1995). Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 75–81.

Solignat, G., & Durand, P. (1999). Séchage-maturation. In Tec & Doc (Eds.), *Technologie des produits de charcuterie et des salaisons* (pp. 280–290). Paris: Lavoisier.

Tham, W., Karp, G., & Danielsson-Tham, M. L. (1990). Histamine formation by enterococci in goat cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *11*, 225–230.

Viallon, C. (1996). Incidence des levures sur la flaveur du saucisson sec. Thèse de Docteur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.

II.- Identification des bactéries lactiques

1. Identification phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées d'un atelier fermier de salaison

Ce chapitre a fait l'objet d'un article à « Food Microbiology » : **Ammor, S.**, Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E. & Chevallier, I. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, Sous-presse.

1.1. Objectifs

Dans une perspective d'amélioration de la qualité hygiénique et technologique du saucisson sec produit dans cet atelier, sans altérer sa typicité, il a été prévu de développer des ferments adaptés à partir de la flore isolée de cet atelier. Pour cela la flore d'intérêt technologique devait être identifiée. Notre équipe s'est donc attachée à identifier la flore lactique, alors que l'équipe Microbiologie de la SRV de l'INRA-Theix s'est chargée d'identifier les staphylocoques/*Kocuria*. Les identifications devaient permettre de détecter les espèces dominantes, à partir desquelles un ferment lactique pourrait être sélectionné. Elles devaient aussi permettre d'écarter les bactéries lactiques pathogènes ou non adéquates à la production de saucisson sec.

1.2. Résultats et discussion

Dans un premier lieu, nous avons utilisé une approche phénotypique basée essentiellement sur la clef de Montel et *al.* (1991). Dans un premier temps nous avons obtenus des résultats caractérisés par une dominance de *Lb. sakei* au niveau du produit et de *Carnobacterium* au niveau des surfaces et des équipements. L'identification par les méthodes phénotypiques de *Carnobacterium* s'est avérée erronée par la suite. Cette erreur s'explique par le fait que nous nous sommes limités dans ce premier temps à l'utilisation de la clef de Montel et *al.* (1991). Cette clef ne prend en considération ni *Enterococcus*, ni *Vagococcus*, ni *Lactococcus*. Ainsi l'absence de croissance d'entérocoques et d'autres espèces apparentés aux entérocoques, la positivité du test ADH, la configuration L(+) de l'isomère d'acide lactique, ainsi que la difficulté à interpréter le test *mDAP*, ont conduit à identifier par erreur des

entérocoques et des espèces apparentés aux entérocoques comme des *Carnobacterium*. Cette mauvaise identification a été détectée suite aux analyses par des méthodes moléculaires, principalement des PCR utilisant des oligonucléotides spécifiques au genre *Carnobacterium* (Kabadjova et al., 2002) et aux différentes espèces (Rachman et al., 2004). Ces résultats ont donc à nouveau montré les limites de précision des méthodes phénotypiques, bien qu'elles soient les seules méthodes capables de fournir des informations sur les propriétés métaboliques des microorganismes étudiés. Elles ont aussi montré la limite de la clef de Montel et al. (1991) et nous suggérons de lui apporter certaines modifications tel l'ajout du test de croissance à 45°C et du test de croissance en présence de 6,5% NaCl pendant 48h.

En appliquant ces tests aux différents isolats initialement identifiés comme *Carnobacterium*, les identifications ont été réorientées vers le genre *Enterococcus*, principalement *Ec. faecium* et *Enterococcus seriolicida* (synonyme junior de *Lactococcus garvieae*) (Eldar et al., 1996). La plupart de ces identifications ont été confirmées par la suite aux moyens de PCR *Enterococcus* genre-spécifique et espèces-spécifiques (Dutka-Malen et al., 1995 ; Ke et al., 1999), ainsi que par des PCR *Lc. garvieae* espèces-spécifiques (Zlotkin et al., 1998). Les bactéries ne pouvant être identifiées par ces PCR ont été identifiées en majorité comme *Vc. carniphilus* après séquençage du gène ARNr 16S de l'une d'elle et son partage d'un grand nombre de propriétés phénotypiques avec 10 autres isolats. Aussi, ces 11 isolats donnent des produits PCR de l'ordre de 550/450 pb suite à l'amplification de leur ADN par un couple d'amorces spécifique à *Ec. faecium* (Frahm et al., 1998). Ces produits PCR sont différents de ceux devant d'être obtenus dans le cas d'*Ec. faecium* : 676/578 pb.

Nous avons identifié *Lb. sakei* comme l'espèce dominante dans le produit (1 semaine et 9 semaines), *Lc. garvieae* comme l'espèce dominante dans la mûlée et *Ec. faecium* et *Vc. carniphilus* comme les espèces dominantes au niveau des surfaces et des équipements de l'atelier. La présence de *Lc. garvieae*, pathogène responsable de mammites chez les bovins (Collins et al., 1983), au niveau de la mûlée montre que les matières premières utilisées au niveau de l'atelier sont de faible qualité hygiénique. Ce microorganisme pourrait avoir comme origine le cheptel bovin élevé sur la ferme.

Il est à signaler que la plupart des espèces lactiques identifiées dans cet atelier sont atypiques par rapport aux souches de références utilisées. Cette atypicité des souches est confirmée par les propriétés métaboliques mises en évidence. En effet, aucune souche de *Lb.*

sakei ne présentait de profils de fermentation des sucres similaires à celui de l'espèce de référence.

Notons ici que *Vc. carniphilus* est une espèce qui a été très récemment isolée de la viande hachée et décrite par Shewmaker et *al.* (2004). Mayr et *al.* (2004) l'ont aussi récemment isolé du fromage. La souche que nous avons identifiée par séquençage et qui provient du pousoir, présente des différences par rapport à la souche de référence ATCC BAA-640 décrite par Shewmaker et *al.* (2004). En effet, notre souche est ADH+, tous les tests de croissance à 45°C ont été positifs et elle fermente le mannitol, le sorbitol et le saccharose.

1.3. Conclusion

Actuellement, Bien que les méthodes phénotypiques soient les seules aptes à fournir des informations sur les états métaboliques des bactéries, elles présentent des limites en terme de reproductibilité et de précision. Les résultats précis sont obtenus quand les attributs phénotypiques et génotypiques sont utilisés et permettent de donner l'identification correcte.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre nous a conduit par la suite à caractériser les 36 *Lb. sakei* identifiés comme dominants dans le produit final afin de sélectionner le ferment lactique approprié à cet atelier. De même, les 22 *Ec. faecium* et les 11 *Vc. carniphilus* identifiés comme dominants au niveau des surfaces et des équipements de l'atelier ont été caractérisées dans le but de sélectionner une « flore barrière » pour cette atelier.

Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages

Salim Ammor^a, Cinta Rachman^b, Stéphane Chaillou^c, Hervé Prévost^b, Xavier Dousset^b,
Monique Zagorec^c, Eric Dufour^a, Isabelle Chevallier^{a,*}

^aUnité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires, ENITA-CF, Site de Marmilhat, 63370, Lempdes, France

^bUnité de Recherche Qualité Microbiologique et Aromatique des Aliments, ENITIAA, Rue de la Géraudière, BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France

^cUnité Flore Lactique et Environnement Carné, INRA, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Received 3 August 2004; received in revised form 1 November 2004; accepted 1 November 2004

Abstract

Aims: A survey on lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausage. A first report on LAB in raw material, products and processing equipment.

Methods and Results: A total of 88 isolates were identified phenotypically and genotypically. Phenotypic characterization at the species level indicated that 36 (40.9%) were *Lactobacillus sakei*, 27 (30.68%) were *Enterococcus faecium*, 14 (15.90%) were “*Enterococcus seriolicida*”, 10 (11.36%) were *Enterococcus faecalis* and 1 (1.13%) was *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* 2. In general, genotypic identification correlated well with phenotypic classification since it indicated 36 *Lb. sakei*, 22 *Ec. faecium*, 16 *Lactococcus garvieae* (senior synonym of *Ec. seriolicida*), 11 *Vagococcus carniphilus* and 1 *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Two isolates were assigned as *Enterococcus* spp.

Conclusions: While *Ec. faecium*, *Vc. carniphilus* and *Lc. garvieae* were the predominant species isolated from processing equipment and raw material, *Lb. sakei* species became the predominant species during fermentation of the product.

Significance and Impact of the Study: This study constitutes the first step in the designing process of LAB starter cultures endogenous to the small-scale facility in order to protect the typical organoleptic characteristics of its traditional dry sausage. Otherwise, the presence of undesirable micro-organisms in the processing equipment emphasizes the necessity of improving the general hygienic conditions of sausage production in this facility.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Lactic acid bacteria; Traditional dry sausage; Meat small-scale facility; Phenotypic characterization; Genotypic identification

1. Introduction

Traditional dry sausage fermentation relies on natural contamination by environmental microbiota. This contamination occurs during slaughtering and increases during manufacturing. Fermentation of traditional sausage is usually not controlled. Each small-scale facility has a specific house microbiota composed of useful micro-organisms for the fermentation and flavor of

sausage. This microbiota includes two groups of bacteria: lactic acid bacteria (LAB) and *Staphylococcus* or *Kocuria*.

Several publications reported on identification of LAB from fresh meat and meat products (Hugas et al., 1993; Rovira et al., 1997; Parente et al., 2001). *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum* and *Weissella viridescens* are the most frequently isolated species. *Lactobacillus farciminis* and *Lactobacillus alimentarius* may also be occasionally found. However, in some slightly fermented sausages, *Enterococcus* and *Lactobacillus* populations are balanced (Dellapina et al., 1994).

*Corresponding author. Tel.: +33 4 7398 1393;
fax: +33 4 7398 1390.

E-mail address: chevallier@enitac.fr (I. Chevallier).

Phenotypic identification of LAB is based on physiological, metabolic/biochemical and chemotaxonomic methods (Montel et al., 1991). These methods are sufficient for a rough characterization but not for unequivocal identification purposes.

Several molecular techniques have been applied for LAB identification (Tailliez et al., 2002) which permit accurate and fast identification. Among them, species-specific PCR permitted to discriminate between closely related species (i.e. *Lb. plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum*) that 16S and 23S RNA primers failed to discriminate (Berthier and Ehrlich, 1998).

All published reports dealing with the characterization and identification of LAB isolated from dry sausage considered only the product and did not investigated simultaneously the processing equipment. Therefore, the aim of this study was to describe the inter-species biodiversity and repartition of LAB in a small-scale facility producing traditional dry sausage without addition of starter cultures.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The 88 LAB used for this study were isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausage without addition of starter cultures. These isolates were collected in a previous study (Champomier et al., 1988; Chevallier et al., 2001, according to ISO 7218, 1996). Among these isolates, 22 were isolated from cutting material, 16 from raw material, 12 from the stuffing machine, 19 from the sausage-1 week and 19 from the sausage-9 weeks (final product). They were sub-cultured twice (1% inoculum, 24 h, 30 °C) in 15 ml M.R.S broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and kept frozen at –20 °C in M.R.S supplemented with 10% glycerol.

Fourteen type culture collections strains, prepared as described above, were used as reference strains (Table 1).

2.2. Phenotypic characterization

Each strain was propagated twice in All Purpose Tween (APT) broth (BD, Le Pont de Claix, France) before use, and an overnight culture was used for the tests. All the incubations were performed at 27 °C under anaerobic conditions enriched with 5% CO₂ (Anaerocult C) (Merck, Darmstadt, Germany). All tests, but *meso*-diaminopimelic acid (mDPA) test, were carried out in triplicate.

Isolates were initially Gram-stained and tested for catalase production as described by Norris et al. (1981). Cell morphology was observed using an optical microscope.

Growth at different temperatures was observed on APT agar plates after 3 days of incubation at 15 and 45 °C or after 7 days of incubation at 0 °C.

Table 1
Type culture collection strains used as controls

Species	Collection	Code
<i>Lactobacillus</i>		
<i>plantarum</i>	CIP 103151 ^T	A
<i>Pentosus</i>	NCDO 363 ^T	B
<i>sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	CIP 103139 ^T	C
<i>alimentarius</i>	CIP 102986 ^T	D
<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	CIP 102992 ^T	E
<i>farciminis</i>	CIP 103136 ^T	F
<i>Carnobacterium</i>		
<i>divergens</i>	CIP 101029 ^T	G
<i>maltaromaticum</i>	CIP 103158 ^T	H
<i>Weissella</i>		
<i>viridescens</i>	CIP 103005 ^T	I
<i>halotolerans</i>	DSM 20410 ^T	J
<i>Leuconostoc</i>		
<i>mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	CIP 102305 ^T	K
<i>Enterococcus</i>		
<i>faecium</i>	CIP 103014 ^T	L
<i>Lactococcus</i>		
<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CIP 70.56 ^T	M
<i>Pediococcus</i>		
<i>pentosaceus</i>	DSM 20336 ^T	N

ATCC: American Type Culture Collection, CIP: Collection de l'Institut Pasteur Paris, DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, NCDO: National Collection of Dairy Organisms.

Growth at different pH values was observed after 2 days of incubation at 27 °C on APT agar plates which pH was adjusted to 9 or 4.2.

Growth at different salt concentrations was observed after 2 days of incubation at 27 °C on APT agar plates containing 4, 6.5 or 10% NaCl.

Growth on acetate agar (AA) was observed after 3 days of incubation at 27 °C.

Gas production from glucose was determined in APT broth supplemented with 1% D-glucose (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) and 0.5% sodium acetate (Merck-eurolab, Briave le Canal, France) (ADAC medium) as described by Sperber and Swan (1976).

Citrulline production from arginine (ADI) was determined by the method of Niven et al. (1942). The Niven medium was modified by the addition of Tween 80 (1 ml/l) (Sigma-Aldrich Chemie) and manganese sulfate (50 mg/ml) (Merck-eurolab) since some isolates grew poorly on the basal medium. Each strain was tested at high (2% w/v) and low (0.05% w/v) concentrations of glucose (Montel and Champomier, 1987).

The lactic acid isomers produced by growth on glucose were detected spectrophotometrically (wavelength: 340 nm) in the supernatant fluids of 24 h cultures by an enzymatic method (Gutmann and Wahlefeld, 1974) using D- and L-lactate dehydrogenases (Boehringer, Mannheim, Germany).

mDPA was detected in whole cell hydrolysates by thin layer chromatography (Bousfield et al., 1985). mDPA was well separated from other amino acids due to its

very small retention factor (Rf) value. It also had a characteristic olive green color that turns yellow after several hours in the dark. The *mDPA* standard was purchased from Sigma-Aldrich Chemie.

For the fermentation tests, API 50 CH strips and CHL medium (BioMérieux, Montalieu-Vercieu, France) were used according to the instructions of the manufacturer. The results were recorded after 48 h of incubation.

2.3. Statistical analysis of phenotypic traits

Cluster analysis was applied to data obtained for isolates and reference strains. As data were presented in binary format, the analysis consisted of percent disagreement using a weighted pair-group average as aggregation method. When the increase in dissimilarity was strong, an automatic truncation stopped aggregating observations. The computer software used was XLSTAT (Addinsoft, Paris, France).

2.4. Genotypic identification

DNA extraction: Chromosomal DNA used for PCR amplification was prepared by the method of Anderson and McKay (1983).

Primers: Primers used in this study were obtained from Sigma-Genosys (Cambridge, UK) and are listed in Table 2.

PCR amplification: PCR reactions were performed in PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) in a total volume of 25 µl containing 1X PCR buffer + NH₂SO₄ (MBI Fermentas, Mundolsheim, France), 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂ (MBI Fermentas), 0.2 mmol l⁻¹ of each dNTP (MBI Fermentas), 0.8 µmol l⁻¹ of each primer, 2U of *Taq* DNA polymerase (MBI Fermentas) and 1 µg ml⁻¹ of DNA. The amplification consisted of an initial denaturation step at 94 °C for an appropriate time (Table 3), an appropriate number of cycles (Table 3) with denaturation at 94 °C (Table 3), primer annealing (Table 3) and primer extension at 72 °C (Table 3) followed by final extension at 72 °C and cooling to 4 °C for 7 min. Negative controls without DNA template were included in parallel.

Gel electrophoresis: Four microliter of the PCR products were submitted to electrophoresis at 100 V cm⁻¹ for 1 h on a 1.5% agarose gel (Qbiogene, Illkirch, France) in 0.5X Tris-acetate-EDTA buffer stained with 1.3 mmol l⁻¹ of ethidium bromide (Qbiogene). A 100-bp DNA ladder (JulesTM, Qbiogene) was used as molecular size marker.

16S rDNA cloning and sequencing: Clone libraries of the 16S rDNAs amplified by PCR with primers fD1 and rD1 (Weisburg et al., 1991) of two different isolates were constructed using the pCR[®]2.1 TA Cloning Kit (Invitrogen Life Technology, Cergy Pontoise, France). From each clone library, 10 white colonies were picked randomly. Clones were screened with PCR for the

Table 2
PCR primers used for PCR amplification, sequence, specificity and location

Genus/species	Primer	R/F	Sequence (5'–3')	Specificity	Position	Reference
<i>Lb. sakei</i>	Ls	R	ATGAACTATTAAATTTGGTAC	Species	16S-23S spacer region	Berthier and Ehrlich (1998)
<i>Enterococcus</i> sp.	16S	F	GCTGGATCACCTCTTTC	16S rRNA	3'-end 16S rRNA	Ke et al. (1999)
	Ent1	R	TACTGACAAACCATTCATGATG	Genus	<i>tuf</i> gene	
<i>Ec. gallinarum</i>	Ent2	F	AACTTCGTCAACCAACGGGAC	Genus	<i>tuf</i> gene	Dutka-Malen et al. (1995)
	C1	R	GGTATCAAGGAACCTC	Species	vanC-1	
<i>Ec. casseliflavus</i>	C2	F	CTTCCGCCATCATAGCT	Species	vanC-2, vanC-3	Dutka-Malen et al. (1995)
	D1	R	CTCCTAGGATTCCTTG	Species	vanC-2, vanC-3	
<i>Ec. faecalis</i>	D2	F	CGAGCAAGACCTTTAAG	Species	<i>ddlE. faecalis</i>	Dutka-Malen et al. (1995)
	E1	R	ATCAAGTACAGTATGCTT	Species	<i>ddlE. faecalis</i>	
<i>Ec. faecium</i>	E2	F	ACGATTCAAAGCTAAGCTG	Species	<i>ddlE. faecium</i>	Dutka-Malen et al. (1995)
	F1	R	GCAAGGCTTCTTAGAGA	Species	<i>ddlE. faecium</i>	
<i>Ec. faecium</i>	F2	F	CATCGTGAAGCTAAGCTC	Species	23S rRNA	Frahm et al. (1998)
	Ef	R	CACAAATCGTAAACATCCTA	Species	3'-end 16S rRNA	
<i>Ec. hirae</i>	16S	F	GCTGGATCACCTCTTTC	16S rRNA	<i>ddlE. hirae</i>	Berthier and Ehrlich (1998)
	Hi	R	TTTTGTTAGACCTCTTCCGG	Species	<i>ddlE. hirae/hirans</i>	
<i>Ec. durans</i>	DuHi	F	TTATGTCCCAAGTATTGAAAAATCAA	Ec.durans/Ec. hirae	<i>ddlE. hirae/hirans</i>	Knijff et al. (2001)
	Du	R	TGAATCATATTGGTATGCAGTCCG	Species	<i>ddlE. durans</i>	
<i>Lc. garvitae</i>	DuHi	F	TTATGTCCCAAGTATTGAAAAATCAA	Ec.durans/Ec. hirae	16S rRNA	Zlotkin et al. (1998)
	LG1	R	CATAACAATGAGAAATCGC	Species	16S rRNA	
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	LG2	F	GCACCTCCGGGGTTG	Species	16S rRNA	Moschetti et al. (2000)
	LMM1	R	CCGTTACCCCTAAATTTTGAC	Species	16S rRNA	
	LMM2	F	GACCAAAATACAAATAGGTTGCC	Species	16S rRNA	

Table 3
Optimized PCR protocol for each genus/species tested

	Primers pair	Cycles	Initial denaturation <i>t</i> (min)	Denaturation	Annealing		Extension <i>t</i> (s)	PCR product size (pb)
				<i>t</i> (s)	<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (s)		
<i>Lb. sakei</i>	Ls/16S	20	5	60	45	60	60	190
<i>Enterococcus</i> sp.	Ent1/Ent2	35	3	30	55	30	60	112
<i>Ec. gallinarum</i>	C1/C2	30	2	60	54	60	60	822
<i>Ec. Casseliflavus</i>	D1/D2	30	2	60	54	60	60	439
<i>Ec. faecalis</i>	E1/E2	30	2	60	54	60	60	941
<i>Ec. faecium</i>	F1/F2	30	2	60	54	60	60	550
<i>Ec. faecium</i>	Ef/16S	20	5	60	55	60	60	676/578
<i>Ec. hirae</i>	Hi/DuHi	30	5	45	57	45	45	377
<i>Ec. durans</i>	Du/DuHi	30	5	45	57	45	45	186
<i>Lc. garvieae</i>	LG1/LG2	35	3	60	55	60	90	1100
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	LMM1/LMM2	25	3	60	67	45	60	825

presence of rDNA inserts and for the size of inserts by restriction mapping. For each isolate, one positive clone was sequenced. Double-stranded DNA from the recombinant plasmid of the positive clones from the above screening assays was purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). Nucleotide sequences of the cloned 16S rDNA were determined by the dideoxynucleotide chain termination method (Sanger and Nicklen, 1992) with an ABI 370 automated sequencer using the Taq Dye-Deoxy TM terminator cycle sequencing kit (Perkin–Elmer, Boston Massachusetts, USA). The M13 primers flanking the multiple cloning site of pCR[®]2.1 DNA were used to sequence both DNA strands.

Sequence analysis. Sequences were submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA) for similarity searches against GenBank. 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 similarities.

Nucleotide sequence accession numbers. The 16S rDNA sequences of *Vc. carniphilus* 12 J and *Lc. garvieae* 15 G were deposited in the EMBL, GenBank and DDBJ nucleotide databases under AY669387 and AY 669388 numbers, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Phenotypic characterization

Cluster analysis performed on the phenotypic data for isolates and reference strains allowed to divide them in 4 main groups (1–4). An automatic truncation was done

at 0.235 of percent disagreement showing a strong dissimilarity at this level.

Group 1: rod shaped, homofermentative, and non-growing at 6.5% NaCl. This group comprised type strains of *Lactobacillus* and *Carnobacterium* genera and 36 isolates.

Group 2: rod shaped, heterofermentative, and non-growing at 6.5% NaCl. This group comprised only the 2 type strains of the *Weissella* genus used as control and did not include any isolate.

Group 3: coccoid shaped, heterofermentative, and non-growing at 6.5% NaCl. This group was also characterized by the production of D(–) as lactic acid isomer and the absence of arginine deiminase (ADI) activity. It comprised the type strain *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CIP-102305 and 1 isolate. The position of this isolate on the dendrogram, next to this reference strain supported the assignment of this isolate to *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* species. The carbohydrate fermentation pattern was that of *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* 2.

Group 4: coccoid shaped, homofermentative, and growing at 6.5% NaCl (*Lc. lactis* subsp. *lactis* was not able to grow at 6.5% NaCl). This group was also characterized by the production of L(+) as lactic acid isomer and the presence of ADI activity. This group was the largest one since it comprised the *Ec. faecium*, *Lc. lactis* subsp. *Lactis*, and *Pediococcus pentosaceus* type strains, plus 51 isolates.

As the final goal was to identify isolates at the species level, we performed the same cluster analysis, but by fixing truncation at the observed low percent disagreement allowing discrimination between all reference strains of the group. Cluster analysis were carried out by fixing 0.075 as truncation level for the group 1, in

Table 4
Phenotypic traits of LAB isolates used for the study.

Group	1				3	4						
	1.1	1.2	1.3	1.4		4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7
Sub-group	1.1	1.2	1.3	1.4	1	25	14	5	2	2	2	1
Number of isolates	27	7	1	1	1	25	14	5	2	2	2	1
Shape	R	R	R	R	C	C	C	C	C	C	C	C
<i>m</i> DPA in cell wall	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CO ₂ from glucose	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Lactic acid isomers	DL	DL	DL	DL	D(–)	L(+)	L(+)	L(+)	L(+)	L(+)	L(+)	L(+)
ADH	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
Growth on A.A	+	+	+	+	+	20 ^d	–	–	–	–	–	–
Growth at 0 °C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Growth at 15 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 45 °C	–	–	–	–	–	96	+	+	+	+	+	+
Growth at 4% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 6.5% NaCl	–	–	–	–	–	92	+	+	+	+	+	+
Growth at 10% NaCl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Growth at pH 4.2	+	+	+	+	+	16	–	–	–	–	–	–
Growth at pH 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sugar fermentation:												
L Arabinose	44	+	+	+	–	92	7	–	+	–	–	–
Ribose	+	+	+	+	+	96	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	44	+	+	+	+	–	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	7	–	+	–	–	4	–	+	–	–	–	+
Mannitol	–	–	+	–	–	84	93	+	+	+	+	+
Sorbitol	–	–	+	–	–	–	–	+	+	+	+	–
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygladin	4	+	+	–	–	96	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	26	+	+	+	+	96	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	59	+	+	+	+	96	+	+	+	+	+	+
Maltose	67	29	+	–	+	96	93	+	+	+	+	+
Lactose	26	86	+	–	–	32	7	40	+	+	–	+
Melibiose	+	86	+	+	+	28	7	+	+	+	–	–
Sucrose	+	+	+	+	+	+	7	+	+	+	–	+
Trehalose	+	+	+	+	+	96	+	+	+	+	+	+
Inulin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Melezitose	–	–	–	–	–	–	–	+	–	50	50	+
Raffinose	–	–	–	–	–	–	–	60	–	+	50	–
Gentibiose	37	71	+	–	–	92	+	+	+	+	+	+
Turanose	–	–	–	+	+	–	–	40	–	–	50	–
Gluconate	89	+	+	+	+	16	7	60	+	+	–	+

R—rod, C—cocci; b–, negative result; c+, positive result; 20, 20% of isolates showed a positive result; NAG: *N*-acetyl glucosamine.

a first step, and by fixing 0.132 as truncation level for the group 4, in a second step.

Table 4 shows the sugar fermentation patterns, chemotaxonomic, physiological and biochemical traits of the isolates.

The 36 isolates forming the group 1 were divided into 4 sub-groups based on sugar fermentation patterns (Fig. 1a):

Sub-group 1.1 was the largest with 27 isolates whose chemotaxonomic, biochemical, and physiological traits matched those of *Lb. sakei* species. The position of these

isolates in the dendrogram, next to the reference strain *Lb. sakei* CIP 103139, supported the assignment of those isolates to this species. Moreover, it is interesting to note that 74% of the studied isolates of this sub-group do not ferment lactose, while a positive result for this sugar is important for assignment to *Lb. sakei* species (Dellaglio et al., 1994).

Sub-group 1.2 comprised 7 isolates differing from those of subgroup 1.1 in the ability to ferment amygladin and arbutin, and were also identified as belonging to the *Lb. sakei* species based on data

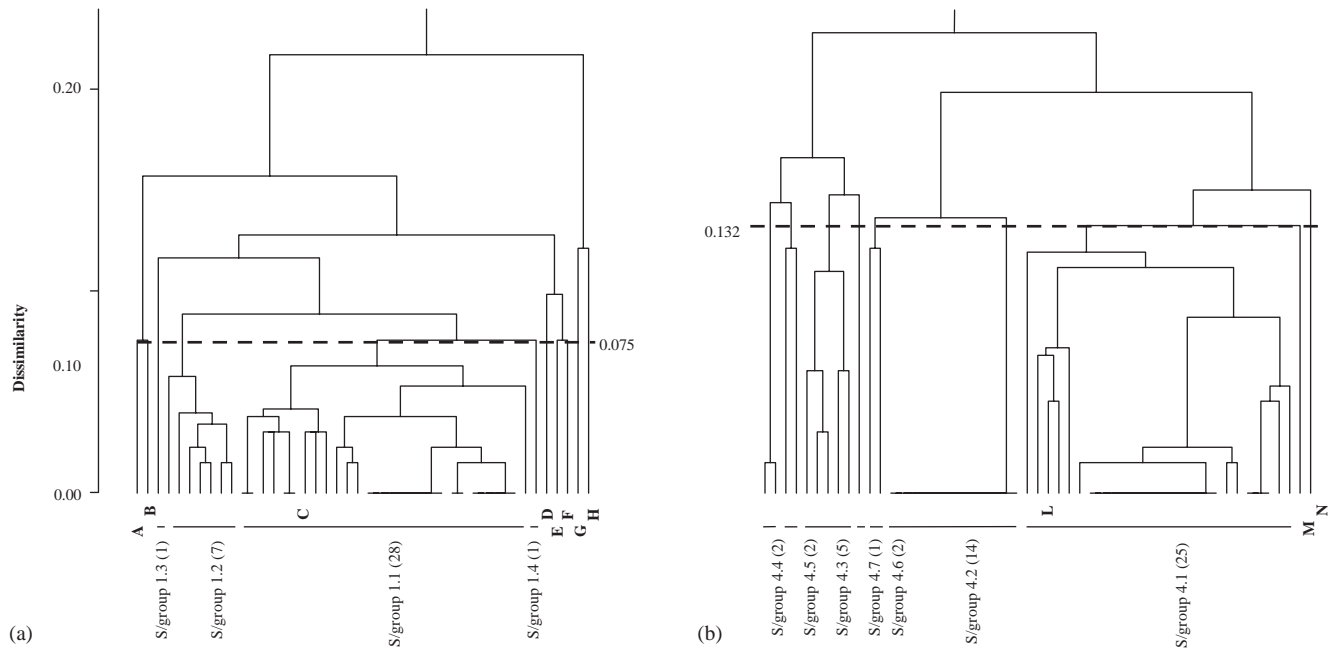


Fig. 1. Clustering structure of LAB isolates and type strains used as control (see Table 1 for type strain coding) of group 1 (1a) and group 4 (1b) when fixing the percent disagreement at the intra-group discrimination level of type strains. Figures in brackets indicate the number of isolates per group.

reported by Dellaglio et al. (1994). The position of these isolates close to each others in the dendrogram supported this assignment.

Sub-groups 1.3 and 1.4 each comprised one isolate that differed from the previous in the ability to ferment rhamnose, mannitol, and sorbitol for the first one, and in the ability to ferment turanose for the second one. Both isolates were identified as belonging to the *Lb. sakei* species based on of data reported by Dellaglio et al. (1994).

The 51 isolates forming the group 4 were divided into 7 sub-groups based on sugar fermentation patterns and physiological traits (Fig. 1b):

Sub-group 4.1, the largest, encompasses 25 isolates whose chemotaxonomic, biochemical and physiological traits matched those of *Ec. faecium* species. The position of these isolates in the dendrogram, next to the reference strain *Ec. faecium* CIP-103014 supported the assignment of those isolates to this species.

Sub-group 4.2 comprised 14 isolates that were characterized by the inability to ferment lactose, melibiose, saccharose, and gentibiose and were identified as *Ec. seriolicida* on the basis of data reported by Dellaglio et al. (1994).

Sub-groups 4.3, 4.5, 4.6, and 4.7 comprised 5, 2, 2, and 1 isolates, respectively, that were characterized by the ability to ferment mannitol and sorbitol, and by the inability to ferment arabinose. All of these isolates were identified as *Ec. faecalis* based on the identification key proposed by Klein (2003).

Sub-group 4.4 comprised 2 isolates that were characterized by the ability to ferment mannitol, sorbitol, and arabinose, and were identified as *Ec. faecium* based on the identification key proposed by Klein (2003).

3.2. Genotypic characterization

In an effort to corroborate the phenotypic classification, we also used genotypic methods mainly based on genus and/or species-specific PCR.

Genomic DNA of the 36 isolates of the group 1 was amplified by the *Lb. sakei* species-specific primers 16S/Ls (Table 2). All isolates hybridized with these pair of primers and the PCR products obtained were approximately 190 bp long (Fig. 2) as it was reported by Berthier and Ehrlich (1998). Thus, these 36 isolates were unambiguously identified as *Lb. sakei*.

Genomic DNA of the group 3 isolate was amplified with *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* species-specific primers LMM1 and LMM2 (Table 2) to confirm its identity. A PCR product was obtained, the size of which (approximately 825 bp) was in agreement with that reported by Moschetti et al. (2000).

Genomic DNA of the 51 isolates of group 4 was amplified by the *Enterococcus* genus-specific primers Ent1 and Ent2 encoding the *tuf* gene, in order to confirm their belonging to this genus. All isolates, but the 14 of sub-group 4.2 and the 2 isolates of sub-group 4.1, hybridized with this primer pair, and the size of the PCR

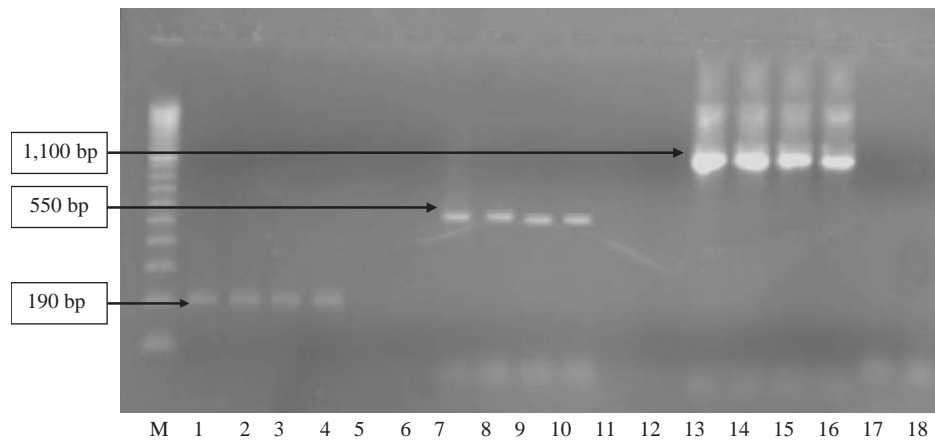


Fig. 2. Species-specific PCR products obtained from LAB isolates (A: Ls/16S, B: F1/F2, C: Lg1/Lg2) (M, 100-bp DNA molecular weight marker; lane 1, *Lb. sakei* CIP 103139; lane 2, E1L-36; lane 3, E1L-20; lane 4, E1L-1; lane 5, *Lb. curvatus* CIP 102992; lane 6, negative control; lane 7, *Ec. faecium* CIP 103014; lane 8, E1L-42; lane 9, E1L-38; lane 10, E1L-40; lane 11, *Ec. faecalis* CIP 103015; lane 12, negative control; lane 13, *Lc. garvieae* CIP 102507; lane 14, E1L-72.; lane 15, E1L-74; lane 16, E1L-79; lane 17, *Lc. lactis* subsp. *lactis* CIP 70.56; lane 18, negative control).

products was close to 112 bp, as reported by Ke et al. (1999).

Genomic DNA of these 35 enterococci isolates was amplified with the *Ec. faecium* species-specific primers F1/F2 (Table 3) coding for the D-alanine:D-alanine ligase gene (Ddl). Of the 23 enterococcal isolates forming the sub-group 4.1 and phenotypically identified as *Ec. faecium*, 22 were PCR positive with this primer pair. The amplified PCR products were approximately 550 bp long (Fig. 2), as reported by Dutka-Malen et al. (1995). These isolates were thus assigned to *Ec. faecium*.

The remaining 13 enterococci isolates (1 of sub-group 2.1 and all isolates constituting sub-groups 4.3–4.7) were tested with *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Ec. faecalis* (Dutka-Malen et al., 1995), *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* (Knijff et al., 2001) species-specific primers (Table 2). No PCR products could be amplified, demonstrating that none of these isolates belong to these *Enterococcus* species. However, 11 isolates (from sub-groups 4.3–4.6) hybridized with *Ec. faecium* species-specific primers (Ef/16S) (Frahm et al., 1998). No PCR product could be amplified from chromosomal DNA of the two remaining isolates (sub-groups 2.1 and 4.7) with this pair of primers.

The 16S rDNA sequencing of one of these 11 isolates was performed. The sequence showed 99% identity with 16S rRNA gene of *Vagococcus carniphilus* ATCC BAA-640 (GenBank accession number AY179329). The same degree of similarity was also observed with 16S rRNA gene of uncultured *Enterococcus* sp. clone ck118, uncultured *Vagococcus* sp. clone ck117 and uncultured *Vagococcus* sp. clone ck 120 (GenBank accession numbers AY080981, AY080979 and AY 080982, respectively). Thus, since these 11 isolates shared the same phenotypic traits, were positioned on the map close to

each other, and allowed the same PCR product amplification with the *Ec. faecium* species-specific primers (Ef/16S), we assigned them to the *Vc. carniphilus* species. The last two isolates were assigned to *Enterococcus* sp., without further species identification.

The 16 isolates that show a negative *Enterococcus* genus-specific PCR, and which were mainly identified as *Ec. seriolicida* were tested with the *Lactococcus garvieae* species-specific primers LG1/LG2 (Table 2) since *Ec. seriolicida* was reported as a junior synonym of *Lc. garvieae* (Eldar et al., 1996). All isolates gave PCR products of approximately 1100 bp (Fig. 2) as reported by Zlotkin et al. (1998). These isolates were thus identified as *Lc. garvieae*.

The 16S rDNA of one of these 16 isolates was sequenced. The sequence obtained was 99% identical to the 16S rRNA gene of *Lc. garvieae* FLG12, FLG5, FLG4, FLG2, and JCM 8735 strains (GenBank accession numbers AF352166, AF352165, AF352164, AF352163 and AB012306, respectively). This sequence also shared 99% identity with the 16S rRNA gene of *Ec. seriolicida* ATCC 49156 (GenBank accession number AF061005) and with *Enterococcus* sp. strain U1-1 and U5-1 (GenBank accession numbers AB079369 and AB079371, respectively). Consequently, with such a high degree of similarity, this isolate was assigned to the *Lc. garvieae* species.

Globally, genotypic identification of the isolates correlated well with obtained phenotypic classification. Discordance of identification between phenotypic and genotypic methods was observed for 15 isolates classified phenotypically as 5 *Ec. faecium* and 10 *Ec. faecalis*. Indeed, these isolates were genotypically identified as 2 *Lc. garvieae*, 11 *Vc. carniphilus* and 2 *Enterococcus* sp.

Although distinct, the genus *Vagococcus* had a close phylogenetic relationship with the *Enterococcus* and

Lactococcus genera and some species are difficult to differentiate solely on the basis of phenotypic characteristics (Teixeira et al., 1997). These difficulties are elucidated with genotypic methods. Indeed, the sequence of the studied isolate showed 99% of identity with the 16S rRNA gene of uncultured *Enterococcus* sp. clone ck118. In this study, it is also shown that *Vagococcus* species hybridize to the *Enterococcus* genus-specific primers (Ent1/Ent2). Similar results were reported for some *Vagococcus* with other *Enterococcus* primers or probes (Facklam and Elliott, 1995; Teixeira et al., 1997).

Moreover, it is interesting to note that most isolates might be considered ‘atypical’ since physiological traits and carbohydrates fermentation patterns were slightly different compared to those of the reference strains. The ‘atypical’ behavior of some LAB isolated from fermented foods has been already observed by many authors (Dykes et al., 1994; Sanchez et al., 2000). The ‘atypical’ behavior of *Lb. sakei* regarding reference strains could be explained by the great genomic variability among *Lb. sakei* strains (Klein et al., 1996). The ‘atypical’ behavior of enterococci has also been reported and is mainly related to antibiotics resistance. Indeed, some strains of *Ec. faecium* and *Ec. faecalis* may acquire a *vanB* phenotype—an inducible, variable level of resistance to vancomycin— or a *vanA* phenotype, which confers resistance to high levels of both vancomycin and teicoplanin (Goh et al., 2000). In addition it should be mentioned that determination of carbohydrate fermentations is not very convenient and may be misleading (Champomier et al., 1988). This can explain the discordance between phenotypic and genotypic identification for 15 isolates.

3.3. LAB species distribution regarding their isolation site

Fig. 3 resumes LAB distribution regarding their isolation site and thus the manufacturing step. A species-dominance is observed at each site of isolation closely to the environment parameters. Indeed, raw materials are dominated by *Lc. garvieae* species, while the cutting materials are dominated by *Ec. faecium* species. The stuffing machine is dominated by *Vc. carniphilus* species, while *Lb. sakei* is the predominant species in sausage, after one week and in the final product (sausage-9 weeks).

The inter-species diversity of cultivable LAB in the small-scale facility is relatively small since we identified only 5 main different LAB species (*Lb. sakei*, *Ec. faecium*, *Lc. garvieae*, *Vc. carniphilus*, and *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*). Surprisingly, no *Lb. curvatus* or *Lb. plantarum* species were isolated despite their frequent isolation from fermented meats (Hugas et al., 1993; Rovira et al., 1997; Parente et al., 2001).

Ec. faecium species were already reported as frequently isolated from traditional fermented sausage (Herranz et al., 2001; Papamanoli et al., 2003) and their role as protective cultures and/or probiotics in fermented foods were suggested (Foulquie Moreno et al., 2003; Leroy et al., 2003).

Lc. garvieae is an emerging zoonotic pathogen which is responsible for mastitis in cows and buffalos (Collins et al., 1983; Teixeira et al., 1996). This species may have as origin a few cows reared in the farm, subject of the present study. Its presence in raw material demonstrates the low hygienic conditions of sausage production in the studied facility. Fortunately, this bacterium was not detected in the final product microbiota.

Vc. carniphilus is a new species that has been isolated recently from ground beef (Shewmaker et al., 2004) and from red smear soft cheeses (Mayr et al., 2004). The clinical significance of this species is not yet determined. On the contrary to the described type strain ATCC BAA-640 (Shewmaker et al., 2004), in our isolates, arginine deiminase is produced, growth at 45 °C is not variable, and acid is produced from mannitol, sorbitol, and sucrose.

While *Ec. faecium*, *Vc. carniphilus* and *Lc. garvieae* species were the predominant LAB species isolated from the processing equipment and the raw material, *Lb. sakei* became the predominant species during the fermentation. After 7 days of fermentation, the raw material microbiota dramatically changed from 87.5% *Lc. garvieae*, 6.25% *Ec. faecium*, and 6.25% *Ln. mesenteroides* to 84.21% *Lb. sakei*, 10.53% *Ec. faecium*, and 5.26% *Enterococcus* sp.. Eight weeks after, *Lb. sakei* species was completely dominant in the final product. These results agree with those of Hugas et al. (1993), Santos et al. (1998), and Parente et al. (2001) who reported that *Lb. sakei* appeared to dominate the lactic microbiota of traditional products in Southern Europe. *Lb. sakei* species dominance in the fermented product could be explained by a better adaptation to the temperature and the NaCl concentration used in dry sausage manufacturing. Furthermore, Doßmann et al. (1996) reported that under conditions prevailing in fermented sausages, *Lb. sakei* proved to be more competitive since it exhibited a shorter lag phase, higher maximal growth rate and higher final cell yield than *Lactobacillus pentosus*. *Lb. sakei* dominance might be also explained by the fact that some strains of this species produce antibacterial compounds like bacteriocins, that were active against others lactobacilli (Sobrinho et al., 1991).

4. Conclusion

From the results presented in this study, we concluded that the small-scale facility LAB ecosystem is character-

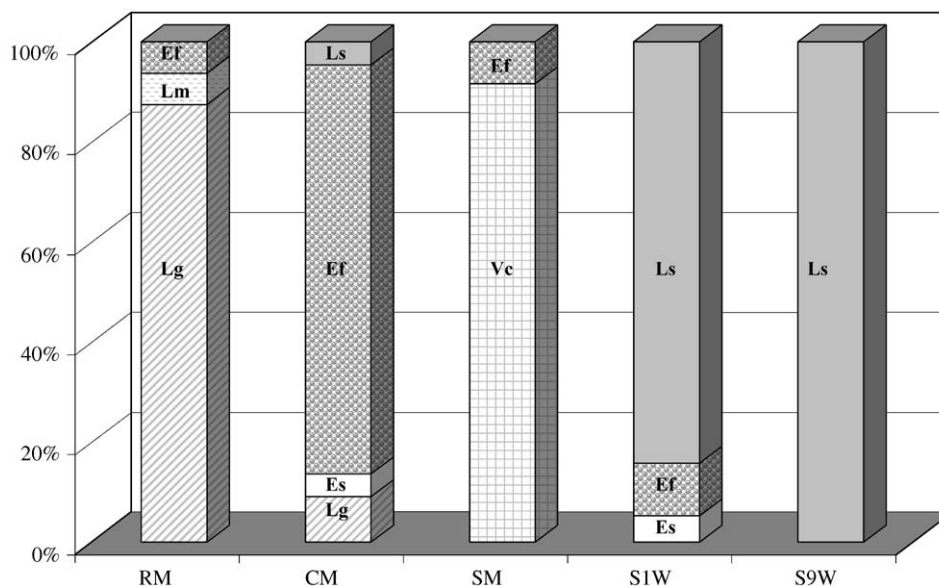


Fig. 3. Repartition of LAB species closely to each control point. (RM: Raw materials, CM: Cutting materials, SM: Stuffing machine, S1W: Sausage-1 week, S9W: Sausage-9 weeks) (Ef: *Ec. faecium*, Es: *Enterococcus* spp., Ls: *Lb. sakei*, Lg: *Lc. garvieae*, Lm: *Ln. mesenteroides*, Vc: *Vc. carniphilus*).

ized by a species-site-dominance. This dominance is closely related to the environmental parameters (Aerobiosis or microaerophily, presence or absence of salt, a_w , etc.). This dominance in raw material and processing equipment decreased with the setting-up of fermentation process and *Lb. sakei* species became the predominant species in the fermented product.

This study constitutes the first stage in the designing process of LAB starter cultures endogenous to small-scale facilities in order to protect the typical organoleptic characteristics of traditional dry sausage production. The next step will consider the characterization and selection of desirable LAB based on criteria researched in the dry sausage manufacturing.

In addition, the presence of undesirable microorganisms in the processing equipment such as *Lc. garvieae* emphasizes the necessity of improving the general hygienic conditions of sausage production in small-scale facilities.

Acknowledgements

We thank Dr. Françoise LERICHE and Dr. Régine TALON for valuable discussions.

References

Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389–3402.

Anderson, D.G., McKay, L.L., 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 549–552.

Berthier, F., Ehrlich, S.D., 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 97–106.

Bousfield, I.J., Keddie, R.M., Dando, T.R., Shaw, S., 1985. Simple rapid methods of cell wall analysis as an aid in the identification of aerobic coryneform bacteria. In: Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (Eds.), *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press, London, pp. 222–234.

Champomier, M.C., Montel, M.C., Grimont, F., Grimont, P.A.D., 1988. Genomic identification of meat lactobacilli as *Lactobacillus sake*. *Ann. Institut. Pasteur/Microbiol.* 138, 751–758.

Chevallier, I., Talon, R., Laguet, A., Labayle, S., Labadie, J., 2001. Application de la démarche d'écologie microbienne dirigée dans un atelier fermier charcutier (I): Inventaire de la flore de l'atelier et du produit. In: Tec, T., Doc, D. (Eds.), *Proceeding of the 13th Agoral Meeting*. Lavoisier, Paris, pp. 213–218.

Collins, M.D., Farrow, J.A., Phillips, B.A., Kandler, O., 1983. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. Nov. *J. Gen. Microbiol.* 129 (Pt 11), 3427–3431.

Dellaglio, H., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., Janssens, D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: de Roissart, H., Luquet, F.M. (Eds.), *Les bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques*. Loriga, Uriage, pp. 25–116.

Dellapina, G., Blanco, D., Pancini, E., Barbuti, S., Campanini, M., 1994. Microbiological evolution in Italian Felino, Milan and Hungarian-style salami. *Ind. Conserv.* 69, 85–90.

Doßmann, M.U., Vogel, R.F., Hammes, W.P., 1996. Mathematical description of the growth of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus pentosus* under conditions prevailing in fermented sausages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 334–339.

Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P., 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 24–27.

- Dykes, G.A., Britz, T.J., von Holy, A., 1994. Numerical taxonomy and identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged vienna sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 246–252.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Goria, M., Prearo, M., Bercovier, H., 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.* 32, 85–88.
- Facklam, R., Elliott, J.A., 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 479–495.
- Foulquie Moreno, M.R., Rea, M.C., Cogan, T.M., de Vuyst, L., 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 73–84.
- Frahm, E., Heiber, I., Hoffmann, S., Koob, C., Meier, H., Ludwig, W., Amann, R., Schleifer, K.H., Obst, U., 1998. Application of 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 450–453.
- Goh, S.H., Facklam, R.R., Chang, M., Hill, J.E., Tyrrell, G.J., Burns, E.C., Chan, D., He, C., Rahim, T., Shaw, C., Hemmingsen, S.M., 2000. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3953–3959.
- Gutmann, I., Wahlefeld, A.W., 1974. L(+) lactate: determination with lactic dehydrogenase and NAD. In: Bergemeyer, H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, pp. 1452–1456.
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martinez, J.M., Rodriguez, J.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Cintas, L.M., 2001. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.* 18, 115–131.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T., Monfort, J.M., 1993. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 18, 107–113.
- ISO 7218, 1996. General rules for microbiological examinations. In: AFNOR (Ed.), *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs*. Geneva, ISO, pp. 1–47.
- Ke, D., Picard, F.J., Martineau, F., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3497–3503.
- Klein, G., 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 123–131.
- Klein, G., Dicks, L.M.T., Pack, A., Hack, B., Zimmermann, K., Dellaglio, F., Reuter, G., 1996. Amended descriptions of *Lactobacillus sake* (Katagiri, Kitahara, and Fukami) and *Lactobacillus curvatus* (Abo-Elnaga and Kandler): numerical classification revealed by protein fingerprinting and identification based on biochemical patterns and DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 367–376.
- Knijff, E., Dellaglio, F., Lombardi, A., Andrighetto, C., Torriani, S., 2001. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *J. Microbiol. Methods* 47, 35–40.
- Leroy, F., Foulquie Moreno, M.R., de Vuyst, L., 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 235–240.
- Mayr, R., Fricker, M., Maoz, A., Scherer, S., 2004. Anti-listerial activity and biodiversity of cheese surface cultures: influence of the ripening temperature regime *Europ. Food Res. Technol.* 218, 242–247.
- Montel, M.C., Champomier, M.C., 1987. Arginine catabolism in *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2683–2685.
- Montel, M.C., Talon, R., Fournaud, J., Champomier, M.C., 1991. A simplified Key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 469–472.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F., Coppola, S., 2000. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* with DNA primers identified by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 422–424.
- Niven Jr., C.F., Smiley, K.L., Sherman, J.M., 1942. The hydrolysis of arginine by streptococci. *J. Bacteriol.* 43, 651–660.
- Norris, J.R., Berkeley, R.C.W., Logan, N.A., O'Donnell, A.G., 1981. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (Eds.), *The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer, Berlin, pp. 1711–1742.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65, 859–867.
- Parente, E., Grieco, S., Crudele, M.A., 2001. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *J. Appl. Microbiol.* 90, 943–952.
- Rovira, A., Nieto, J.C., Rodriguez, A., Reguera, J.I., Gonzalez, Z., 1997. Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. *Microbiologia* 13, 201–208.
- Sanchez, I., Palop, L., Ballesteros, C., 2000. Biochemical Characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 9–17.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24, 104–108.
- Santos, E.M., Gonzalez-Fernandez, C., Jaime, I., Rovira, J., 1998. Comparative study of lactic acid bacteria house microbiota isolated in different varieties of 'Chorizo'. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 123–128.
- Shewmaker, P.L., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Carvalho, M.S., Elliott, J.A., Joyce, K., Barrett, T.J., Teixeira, L.M., Facklam, R.R., 2004. *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1505–1510.
- Sobrinho, O.J., Rodriguez, J.M., Moreira, W.L., Fernandez, M.F., Sanz, B., Hernandez, P.E., 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 1–10.
- Sperber, W.H., Swan, J., 1976. Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 990–991.
- Tailliez, P., Beaud, D., Ogier, J.C., 2002. Le point sur les outils moléculaires de classification et d'écologie microbienne. *Sci. Alim.* 22, 5–21.
- Teixeira, L.M., Merquior, V.L., Vianni, M.C., Carvalho, M.G., Fracalanza, S.E., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Facklam, R.R., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 664–668.
- 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.
- 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 Res.* 22, 4673–4680.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., Bercovier, H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36, 983–985.

2. Identification par spectroscopie de fluorescence des bactéries lactiques isolées d'un atelier fermier de salaison

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication au « Journal of Microbiological Methods » : **Ammor, S., Yaakoubi, K., Chevallier, I. & Dufour, E., 2004.** Identification by fluorescence spectroscopy of lactic acid bacteria isolated from small-scale facility producing dry sausages. *Journal of Microbiological Methods* 59(2), 271-278.

1.1. Objectifs

Les méthodes phénotypiques utilisées dans le domaine de l'identification des bactéries présentent des limites en terme de reproductibilité et de précision et sont très consommatrices en temps. Apparues récemment, les méthodes moléculaires sont plus précises et sont rapides à réaliser ; néanmoins elles nécessitent des réactifs et du matériel coûteux. En se basant sur ce constat, nous nous sommes attachés à développer une méthode d'identification des bactéries lactiques, rapide, précise et peu coûteuse. Nous avons testé l'aptitude d'une méthode développée au niveau de notre équipe de recherche, en l'occurrence la spectroscopie de fluorescence, pour identifier les bactéries lactiques d'origine carnée. Cette méthode a été développée par Leblanc & Dufour (2002) pour identifier des bactéries de différentes classes, genres et espèces provenant de collections de référence.

1.2. Résultats et discussion

Dans un premier lieu, nous avons cherché à définir les conditions expérimentales optimales pour les bactéries lactiques. Des tests de croissance ont été effectués dans les milieux BHI, BHI + 1,8% glucose, MRS et APT. Le but était de sélectionner un milieu dans lequel les 14 espèces de référence utilisées atteindraient la croissance voulue (mesurée par la densité optique) dans un intervalle de temps limité. Il a été constaté que *Lb. farciminis*, *Lb. alimentarius* et *W. halotolerans* présentaient des retards de croissance dans BHI et BHI + 1,8% glucose. Il en était de même pour les *Carnobacterium* dans le milieu MRS. C'est pourquoi le milieu APT a été retenu pour l'étude. Par ailleurs, la phase de croissance a été aussi étudiée. Il a été montré que les concentrations des marqueurs métaboliques (NADH et FAD) étaient maximales en phase exponentielle, alors que celle des acides aminés aromatiques + acides nucléiques (AAA+AN) n'était pas dépendante de la phase de croissance. La phase exponentielle a donc été retenue.

Par la suite, nous nous sommes attachés à développer le modèle de prédiction en se basant sur 14 espèces lactiques de référence. Nous avons testé les 3 types de sondes fluorescentes cités précédemment (AAA+AN, NADH et FAD). Les résultats des Analyses Factorielles Discriminantes (AFD) réalisées sur les collections spectrales indiquaient des pourcentages de bonne classification à l'échelle du genre de respectivement 98,3%, 97,8% et 95,6% pour les sondes AAA+AN, NADH et FAD. Il est à noter que la carte factorielle obtenue suite à l'AFD réalisée sur la collection spectrale de la sonde NADH montrait une nette discrimination du genre *Leuconostoc* par rapport aux autres genres. Cette discrimination pourrait être reliée au métabolisme des bactéries hétérofermentaires. En effet, ces dernières ont l'aptitude d'utiliser les accepteurs d'électrons externes pour générer le NADH et donc produire plus d'énergie (Axelsson, 1998).

A l'échelle de l'espèce, nous avons obtenu des pourcentages de bonne classification de respectivement 100%, 88,9% et 88,9% pour les spectres AAA+AN, NADH et FAD. Enfin, à l'échelle du genre-espèce, les analyses ont donné des pourcentages de bonne classification de respectivement 100%, 88,9% et 97,8% à partir des spectres AAA+AN, NADH et FAD.

A la vue de ces résultats, nous avons adopté la sonde AAA+AN pour tenter d'identifier les espèces isolées au niveau de l'atelier fermier. Parmi les 88 souches identifiées par approches phénotypique et génotypique, 33% des isolats identifiés pour chaque espèce a été retenu. Ainsi, 12 *Lb. sakei*, 7 *Ec. faecium*, 5 *Lc. garvieae*, 4 *Vc. carniphilus* et 1 *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 2 ont été utilisés pour cette étude.

Parmi les 29 espèces considérées, 28 ont été correctement identifiées. Seule *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 2 n'a pas été correctement classée. Cette erreur peut s'expliquer par le choix de la souche de référence. En effet, la souche de référence utilisée était *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Ce résultat suggérait l'aptitude de la méthode à discriminer au niveau de la sous-espèce. Nous avons donc testé le potentiel de discrimination à l'échelle de la sous-espèce. Les résultats ont montré une discrimination de 100% pour 12 espèces de *Lb. sakei* divisées en 2 sous espèces : subsp. *sakei* et subsp. *carnosus*.

1.3. Conclusion

L'ensemble de ces résultats indique que la fluorescence intrinsèque d'une bactérie constitue une empreinte digitale qui permet de l'identifier à l'échelle du genre, de l'espèce et même de la sous-espèce. Cette méthode pourrait être d'un grand intérêt pour l'identification

des bactéries lactiques isolées des ateliers fermiers sélectionnés dans le cadre du projet européen « Tradisausage ». En effet, identifier les bactéries lactiques isolées d'une cinquantaine d'ateliers par approche phénotypique ou génotypique devrait nécessiter beaucoup de temps et de réactifs ; ce qui n'est pas le cas pour la spectroscopie de fluorescence.



Identification by fluorescence spectroscopy of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages

Salim Ammor, Kaoutar Yaakoubi, Isabelle Chevallier*, Eric Dufour

Unité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires, ENITA-CF, Site de Marmilhat, 63370, Lempdes, France

Received 5 July 2004; received in revised form 23 July 2004; accepted 23 July 2004

Abstract

Three different fluorescence spectra were recorded following excitation at 250 nm (aromatic amino acids+nucleic acids, AAA+NA), 316 nm (NADH) and 380 nm (FAD) for 20 type strain collections of lactic acid bacteria (LAB). Evaluation of the data using principal component analysis and factorial discriminant analysis showed a good discrimination of considered LAB at the genus, species and genus-species level. AAA+NA fluorophores showed the highest percentage of good classification. From AAA+NA spectra recorded on LAB isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages, we succeeded to identify 28 of 29 wild strains. This method allowed us to discriminate between *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus* and *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*. Thus, intrinsic fluorescence is an economical and powerful tool for the identification of wild LAB isolated from meat and meat products.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Lactic acid bacteria; Traditional dry sausages; Meat small-scale facilities; Identification; Fluorescence spectroscopy; Chemiometry

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) play an essential role in the production of fermented sausages. The LAB, which are usually present in low numbers (10^2 – 10^3 cfu g⁻¹) in raw meat (Parente et al., 2001), rapidly dominate during the fermentation due to the anaerobic

environment and the presence of NaCl, nitrate and nitrite. In addition, LAB are able to reduce pH by production of lactic acid from carbohydrates, to produce bacteriocins, catalase and nitrate-reductase activity, and to contribute to lipolysis and proteolysis (Hammes and Knauf, 1994).

The identification of LAB from meat by conventional phenotypic procedures based on morphology and on biochemical tests (Montel et al., 1991) is tedious, time consuming, involves a large number of reagents and is not accurate. Molecular methods based on PCR and others techniques (Tailliez et al., 2002)

* Corresponding author. Tel.: +33-4-7398-1393; fax: +33-4-7398-1390.

E-mail address: chevallier@enitac.fr (I. Chevallier).

are much more accurate and fast, but are expensive to perform. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy has also been presented as an alternative to the above-mentioned methods (Amiel et al., 2000).

Fluorescence methods have been shown to provide the most sensitive detection of biomolecules. The high sensitivity, short-collection-time requirement, in-situ measurement capability with no sample contact, and the capability of monitoring large areas/volumes continuously render fluorescence methods attractive for the investigation of bacterial cells (Estes et al., 2003).

Live bacteria contain a variety of intracellular biomolecules associated with energy yielding reactions. Some of these biomolecules have specific excitation and emission wavelength spectra that characterize their intrinsic fluorescence. The fluorescent characters of many such molecules have been studied and they offer a number of expedient options for biological detection. Bacteria retain numerous intrinsic fluorophores such as protein tryptophans, other amino acids, nucleic acids and co-enzymes emitting photons following excitation in the ultraviolet region (Cantor and Schimmel, 1980). The ideal target biomolecules should have an intrinsic fluorescence spectrum that distinguish them from other materials and have sufficient fluorescence intensity to produce strong signal (Hariston et al., 1997). In general, shorter excitation wavelengths have higher energy and thus are likely to produce fluorescence in more types of material.

Our research team has developed a fluorescence method to monitor the identity and the growth of bacteria using their intrinsic fluorescence (Leblanc and Dufour, 2002; 2004). Therefore, in this paper, we describe the use of fluorescence spectroscopy to discriminate and identify some meat LAB at the genus, species and subspecies levels. These LAB are wild strains isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages without addition of starter cultures.

2. Materials and methods

2.1. Strains and growth conditions

Type strain came from international collections: ATCC, CIP, DSM or NCDO. Nine species of

Lactobacillus, two of *Carnobacterium*, two of *Weissella*, two of *Enterococcus*, two of *Lactococcus*, one of *Leuconostoc* and one of *Pediococcus* were considered. In addition, a strain of *Vagococcus carniphilus* coming from our collection (ENITA) was also considered. All of them were considered since they are frequently isolated from meat and meat products (Table 1) (Montel et al., 1991; Ammor et al., submitted for publication).

Twenty-nine wild strains, i.e., 12 *Lactobacillus sakei*, 7 *Enterococcus faecium*, 5 *Lactococcus garvieae*, 4 *Vc. carniphilus* and 1 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 2 were also considered

Table 1
Inventory of the type culture collection used

Indicator species	Collection ID	Coding
<i>Lactobacillus</i>		
<i>sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	CIP 103139	Lbs
<i>sakei</i> subsp. <i>sakei</i> (ex. <i>Lb. bavaricus</i>)	NCDO 2588	Lbb
<i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	CIP 102992	Lbc
<i>plantarum</i>	CIP 103151	Lbpl
<i>pentosus</i>	NCDO 363	Lbpe
<i>farciminis</i>	CIP 103136	Lbf
<i>alimentarius</i>	CIP 102986	Lba1
<i>alimentarius</i>	DSM 20181	Lba2
<i>casei</i> subsp. <i>casei</i>	ATCC 11978	Lbcc
<i>Carnobacterium</i>		
<i>divergens</i>	CIP 101029	Cbd
<i>maltaromaticum</i> (ex. <i>piscicola</i>)	CIP 103158	Cbm
<i>Weissella</i>		
<i>viridescens</i>	DSM 20410	Wv
<i>halotolerans</i>	CIP 103005	Wh
<i>Leuconostoc</i>		
<i>mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	CIP 102305	Lm
<i>Pediococcus</i>		
<i>pentosaceus</i>	DSM 20336	Pcp
<i>Enterococcus</i>		
<i>faecium</i>	CIP 103014	Ecf
<i>faecalis</i>	CIP 103015	Ecf
<i>Lactococcus</i>		
<i>lactis</i> susp. <i>lactis</i>	CIP 70.56	Lcl
<i>garvieae</i>	CIP 102507	Lcg
<i>Vagococcus</i>		
<i>carniphilus</i>	ENITA EIL-64	Vcc

ATCC: American Type Culture Collection, CIP: Collection de l'Institut Pasteur Paris. DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, NCDO: National Collection of Dairy Organisms, ENITA: Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Clermont-Ferrand.

for the study. These strains were isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages without use of starter cultures (Chevallier et al., 2001) and were identified by genotypic methods in a previous study (Ammor et al., submitted for publication).

All these bacteria were subcultured twice (1% inoculum, 24 h, 30 °C) in 15 ml MRS broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and kept frozen at –20 °C in MRS broth (Biokar Diagnostics) supplemented with 10% glycerol prior for use.

2.2. Sample preparation

Each bacterium was propagated in APT broth (BD, Le Pont de Claix, France) for an overnight and 1 ml of each culture was used to inoculate 10 ml of APT broth. The optical density (OD) of each culture was overseen at 600 nm with a Cary 100 Bio UV–Visible spectrophotometer (Varian, Australia). When matching $OD_{600\text{ nm}}=0.5\pm 0.02$, a defined volume was used to inoculate 10 ml of APT broth to obtain an $OD_{600\text{ nm}}=0.05$. Incubation was run until the $OD_{600\text{ nm}}$ matched 0.05 ± 0.02 and 1 ml of the culture was centrifuged at 3800 rpm for 5 min. Cells were then washed twice with 1 ml of saline solution (NaCl , 9 g l^{-1}) at 3800 rpm for 5 min. The pellet was re-suspended in a defined volume of saline solution in order to obtain an $OD_{600\text{ nm}}=0.05$. All incubations were carried out at 30 °C and three different batches were considered for each bacterium.

2.3. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectra of bacteria samples were obtained using a FluoroMax-2 spectrofluorimeter (Spex-Jobin Yvon, NJ, USA) provided with a right angle cell holder. Bacteria samples (3 ml) were placed in a quartz cuvette. Fluorescence emission spectra (280–480 nm, resolution: 1 nm, slits: 6 nm) were recorded with excitation wavelength set at 250 nm. In this condition, a large number of fluorophores may be excited. These settings mainly corresponded to the fluorescence properties of aromatic amino acids in proteins and nucleotides constituting nucleic acids (Cantor and Schimmel, 1980). Two other intrinsic fluorophores, NADH and FAD, were also considered. The fluorescence emission spectra of NADH (380–550 nm, resolution: 1 nm, slits: 6 nm) and of FAD

(420–550 nm, resolution: 1 nm, slits: 6 nm) were recorded with excitation set at 316 and 380 nm, respectively.

2.4. Mathematical treatment of data

Mathematical treatment of spectral data was performed by the XLStat pro 7.0 software (Addinsoft, Paris, France). A normalized (Pearson) principal component analysis (PCA) was applied in order to investigate changes in the data (Herbert, 1999). This statistical multivariate treatment makes it possible to draw score plots of samples and to get spectral patterns (Bertrand and Scotter, 1992; Jolliffe, 1986). While the score plots allow the comparison of the spectra in such a way that two neighboring points represent two similar spectra, the spectral patterns exhibit the absorption bands that explain the similarities observed on the maps.

Factorial discriminant analysis (FDA) was performed on the linearly independent factors resulting from the PCA applied on the fluorescence spectral data. The aim of this technique is to predict the membership of an individual to a qualitative group defined as a preliminary (Safar et al., 1994). The method cannot be applied in a straightforward way to continuous spectra because of the high correlations occurring between the wavelengths. Advantages were found in the preliminary transformation of the data into their factors obtained from the PCA.

3. Results and discussion

3.1. Standardization of experimental conditions

In order to standardize experimental conditions we tested type culture strains for growth in different broths, i.e., APT, BHI, BHI+glucose (1.8%) and MRS. Following $OD_{600\text{ nm}}$ of cultures in the different media, it was concluded that APT broth would be the most appropriate medium for type strains considered as regards the time displayed by cells to reach the given $OD_{600\text{ nm}}$ required (data not shown).

The influence of the growth phase on the fluorescence intensity was tested. It was found that coenzyme fluorophores (NADH, FAD) were near maximum expression in the log-phase. The other

markers were unaffected until cell death (data not shown). Similar results were observed by Estes et al. (2003). In addition, Choo-Smith et al. (2001) observed by using vibrational spectroscopy (FT-IR and Raman microspectroscopy) that 6-h cultures presented little spectral changes, whereas 12- and 24-h cultures exhibited significant differences.

3.2. Model construction

3.2.1. Intrinsic fluorescence spectra of LAB

Amino acids are the basic structural units of proteins, which play crucial roles in virtually all of the biological processes (Stryer, 1988). Amino acids with aromatic side chains are fluorescent. At excitation wavelengths close to 295 nm only tryptophan is fluorescent (Lakowicz, 1983). From 280 to 295 nm excitation wavelengths, both tyrosine and tryptophan are fluorescent. Below 280 nm, all three amino acids can be excited, albeit the quantum yield of phenylalanine is relatively low compared with those of tryptophan and tyrosine (Lakowicz, 1983).

The nucleotides constituting nucleic acids are also fluorophores despite that their quantum yields are about 100-times lower than the quantum yields of tryptophans (Cantor and Schimmel, 1980).

Therefore, AAA+NA emission spectra were collected between 280 and 480 nm (exc.: 250 nm) for type culture collections. Fig. 1 presents the spectra recorded for *Lb. sakei* CIP 103139 (Lbs), *Pc.*

pentosaceus DSM 20336 (Pcp) and *Vc. carniphilus* EIL-64 (Vcc). They were characterized by a maximum located at 336 nm and shoulder at about 436 nm. Similar results have been reported by Leblanc and Dufour (2002; 2004).

NADH and FAD are metabolic coenzymes. These fluorescent molecules are the reduced form of pyridine nucleotide (PN) and the oxidized form of flavoprotein (Fp), which are the electron carriers assuming a continual input of free energy through cellular metabolism. Kell et al. (1991) provide evidence that intrinsic fluorescence is related to cellular metabolic state. Thus, these fluorophores were also tested. Maxima of NADH and FAD spectra were located at 413 and 436 nm, respectively, and shifted slightly to lower or higher wavelengths, depending on bacteria (data not shown). Similar results were reported for NADH by Leblanc and Dufour (2002; 2004).

The shape of spectra collected either when exciting AAA+NA, NADH or FAD varied largely through LAB suggesting that a fluorescence spectrum may be considered as a fingerprint.

3.2.2. Discrimination of type strain collections at the genus level

Type strains collections spectral data corresponding to each fluorophore were pooled in one matrix and Pearson-PCA was applied to it. Linearly independent factors were then used as new variables to perform

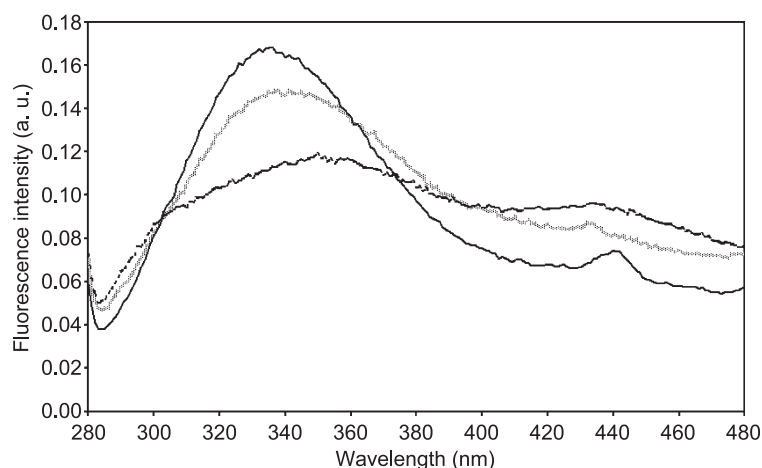


Fig. 1. Fluorescence spectra recorded following excitation at 250 nm on dilute suspensions of *Lb. sakei* CIP 103139 (Lbs) (dashed bar), *Vc. carniphilus* EIL (Vc) (dotted bar) and *Pc. pentosaceus* DSM 20336 (Pcp) (solid bar).

Table 2

Confusion matrix resulting from LAB genera—FDA applied to AAA+AN spectral data

	To Cb	To Ec	To Lb	To Lc	To Ln	To Pc	To Vc	To W	Sum (%)
From Cb	6	–	–	–	–	–	–	–	10.0
From Ec	–	6	–	–	–	–	–	–	10.0
From Lb	–	–	27	–	–	–	–	–	45.0
From Lc	–	–	–	6	–	–	–	–	10.0
From Ln	–	–	–	–	3	–	–	–	5.0
From Pc	–	–	1	–	–	2	–	–	5.0
From Vc	–	–	–	–	–	–	3	–	5.0
From W	–	–	–	–	–	–	–	6	10.0
Sum (%)	10.00	10.00	46.67	10.00	5.00	3.33	5.00	10.00	100.0

Correct classification: 98.3%.

FDA. Before applying FDA, groups were created closely to LAB genera considered: *Lactobacillus* group (Lb) (Lbs, Lbb, Lbc, Lbpl, Lbpe, Lbf, Lba1, Lba2, Lbcc), *Carnobacterium* group (Cb) (Cbd, Cbm), *Weissella* group (W) (Vv, Wh), *Lactococcus* group (Lc) (Lcll, Lcg), *Enterococcus* group (Ec) (Ecfe, Ecfc), *Vagococcus* group (Vc) (Vcc), *Pediococcus* group (Pc) (Pcp) and *Leuconostoc* group (Ln) (Lm). These groups constituted the dependent variable.

Considering AAA+AN spectra, the genus-model presented 98.3% of correct classification as it is shown in Table 2. Only one strain was misclassified. The map defined by discriminant factors 1 and 3 is presented in Fig. 2 and these two discriminant factors explained 63.0 % of the total variance. Considering

the DF 3 which took into account 16.8% of the total variance, *Enterococcus*, *Lactococcus* and *Vagococcus* genera presented equal factor scores confirming once again the close relation of these genera (Goh et al., 2000). The same observation may be made for *Lactobacillus*, *Carnobacterium* and *Weissella* genera. Indeed, all *Carnobacterium* and *Weissella* species considered in this study derive taxonomically from the *Lactobacillus* genus. Indeed, *Cb. divergens* and *Cb. maltaromaticum* were assigned previously as *Lb. carnis* and *Lb. piscicola*, respectively (Collins et al., 1987), and *W. halotolerans* and *W. viridescens* were assigned in the past as *Lb. halotolerans* and *Lb. viridescens* (Niven and Evans, 1957; Kandler et al., 1983). Consequently, the DF 3 distinguished between

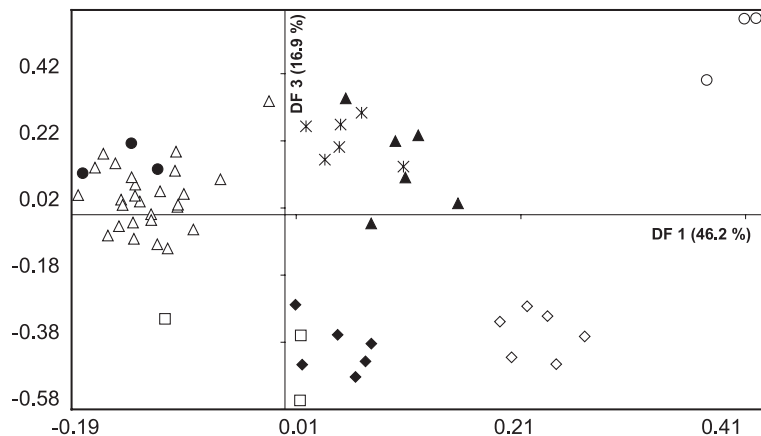


Fig. 2. Discriminant analysis similarity map determined by discriminant factors 1 and 3 for the AAA+NA fluorescence spectral data of the different LAB genera: Δ : *Lactobacillus* (Lb), \blacktriangle : *Carnobacterium* (Cb), $*$: *Weissella* (W), \diamond : *Lactococcus* (Lc), \blacklozenge : *Enterococcus* (Ec), \square : *Vagococcus* (Vc), \bullet : *Pediococcus* (Pc), \circ : *Leuconostoc* (Ln).

Table 3
Confusion matrix resulting from the *Lactobacillus* species—FDA applied to AAA+AN spectral data

	To Lba	To Lbc	To Lbcc	To Lbf	To Lbpe	To Lbpl	To Lbs	Sum (%)
From Lba	6	–	–	–	–	–	–	22.2
From Lbc	–	3	–	–	–	–	–	11.1
From Lbcc	–	–	3	–	–	–	–	11.1
From Lbf	–	–	–	3	–	–	–	11.1
From Lbpe	–	–	–	–	3	–	–	11.1
From Lbpl	–	–	–	–	–	3	–	11.1
From Lbs	–	–	–	–	–	–	6	22.2
Sum (%)	11.11	11.11	11.11	11.11	11.11	11.11	22.22	100.0

Correct classification: 100%.

Enterococci-like and Lactobacilli-like, while the DF1 which accounted for 46.2% of the total variance, discriminated each genus.

Considering NADH and FAD spectra, correct classifications were observed for 97.8% (NADH) and 95.6% (FAD) of spectra following FDA.

3.2.3. Discrimination of type strain collections at the species level

Reference *Lactobacillus* spectral data corresponding to each fluorophore were pooled in one matrix and Pearson-PCA was applied to it. Linearly independent factors were then used as new variables to perform FDA. Before applying FDA, groups were created closely to *Lactobacillus* species considered: *Lb. sakei* group (Lbs, Lbb), *Lb. curvatus* group (Lbc), *Lb. alimentarius* group (Lba1, Lba2), *Lb. farciminis* group (Lf), *Lb. pentosus* group (Lbpe), *Lb. plantarum*

group (Lbpl) and *Lb. casei* subsp. *casei* group (Lbcc). These groups constituted the dependent variable.

Considering AAA+AN spectra, the model presented 100% of correct classification as it shown in Table 3. The map defined by the discriminant factors 1 and 2 represented 87.2% of the total variance (Fig. 3). The map shows a clear discrimination between closely related species which can otherwise only be discriminated with recently developed molecular biological techniques, i.e., *Lb. sakei*/*Lb. curvatus*, *Lb. pentosus*/*Lb. plantarum* (Berthier and Ehrlich, 1998) and *Lb. alimentarius*/*Lb. farciminis* (Rachman et al., 2003). *Lb. bavaricus* NCDO 2588, which has been reclassified as *Lb. sakei* (Kagermeier-Callaway and Lauer, 1995), was attributed by the model to *Lb. sakei* group.

Whereas FT-IR is able to discriminate *Lb. sakei* from *Lb. curvatus*, this technique was not able to

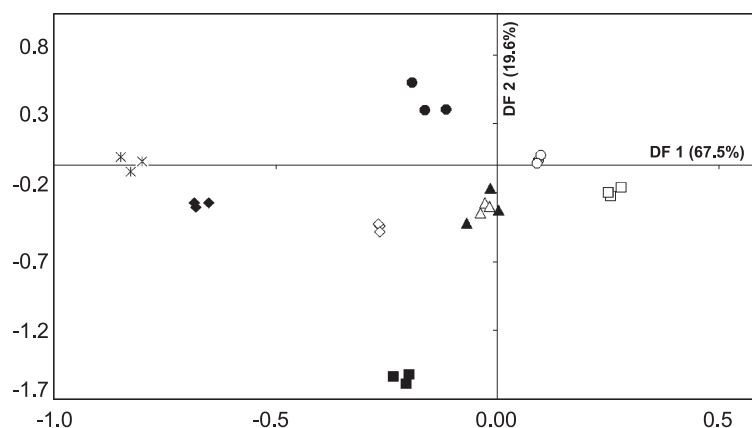


Fig. 3. Discriminant analysis similarity map determined by discriminant factors 1 and 2 for the AAA+NA fluorescence spectral data of the different *Lactobacillus* species: ▲: *Lb. sakei* CIP 103139 (Lbs), △: *Lb. sakei* NCDO 2588 (Lbb), *: *Lb. curvatus* CIP 102992 (Lbc), ◇: *Lb. alimentarius*. CIP 102986 (Lba1), ◆: *Lb. alimentarius* DSM 20181 (Lba2), □: *Lb. farciminis* CIP 103136 (Lf), ●: *Lb. pentosus* NCDO 363 (Lbpe), ○: *Lb. plantarum* CIP 103151 (Lbpl), ■: *Lb. casei* subsp. *casei* ATCC 11978 (Lbcc).

Table 4
Confusion matrix resulting from LAB species—FDA applied to AAA+AN spectral data

	Cbd	Cbm	Ecfc	Ecfe	Lba	Lbc	Lbcc	Lbf	Lbpe	Lbpl	Lbs	Lcg	Lcll	Lnmm	Pcp	Vcc	Wh	Wv	Sum (%)
Cbd	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Cbm	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Ecfc	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Ecfe	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Lba	–	–	–	–	6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	10
Lbc	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Lbcc	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Lbf	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Lbpe	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Lbpl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	5
Lbs	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	6	–	–	–	–	–	–	–	10
Lcg	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	5
Lcll	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	5
Lnmm	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	5
Pcp	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	5
Vcc	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	5
Wh	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	5
Wv	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	5
Sum (%)	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	5	5	100

Correct classification: 100%.

discriminate between *Lb. pentosus* and *Lb. plantarum* (Amiel et al., 2000).

Although the model classified *Lb. alimentarius* DSM 20181 (G. Reuter: strain R 100d) and CIP 102986 (G. Reuter: strain R 13) as *Lb. alimentarius* species, it was able to discriminate between them as shown on the map (Fig. 3). These results indicate the potential of intrinsic fluorescence to discriminate LAB

at the subspecies or strain level. This is in agreement with Leblanc and Dufour (2002; 2004) who showed discrimination of *Staphylococcus carnosus* strains from their spectra. The hypothesis is also strengthened by the close positioning on the map of *Lb. sakei* CIP 103139 and NCDO 2588 (ex. *Lb. bavaricus*), which belong to the same subspecies *Lb. sakei* subsp. *sakei* (Trüper and De' Clari, 1997).

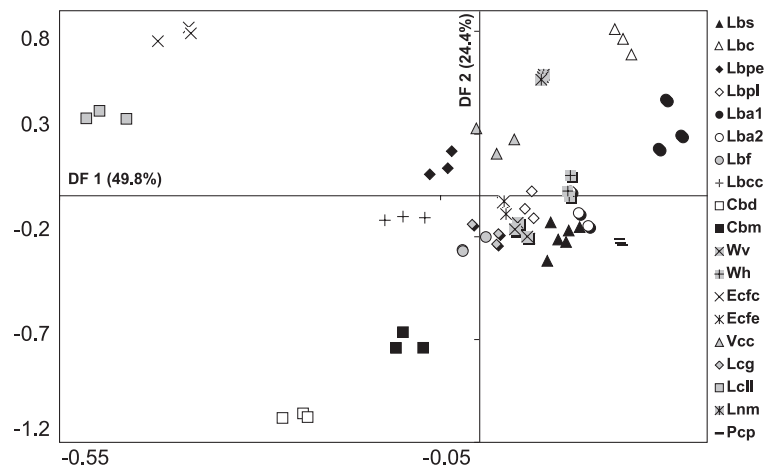


Fig. 4. Discriminant analysis similarity map determined by discriminant factors 1 and 2 for the AAA+NA fluorescence spectral data of the different LAB species.

Table 5
Classification of the supplementary observations (wild isolates)

Isolates molecular identification (Ammor et al., 2004)	No. of isolates for which 3/3 observations were correctly classified	No. of isolates for which 2/3 observations were correctly classified	No. of isolates for which the 1/3 observations were correctly classified	No. of isolates for which 0/3 observations were correctly classified	Percentage of good classification/ species (%)
<i>Lb. sakei</i>	12/12	–	–	–	100.00
<i>Ec. faecium</i>	4/7	3/7	–	–	85.71
<i>Lc. garvieae</i>	5/5	–	–	–	100.00
<i>Vc. carniphilus</i>	3/4	1/4	–	–	91.66
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> 2	–	–	–	1/1	0.00
Percentage of good classification/no. of observations (%)	82.75	13.79	0.00	3.44	
Total observations that have been correctly classified					91.95

Considering NADH and FAD spectra, correct classifications were observed for 88.9% (NADH) and 88.9% (FAD) of spectra following FDA.

3.2.4. Discrimination of type strain collections at the genus-species level

Type strains collections spectra corresponding to each fluorophore (AAA+NA, NADH and FAD) were pooled in one matrix and Pearson-PCA was applied to it. Linearly independent factors were then used as new variables to perform FDA. Before applying FDA, groups were created closely to LAB species considered: *Lb. sakei* group (Lbs, Lbb), *Lb. curvatus* group (Lbc), *Lb. alimentarius* group (Lba1, Lba2), *Lb. farciminis* group (Lf), *Lb. pentosus* group (Lbpe), *Lb. plantarum* group (Lbpl), *Lb. casei* subsp. *casei* group (Lbcc), *Cb. divergens* group (Cbm), *Cb. maltaromaticum* group (Cbm), *W. viridescens* group (Wv), *W. halotoleans* group (Wh), *Lc. lactis* subsp. *lactis* group (Lcll), *Lc. garvieae* group (Lcg), *Ec. faecium* group (Ecfe), *Ec. faecalis* group (Ecfc), *Vc.*

carniphilus group (Vcc), *Pc. pentosaceus* group (Pcp) and *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* group (Ln). These groups constituted the dependent variable.

Considering AAA+AN spectra, the model presented 100% of correct classification as it shown in the Table 4. The map defined by the discriminant factors 1 and 2 represented 74.2% of the total variance (Fig. 4).

Considering NADH and FAD, correct classifications were observed for 88.9% (NADH) and 97.8% (FAD) following FDA.

Regarding results obtained with the three kinds of fluorophores, AAA+NA spectra have been considered for the continuation of the study.

3.3. Model validation

3.3.1. Identification of wild LAB

To validate the model, wild LAB isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages (Ammor et al., submitted for publication) were

Table 6

Prior-classification, post-classification, membership probability, observation scores and squared distances to the *Lb. sakei* subspecies groups' centroids

Observation	Prior	Post	Prob. Lbs/c	Prob. Lbs/s	DF 1	$D^2(i, \text{centroid(Lbs/c)})$	$D^2(i, \text{centroid(Lbs/s)})$
Lbs#1	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.77	12,745.02	20.16
Lbs#2	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.79	13,092.86	20.16
Lbs#3	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.80	13,193.76	20.16
Lbb#1	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.79	12,974.02	20.16
Lbb#2	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.78	12,938.14	20.16
Lbb#3	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.79	13,052.27	20.16
E1L-21#1	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.76	12,581.95	20.16
E1L-21#2	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.80	13,161.52	20.16
E1L-21#3	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.81	13,407.17	20.16
E1L-31#1	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.79	13,064.63	20.16
E1L-31#2	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.78	12,950.84	20.16
E1L-31#3	Lbs/s	Lbs/s	0.0	1.0	0.79	13,087.70	20.16
E1L-3#1	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.79	20.16	13,105.56
E1L-3#2	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.80	20.16	13,167.30
E1L-3#3	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.78	20.16	12,863.10
E1L-9#1	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.79	20.16	12,983.53
E1L-9#2	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.79	20.16	13,125.01
E1L-9#3	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.78	20.16	12,962.10
E1L-11#1	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.79	20.16	13,040.07
E1L-11#2	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.79	20.16	12,978.23
E1L-11#3	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.78	20.16	12,918.12
E1L-17#1	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.78	20.16	12,866.67
E1L-17#2	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.83	20.16	13,632.21
E1L-17#3	Lbs/c	Lbs/c	1.0	0.0	-0.76	20.16	12,607.99

Lbs/c: *Lb. sakei* subsp. *carneus* group, Lbs/s: *Lb. sakei* subsp. *sakei* group, Prob: probability, DF: discriminant factor, D^2 : squared distance, i : observation.

considered. AAA+NA spectral data of these wild isolates were collected and pooled in one matrix. A Pearson-PCA was applied to both type strain collections and isolates spectral data. The type strains constituted the principal observations while the isolates constituted the supplementary observations, i.e., isolates spectral data (supplementary observations) did not contribute to the model initially. Linearly independent factors (principal and supplementary) were used as a new variables (principal and supplementary) to perform FDA. Of the 87 observations (29 isolates*3 batches), only 7 were misclassified (Table 5). Among these seven observations, three were those of *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 2 and the last four constituted one of the three observations recorded for three *Ec. faecium* and one *Vc. carniphilus* isolates. Thus, the model presented 92.0% of correct classification. This misclassification of all *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 2 observations confirm once again the ability of intrinsic fluorescence to discriminate at the subspecies level since the corresponding type strain of *Ln. mesenteroides* was belonged to the *mesenteroides* subspecies and not the *dextranicum* subspecies.

3.3.2. Investigation of the ability of intrinsic fluorescence to discriminate at the subspecies level

The ability of intrinsic fluorescence to discriminate at the subspecies level was considered using 6 *Lb. sakei* isolates from the 12 considered and the 2 type strains CIP 103139 and NCDO 2588. Four of the six isolates were previously identified as belonging to the subspecies *Lb. sakei* subsp. *carneus*, whereas the two others were identified as belonging to the subspecies *Lb. sakei* subsp. *sakei* (Ammor et al., submitted for publication).

AAA+NA spectra of the eight strains were pooled in one matrix and Pearson-PCA was applied. Linearly independent factors were then used as new variables to perform FDA. Before applying FDA, two groups were created. One group formed by the four *Lb. sakei* subsp. *carneus* and the other group was formed by the two others isolates and the two type strains which belong all to the *Lb. sakei* subsp. *sakei*. These groups constituted the dependent variable.

Table 6 presents prior- and post-classification of the 24 observations following FDA, membership probability, observations score on the unique discrim-

inant factor 1 and the squared distances to *Lb. sakei* subsp. *sakei* and *Lb. sakei* subsp. *carneus* groups' centroids. The model unambiguously classified 100% of observations correctly. Thus, intrinsic fluorescence is able to discriminate at the subspecies level.

4. Conclusions

Regarding the results obtained, it is concluded that intrinsic fluorescence is a powerful tool for LAB identification at the genus, species and subspecies levels. Molecular methods are also able to discriminate at these different levels, but they are expensive and need reagents.

Such a study suggests the possible use of intrinsic fluorescence to trace LAB in meat environments and products. This suggestion is strengthened by the recent results obtained by Leriche et al. (in press) who were able to discriminate *Pseudomonas* spp. in cheese with regard to their origin (milk, water and cheese).

Acknowledgements

We thank Pr. Linda S. Powers from the National Center for the Design of Molecular Function (Utah State University, UT, USA) for valuable discussions.

References

- Amiel, C., Marley, L., Curk-Daubié, M.C., Pichon, P., Travert, J., 2000. Potentiality of Fourier transform infrared spectroscopy for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria. *Lait* 80, 445–459.
- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Dufour, E., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Chevallier, I., 2004. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiol.* submitted for publication.
- Berthier, F., Ehrlich, S.D., 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 97–106.
- Bertrand, D., Scotter, C.N.G., 1992. Application of multivariate analyses to NIR spectra of gelatinized starch. *Appl. Spectrosc.* 46, 1420–1425.
- Cantor, C.R., Schimmel, P.R., 1980. Other optical techniques. *Biophysical Chemistry-Part 2: Techniques for the Study of*

- Biological Structure and Function. In: Freeman, W.H., Cie (Eds.), New York, pp. 409–480.
- Chevallier, I., Talon, R., Laguet, A., Labayle, S., Labadie, J., 2001. Application de la démarche d'écologie microbienne dirigée dans un atelier fermier charcutier (I): inventaire de la flore de l'atelier et du produit. Proceeding of the 13th Agoral Meeting, Tec and Doc series edition. Lavoisier, Paris, pp. 213–218.
- Choo-Smith, L.P., Maquelin, K., van Vreeswijk, T., Bruining, H.A., Puppels, G.J., Ngo Thi, N.A., Kirschner, C., Naumann, D., Ami, D., Villa, A.M., Orsini, F., Doglia, S.M., Lamfarraj, H., Sockalingum, G.D., Manfait, M., Allouch, P., Endtz, H.P., 2001. Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1461–1469.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Feresu, S., Jones, D., 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 310–316.
- Estes, C., Duncan, A., Wade, B., Lloyd, C., Ellis Jr., W., Powers, L., 2003. Reagentless detection of microorganisms by intrinsic fluorescence. *Biosens. Bioelectron.* 18, 511–519.
- Goh, S.H., Facklam, R.R., Chang, M., Hill, J.E., Tyrrell, G.J., Burns, E.C., Chan, D., He, C., Rahim, T., Shaw, C., Hemmingsen, S.M., 2000. Identification of Enterococcus species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3953–3959.
- Hammes, W.P., Knauf, H.J., 1994. Starters in the processing of meat products. *Meat Sci.* 36, 155–168.
- Hariston, P.P., Ho, J., Quant, F.R., 1997. Design of instrument for real-time detection of bioaerosols using simultaneous measurement of particle aerodynamic size and intrinsic fluorescence. *J. Aerosol Sci.* 28, 471–482.
- Herbert, S., 1999. Caractérisation de la structure moléculaire et microscopique de fromages à pâte molle. Analyse multivariée des données structurales en relation avec la texture, Thèse, Ecole Doctorale Chimie Biologie de l'Université de Nantes, France, 118 p.
- Jolliffe, I.T., 1986. Principal Component Analysis. Springer, New York.
- Kagermeier-Callaway, A.S., Lauer, E., 1995. *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 is the senior synonym for *Lactobacillus bavaricus* Stetter and Stetter 1980. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 398–399.
- Kandler, O., Schillinger, U., Weiss, N., 1983. *Lactobacillus halotolerans* sp. nov., nom. rev. and *Lactobacillus minor* sp. nov., nom. rev.. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 280–285.
- Kell, D.B., Ryder, H.M., Kaprelyants, A.S., Westerhoff, H.V., 1991. Quantifying heterogeneity: flow cytometry of bacteria cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* 60, 145–158.
- Lakowicz, J.R., 1983. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York.
- Leblanc, L., Dufour, E., 2002. Monitoring the identity of bacteria using their intrinsic fluorescence. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 147–153.
- Leblanc, L., Dufour, E., 2004. Monitoring bacteria growth using their intrinsic fluorescence. *Sci. Aliment.* 24, 207–220.
- Leriche, F., Bordessoules, A., Fayolle, K., Karoui, R., Laval, K., Leblanc, L., Dufour, E., 2004. Alteration of raw-milk cheese by *Pseudomonas* spp.—monitoring the sources of contamination using fluorescence spectroscopy and metabolic profiling. *J. Microb. Methods* in press.
- Montel, M.C., Talon, R., Fourmaud, J., Champommier, M.C., 1991. A simplified Key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 469–472.
- Niven Jr., C.F., Evans, J.B., 1957. *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. *J. Bacteriol.* 73, 758–759.
- Parente, E., Grieco, S., Crudele, M.A., 2001. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (southern Italy). *J. Appl. Microbiol.* 90, 943–952.
- Rachman, C.N., Kabadjova, P., Prévost, H., Dousset, X., 2003. Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminis* with 16S–23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1207–1216.
- Safar, M., Bertrand, P.R., Devaux, M.F., Genot, C., 1994. Characterization of edible oils, butters, and margarines by Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance. *JAOCs* 71, 371–377.
- Stryer, L., 1988. Biochemistry. Freeman W.H. and Company, New York.
- Tailliez, P., Beaud, D., Ogier, J.C., 2002. Le point sur les outils moléculaires de classification et d'écologie microbienne. *Sci. Aliment.* 22, 5–21.
- Trüper, H.G., De'Clari, L., 1997. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) “in apposition”. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 908–909.

III.- Caractérisation et sélection des bactéries lactiques par rapport à leur propriétés technologiques

1. Activités antibactériennes des bactéries lactiques à l'encontre de bactéries d'altération et pathogènes isolées aussi du même atelier fermier de salaison : 1- Détection et caractérisation des produits antibactériens

Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis à « Food Control » : **Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. & Chevallier, I.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same small-scale facility producing traditional dry sausages: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, accepté sous réserve.

1.1. Objectifs

Dans la perspective de développer un ferment lactique et de mettre en place une « flore barrière » adaptés à cet atelier, nous nous sommes attachés à détecter les isolats lactiques présentant une activité anti-bactérienne, principalement bactériocinogénique, à l'encontre de bactéries pathogènes et d'altération isolées de cet atelier. En effet, à l'exception de *L. innocua* et de *E. coli*, toutes les autres bactéries témoins ont été isolées du même atelier que la flore lactique. Le but était de simuler les interactions anti-bactériennes pouvant être mises en oeuvre au niveau de cet atelier ; dans les perspectives de la mise en place d'une écologie microbienne dirigée.

S'intéresser spécialement aux bactériocines s'explique par le fait que les bactéries lactiques, qui sont les acteurs principaux de la fermentation, sont connues pour leur aptitude à produire des bactériocines. Les bactériocines présentent les avantages d'être efficaces contre les bactéries pathogènes, d'être inoffensives pour le consommateur et d'être inactivées par les enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal.

1.2. Résultats et discussion

La méthode de diffusion dans la gélose à travers des puits a été utilisée pour détecter les souches présentant une activité anti-bactérienne à l'encontre des bactéries témoins. Parmi les 87 isolats testés, 36 présentaient des activités anti-bactériennes à l'encontre d'une ou plusieurs bactéries témoins. Parmi ces 36 espèces, 33 étaient antagonistes de *L. innocua*, mais seulement 5 *Vc. carniphilus*, 3 *Ec. faecium* et 3 *Lc. garvieae* étaient aussi antagonistes de *Sc. aureus*. Les 5 *Vc. carniphilus* ci-dessus mentionnées ont aussi été trouvés comme antagonistes de *H. alvei*, une bactérie d'altération psychrotrophe à Gram-négatif, fréquemment isolée des produits carnés.

Des études plus approfondies portant sur l'ensemble de ces 11 bactéries, ainsi que sur un *Lb. sakei* et un *Enterococcus* spp. présentant une large zone d'inhibition à l'encontre de *L. innocua* ou de *Sc. aureus*, ont été menées en vue de préciser la nature du produit antibactérien produit à l'encontre de *L. innocua* et/ou *Sc. aureus*. L'addition de NaOH (1N) et de catalase a servi à éliminer, respectivement, les effets inhibiteurs des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène. La production de bactériocine n'a pas pu être détectée dans les surnageants filtrés. Néanmoins l'application de protéases aux surnageants non filtrés a éliminé l'effet inhibiteur précédemment observé. Enfin, la thermisation à 80°C pendant 10 min des surnageants n'a pas affecté l'activité antibactérienne. En conclusion, ces 13 bactéries lactiques ont été caractérisées comme productrices de « bacteriocins-like » à l'encontre de *L. innocua* et/ou de *Sc. aureus*. De plus, nous avons détecté pour la première fois une « bacteriocin-like » produite par *Vc. carniphilus*. Enfin, une « bacteriocin-like » produite par *Lc. garvieae* inhibant *L. innocua* et *Sc. aureus* a été caractérisée pour la première fois.

Les activités des ces « bacteriocins-like » n'ont été détectées que lorsque les cellules productrice et cible étaient en contact. Trois hypothèses peuvent expliquer cette observation : i) le filtre absorberait la « bacteriocin-like » ; ii) la « bacteriocin-like » se présenterait sous la forme d'une bactériocine de la classe IIa, et serait formé d'une région N-terminale hydrophile et d'une région C-terminale hydrophobe. Dans ce cas, il se pourrait que la région hydrophobe soit adsorbée par le filtre et que l'autre hydrophile passe à travers le filtre ; iii) la « bacteriocin-like » resterait collée à la paroi de la cellule et la production de ce produit antibactérien ne pourra se faire qu'en cas de contact des cellules productrice et cible.

Afin de tester la première hypothèse, nous avons utilisé 2 filtres différents en acétate de cellulose et caractérisés par un faible pouvoir d'adsorption des protéines. Pour ces 2 filtres,

aucune activité n'a été détectée dans les surnageants. Afin de vérifier l'hypothèse 2, nous avons utilisé la méthode des puits critiques qui est généralement utilisée pour mesurer l'activité des bactériocines. Nous avons mélangé la dilution du surnageant non filtré à partir de laquelle aucune inhibition n'est observée avec le surnageant filtré non dilué. Dans ce cas aussi, aucune activité « bacteriocin-like » n'a pu être détectée. Suite à ces 2 résultats, nous avons retenu l'hypothèse 3. C'est-à-dire que la « bacteriocin-like » resterait collée à la paroi de la cellule et sa production est activée lorsque les cellules productrice et cible entrent en contact.

1.3. Conclusion

La qualité du saucisson sec dépend de l'écosystème microbien. L'équilibre microbien trouvé dans le produit est la résultante de la dynamique des différentes communautés microbiennes tout au long du processus de fabrication. La production de bactériocines par les bactéries lactiques devrait être facteur important dans l'inhibition des flores d'altération et/ou pathogène.

Des études plus approfondies doivent être menées pour purifier, caractériser et étudier le mode d'action et la cinétique de production des ces « bacteriocins-like ». L'enjeu à long terme, surtout pour l'agro-industrie, est de trouver un moyen naturel de diminuer l'utilisation des conservateurs ou d'augmenter les dates limites de conservation.

Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility

1—Screening and characterization of the antibacterial compounds

Salim Ammor, Grégoire Tauveron, Eric Dufour, Isabelle Chevallier *

Unité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires, ENITA-CF, Site de Marmilhat, 63370 Lempdes, France

Received 28 August 2004; received in revised form 3 February 2005; accepted 7 February 2005

Abstract

A total of 87 lactic acid bacteria (LAB) (36 *Lactobacillus sakei*, 22 *Enterococcus faecium*, 16 *Lactococcus garvieae*, 11 *Vagococcus carniphilus* and 2 *Enterococcus* sp.) isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages were screened for antagonistic activity against other LAB and some spoilage and pathogenic microorganisms, also isolated from the same processing facility, except *Listeria innocua* (in lieu of *Listeria monocytogenes*) and *Escherichia coli*. The final goal was to investigate LAB antibacterial activity within the facility microbial ecosystem and to select interesting strains for the role of bio-preservatives.

Twenty-one *Ec. faecium*, 6 *Vc. carniphilus*, 4 *Lc. garvieae*, 3 *Lb. sakei* and 2 *Enterococcus* sp. were shown to inhibit the growth of some indicator microorganisms in an agar well diffusion assay. Except 2 *Lb. sakei* and an *Enterococcus* sp., all these isolates exhibited antibacterial activity against *L. innocua*, but only 3 *Ec. faecium*, 5 *Vc. carniphilus* and 3 *Lc. garvieae* displayed also antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*. The 5 *Vc. carniphilus* isolates were also found to be inhibitory for the Gram-negative bacterium *Hafnia alvei*.

Isolates displaying antibacterial activity against *L. innocua* and/or *Sc. aureus* were investigated for the nature of antibacterial compounds synthesized against these indicator microorganisms. Bacteriocin-like production could be detected only on agar plated in overlay assays, and was unsuccessfully researched in cell-free culture supernatant fluids under conditions that eliminate acid and hydrogen peroxide inhibition. Results also showed that a *Lb. sakei* isolate displayed an additional inhibitory effect by H₂O₂ against *L. innocua*. These isolates will be investigated for their ability to repress the growth of undesirable bacteria in biofilms, i.e., the real mode of bacterial attachment.

This is the first report on bacteriocin-like from *Vc. carniphilus* and on bacteriocin-like from *Lc. garvieae* active against both *L. innocua* and *Sc. aureus* species.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antibacterial activity; Bacteriocins; Lactic acid bacteria; Traditional dry sausages; Small-scale facility

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) have long been used in fermentations to preserve the nutritive qualities of vari-

ous foods. The primary antimicrobial effect exerted by LAB is the production of lactic acid and reduction of pH (Daeschel, 1989). In addition, LAB produce various antimicrobial compounds, which can be classified as low-molecular-mass (LMM) compounds such as hydrogen peroxide (H₂O₂), carbon dioxide (CO₂), diacetyl (2,3-butanedione), uncharacterized compounds, and

* Corresponding author. Tel.: +33 4 7398 1393; fax: +33 4 7398 1390.
E-mail address: chevallier@enitac.fr (I. Chevallier).

high-molecular-mass (HMM) compounds like bacteriocins (Jay, 1982; Klaenhammer, 1988; Piard & Desmazeaud, 1991, 1992). All of which can antagonize the growth of some spoilage and pathogenic bacteria in foods.

Levels and types of organic acids produced during the fermentation process depend on LAB species or strains, culture composition and growth conditions (Lindgren & Dobrogosz, 1990). The antimicrobial effect of organic acids lies in the reduction of pH, as well as the undissociated form of the molecules (Podolak, Zayas, Kastner, & Fung, 1996). It has been proposed that the low external pH causes acidification of the cell cytoplasm, while the undissociated acid, being lipophilic, can diffuse passively across the membrane (Kashket, 1987). The undissociated acid acts by collapsing the electrochemical proton gradient, or by altering the cell membrane permeability which results in disruption of substrate transport systems (Snijders, van Logtestijn, Mossel, & Smulders, 1985). Lactic acid is the major organic acid of LAB fermentation where it is in equilibrium with its undissociated and dissociated forms, and the extent of the dissociation depends on pH (Lindgren & Dobrogosz, 1990).

Hydrogen peroxide is produced by LAB in the presence of oxygen as a result of the action of flavoprotein oxidases or nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) peroxidase. The antimicrobial effect of H₂O₂ may result from the oxidation of sulfhydryl groups causing denaturing of a number of enzymes, and from the peroxidation of membrane lipids thus increasing membrane permeability (Kong & Davison, 1980). H₂O₂ may also be as a precursor for the production of bactericidal free radicals such as superoxide (O₂⁻) and hydroxyl (OH[•]) radicals which can damage DNA (Byczkowski & Gessner, 1988).

Carbon dioxide is mainly produced by heterofermentative LAB. The precise mechanism of its antimicrobial action is still unknown. However, CO₂ may play a role in creating an anaerobic environment which inhibits enzymatic decarboxylations, and the accumulation of CO₂ in the membrane lipid bilayer may cause a dysfunction in permeability (Eklund, 1984). CO₂ can effectively inhibit the growth of many food spoilage microorganisms, especially Gram-negative psychrotrophic bacteria (Farber, 1991). The degree of inhibition by CO₂ varies considerably between the organisms. CO₂ at 10% (v/v) could lower the total bacterial counts by 50% (v/v) (Wagner & Moberg, 1989), and at 20–50% it had a strong antifungal activity (Lindgren & Dobrogosz, 1990).

Diacetyl, i.e., an aroma component, is produced by strains within all genera of LAB by citrate fermentation. It inhibits the growth of Gram-negative bacteria by reacting with arginine utilization (Jay, 1986). Jay (1982) showed that Gram-negative bacteria were more

sensitive to diacetyl than Gram-positive bacteria; the former were inhibited by diacetyl at 200 µg/ml. Diacetyl at 344 µg/ml inhibited strains of *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* and *Aeromonas*.

Among HMM compounds, bacteriocins have attracted a great interest in food industry due to their applicational potentiality in food preservation. Bacteriocins are ribosomally synthesized, extracellularly released bioactive peptides or peptide complexes (usually 30–60 amino acids) which have a bactericidal or bacteriostatic effect on other (usually closely related) species (Garneau, Martin, & Vederas, 2002). In all cases, the producer cell exhibits specific immunity to the action of its own bacteriocin. They are generally considered to act at the cytoplasmic membrane and dissipate the proton motive force through the formation of pores in the phospholipids bilayer (Montville, Winkowski, & Ludescher, 1995). Nisin is the best defined, and the only purified bacteriocin produced by LAB that has been approved for use in food products (Hansen, 1994).

Numerous reviews have suggested that some LAB were able to control the growth of some pathogens microorganisms such as *L. monocytogenes* in food products (Callewaert, Hugas, & De Vuyst, 2000; Mataragas, Drosinos, & Metaxopoulos, 2003; Schöbitz, Zaror, Leon, & Costa, 1999; Tantillo, Di, & Novello, 2002). These food-borne LAB have been described as bacteriocin producers.

In this paper, we report on the screening of antibacterial activity and on the characterization of antibacterial compounds of 87 LAB isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. The antibacterial activities were tested against indicator microorganisms also isolated from the same small-scale facility (except *L. innocua* and *E. coli*) in order to simulate the workshop ecological niche. The goal was to investigate LAB antibacterial activity within the facility microbial ecosystem and finally to select interesting strains for the role of bio-preservatives.

2. Materials and methods

2.1. Strains and culture conditions

The 87 LAB considered in this study were isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages (Chevallier, Talon, Laguet, Labayle, & Labadie, 2001) and were identified in a previous study as 36 *Lb. sakei*, 22 *Ec. faecium*, 14 *Lc. garvieae* 11 *Vc. carniphilus* and 2 *Enterococcus* sp. (Ammor et al., 2005). These isolates were subcultured twice (1% inoculum, 24 h, 30 °C) in 15 ml MRS broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and kept frozen at –20 °C in MRS supplemented with 10% glycerol. Bacterial species used as indicator microorganisms (Table 1) were isolated from the

Table 1
Inventory of the indicator bacteria used and their growth conditions

Indicator species	Strain no.	Origin	Growth medium	Incubations conditions
Gram-positive bacteria				
<i>Lactobacillus sakei</i>	E1L-26	SSSF ^a	MRS	30 °C, 5% CO ₂
<i>Lactobacillus sakei</i>	E1L-28	SSSF ^a	MRS	30 °C, 5% CO ₂
<i>Enterococcus faecium</i>	E1L-38	SSSF ^a	MRS	30 °C
<i>Enterococcus faecium</i>	E1L-42	SSSF ^a	MRS	30 °C
<i>Enterococcus</i> sp.	EL1-60	SSSF ^a	MRS	30 °C
<i>Staphylococcus carnosus</i>	E1M-155	SSSF ^a	BHI	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	E1S-5	SSSF ^a	BHI	37 °C
<i>Listeria innocua</i>	33090	ATCC ^b	BHI	37 °C
Gram-negative bacteria				
<i>Hafnia alvei</i>	E1E-25	SSSF ^a	BHI	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	54-8T	CIP ^c	BHI	37 °C
<i>Serratia liquefaciens</i>	E1E-22	SSSF ^a	BHI	37 °C
<i>Providencia alcalifaciens</i>	E1E-31	SSSF ^a	BHI	37 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	E1P-10	SSSF ^a	BHI	22 °C

^a The studied small-scale facility.

^b American Type Culture Collection (LGC Promechem, Molsheim, France).

^c Collection de l'Institut Pasteur (Institut Pasteur, Paris, France).

same small-scale facility; except *L. innocua* and *E. coli* (Chevallier et al., 2001). The LAB ones were prepared as described above. The non-LAB were subcultured twice (1% inoculum, 24 h, appropriate temperature) in 10 ml BHI broth (Biokar Diagnostics) and kept frozen at –20 °C in BHI broth supplemented with 30% glycerol. All the experiments were performed in triplicate and the results are displayed as the mean value of the experiments.

2.2. Screening for antagonistic activity

An agar well diffusion assay (AWDA) was used for detection of antagonistic activity. BHI agar plates (1.5% agar), in which wells were formed, were overlaid with 10 ml of molten BHI agar (0.75% agar) inoculated with 25 µl of an overnight culture of the indicator microorganism. Wells, of 5 mm in diameter and of 18 µl in capacity, were formed by placing the top of 1 ml sterile pipet tips on the surface layer before pouring the top agar layer. Once the top agar layer had hardened, the tops of the pipet tips were carefully removed to leave wells and 15 µl of an overnight culture of the putative inhibitor strain were placed in each well. The plates were then incubated aerobically for 24 h at 30 °C and were subsequently examined for zones of inhibition. Inhibition was recorded as negative if no zone was observed around the agar well. Each antagonistic activity was related to the area (mm²) of the inhibition zone displayed.

2.3. Characterization of the antibacterial compounds

Isolates exhibiting antagonistic activities against pathogenic microorganisms were investigated for their antibacterial compounds. These isolates were grown overnight at 30 °C in 20 ml BHI broth. A sample of

1 ml of each culture broth was taken (sample 1). A cell-free solution was obtained by centrifuging the remaining 19 ml of culture broth (10,844g for 15 min at 4 °C), followed by filtration of the supernatant through a 0.22 µm-pore-size cellulose acetate filter (Minisart 17597, Sartorius, Gottingen, Germany). Four samples (1 ml) of each filtered supernatant were taken (samples 2, 3, 4 and 5). The samples 3 and 5 were adjusted to pH 6.5 with 1 N of NaOH (Merck-eurolab, Briare Le Canal, France) to rule out acid inhibition. Inhibitory activity from the hydrogen peroxide was ruled out by the addition of catalase (300 U/ml) (C-3515, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) to samples 4 and 5. The antagonistic activities of the five samples were determined for each isolate by the AWDA as described above.

2.4. Sensitivity to heat and proteolytic enzymes

Sensitivity to heat of antibacterial compounds was investigated by treating the culture supernatants in water bath at 80 °C for 10 min and for 2 h. Immediately after, samples were cooled to 4 °C and the residual activity was determined by the AWDA as described above.

Sensitivity to proteolytic enzymes of antibacterial compounds was investigated by the addition of Trypsin T-4799 and Proteinase K P-5056 (Sigma-Aldrich Chemie) at final concentration of 1 mg ml⁻¹ to the culture supernatants. The samples were incubated for 3 h at 37 °C and immediately after, the residual activity was determined by the AWDA as described above.

2.5. Investigation of the bacteriocin-like mode of synthesis

All isolates producing a bacteriocin-like against *L. innocua* and/or *Sc. aureus* were investigated for the mode

of synthesis of the antibacterial compound. Cultures were prepared as described above. A sample of 1 ml was taken and severally diluted in salt tryptone broth (Biokar Diagnostics) until no inhibition zone was recorded by the AWDA. The remaining 19 ml of culture broth were centrifuged at the same parameters mentioned above. Two supernatant samples of 1 ml (1' and 2') were taken. The sample 2' was filtered through a 0.22 µm-pore-size cellulose acetate filter (Minisart 17597). A mixture of 40 µl (sample 3') was made by mixing 20 µl of the critical dilution with 20 µl of sample 2'. The pellet was washed and re-suspended in 19 ml of salt tryptone broth. A sample (1 ml) of this washed cells solution was taken (sample 4'). The antagonistic activities of the four samples were determined for each isolate by the AWDA as described above.

3. Results

3.1. Screening for antagonistic activity

A total of 38 strains (21 *Ec. faecium*, 6 *Vc. carniphilus*, 4 *Lc. garvieae*, 3 *Lb. sakei*, and 2 *Enterococcus* sp.) were shown to produce inhibition zones against some indicator microorganisms. Inhibitory spectra of these isolates are presented in Table 2. All inhibited indicator microorganisms, except *H. alvei*, were Gram-positive bacteria. Except for *Lb. sakei* E1L-1, *Lb. sakei* E1L-4 and *Enterococcus* sp. E1L-59, all isolates displayed inhibition zones against *L. innocua* ATCC 33090. However, only 5 *Vc. carniphilus*, 3 *Ec. faecium* and 3 *Lc. garvieae* were found to be also inhibitory for *Sc. aureus* E1S-5. These 5 *Vc. carniphilus* were also shown to inhibit the growth of

Table 2
Inhibitory spectra of LAB isolates exhibiting antibacterial activity

	Isolates	Indicator strains												
		E1L-26	E1L-28	E1L-38	E1L-42	EL1-60	E1M-155	E1S-5	33090	E1E-25	54- 8T	E1E-22	E1E-31	E1P-10
<i>Lb. sakei</i>	E1L-1	++	+++	–	++	+	–	–	–	–	–	–	–	–
	E1L-4	++	++	–	+ ^a	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	E1L-28	–	–	–	++	++	–	–	+	–	–	–	–	–
<i>Ec. faecium</i>	E1L-38	+	+	–	+	++	+	+	+	–	–	–	–	–
	E1L-39	–	+	+	–	++	–	+	+	–	–	–	–	–
	E1L-40	–	+	+	++	–	–	+	+	–	–	–	–	–
	E1L-41	+	+	–	+	–	–	–	++	–	–	–	–	–
	E1L-42	–	–	–	–	++	–	–	+	–	–	–	–	–
	E1L-43	–	–	–	–	++	–	–	+	–	–	–	–	–
	E1L-44	+ ^a	+	–	–	++	–	–	++	–	–	–	–	–
	E1L-45	–	–	+	–	++	–	–	++	–	–	–	–	–
	E1L-46	–	+	–	–	++	–	–	+	–	–	–	–	–
	E1L-47	–	+	+	–	++	–	–	+	–	–	–	–	–
	E1L-48	–	–	–	–	++	–	–	++	–	–	–	–	–
	E1L-49	–	+	–	–	++	–	–	+	–	–	–	–	–
	E1L-50	–	+	–	–	++	–	–	++	–	–	–	–	–
	E1L-51	–	–	–	–	++	–	–	++	–	–	–	–	–
	E1L-52	–	+	+	–	++	–	–	++	–	–	–	–	–
	E1L-53	+	–	–	–	++	–	–	++	–	–	–	–	–
	E1L-54	–	+	–	–	++	–	–	+	–	–	–	–	–
	E1L-55	–	–	–	–	++	–	–	+	–	–	–	–	–
E1L-56	–	+	+	–	++	–	–	+	–	–	–	–	–	
E1L-57	–	+	–	–	++	–	–	++	–	–	–	–	–	
E1L-58	–	+	–	–	++	–	–	++	–	–	–	–	–	
<i>Ec. sp.</i>	E1L-59	–	+	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–
	EL1-60	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
<i>Vc. carniphilus</i>	E1L-61	+	+	+	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–
	E1L-62	+	+	+ ^a	+	+	+	++	++	+	–	–	–	–
	E1L-63	+	+	+ ^a	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
	E1L-67	+	+	–	+	+	+	++	+	+	–	–	–	–
	E1L-69	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
	E1L-71	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–
<i>Lc. garvieae</i>	E1L-74	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
	E1L-75	–	–	–	–	–	+	++	+	–	–	–	–	–
	E1L-76	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–
	E1L-86	–	+	–	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–

+: <50 mm²; ++: <100 mm²; +++: <150 mm².

^a One of the 3 tests was negative.

H. alvei E1E-25. *Enterococcus* sp. E1L-59, which was not inhibitory for *L. innocua*, was in contrast inhibitory for *Sc. aureus*.

Ec. faecium isolates E1L-38, E1L-39 and E1L-40 displayed large inhibition spectra, including *L. innocua* and *Sc. aureus*. E1L-38 showed the broadest spectrum by inhibiting all other Gram-positive indicator strains.

Vc. carniphilus isolates E1L-61, E1L-62, E1L-63, E1L-67 and E1L-69 displayed very large inhibitory spectra, including *L. innocua*, *Sc. aureus* and *H. alvei*. The E1L-62 and E1L-63 isolates showed the broadest spectrum by inhibiting nine indicator microorganisms. These species were, globally, inhibitory for all LAB indicator microorganisms.

Inhibitory spectra of *Lc. garvieae* isolates were not large comprising mainly *L. innocua* and *Sc. aureus*. The E1L-86 isolate showed the broadest spectrum.

Otherwise, it is interesting to note that although most *Vc. carniphilus* and *Lc. garvieae* isolates were inhibitory for both pathogenic microorganisms, they were, in general, less effective against *L. innocua* than *Ec. faecium* isolates as regards the inhibition areas displayed.

Furthermore, although *Lb. sakei* isolates E1L-1 and E1L-4 were not able to inhibit either *L. innocua*, nor *Sc. aureus*, they exhibited a large inhibition zones against most of LAB. No antagonistic activity of *Lb. sakei* isolates was observed against *Sc. carnosus* E1M-155.

Regarding the results obtained, we selected *Vc. carniphilus* E1L-61, E1L-62, E1L-63, E1L-67 and E1L-69, *Ec. faecium* E1L-38, E1L-39 and E1L-40, *Lc. garvieae* E1L-75, E1L-76 and E1L-86, *Lb. sakei* E1L-28 and *Enterococcus* sp. E1L-59 for further characterization.

3.2. Characterization of the antibacterial compounds

The 13 selected LAB isolates exhibiting antagonistic activities against *L. innocua* ATCC 33090 and/or *Sc. aureus* E1S-5 were characterized for their antibacterial compounds. Additions of NaOH (1 N) and/or catalase (300 U/ml) were used to rule out alternatively or simultaneously acid inhibition and hydrogen peroxide inhibitions. Except *Lb. sakei* E1L-28, all isolates exhibited inhibition zones only for sample 1. The *Lb. sakei* strain E1L-28 displayed also similar inhibition zones for sample 2 (filtered supernatant) and sample 3 (filtered supernatant adjusted to pH 6.5) that were practically equal, but less large than that displayed by sample 1.

3.3. Sensitivity to heat and proteolytic enzymes

Application of Trypsin T-4799 and Proteinase K P-5056 (Sigma-Aldrich Chemie) at final concentration of 1 mg ml⁻¹ led to inactivation of the antagonistic activities of culture supernatants.

Heating at 80 °C for 10 min did not affect the antibacterial compounds since the AWDA showed residual

activities of samples. However, no inhibition zones were observed after heating at 80 °C for 2 h.

3.4. Investigation of the bacteriocin-like mode of synthesis

Each isolate producing a bacteriocin-like against *L. innocua* and/or *Sc. aureus* was investigated for the mode of synthesis of its antibacterial compound. All 13 isolates exhibited inhibition zones only by samples 1' (non-filtered supernatant) and 4' (washed cells). Antagonistic activity was detected neither for the filtered supernatant (sample 2') nor for the mixture of the critical dilution and the filtered supernatant (sample 3').

4. Discussion

Lactic acid bacteria originally isolated from traditional sausages are probably the best candidates for improving the microbiological safety of these foods, because they are well adapted to the conditions in sausages and should therefore be more competitive than LAB from other sources. Therefore, 87 LAB were screened for exhibition of antagonistic activities against indicator microorganisms also isolated from the same small-scale facility producing traditional sausages, except *L. innocua* (in lieu of *L. monocytogenes*) and *E. coli*. *L. innocua* was used instead of *L. monocytogenes* since the two microorganisms show similar physiological properties with the difference that the former does not belong to the pathogenic species of *Listeria*. Moreover, some papers reported a greater sensitivity of *L. monocytogenes* towards some antibacterial compounds than *L. innocua* (Çon, Gökalp, & Kaya, 2001; Mataragas et al., 2003). To restrict the extent of acid production, low-glucose medium, i.e., BHI (0.2% glucose), was used.

Of the 36 considered *Lb. sakei*, 3 exhibited antagonistic effects on agar medium against some Gram-positive indicator microorganisms, but only 1 of these isolates was antagonistic to *L. innocua*. Gram-negative indicator microorganisms *Pseudomonas fluorescens* E1P-10, *Serratia liquefaciens* E1E-22, *H. alvei* E1E-25, *E. coli* 54-8T and *Providencia alcalifaciens* E1E-31 were resistant. Similar results were reported by Tantillo et al. (2002) who showed that strains of *Lb. sakei* were able to inhibit *L. innocua* and other lactobacilli while strains of *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* were resistant. Therefore *Sc. aureus* was much more resistant than *L. innocua* like it was reported (Tantillo et al., 2002). The ability of *Lb. sakei* species to display antibacterial activity against *Listeria* species was shown in several reports (Liserre, Landgraf, Destro, & Franco, 2002; Mataragas et al., 2003; Nieto-Lozano, Reguera-Useros, Pelaez-Martnez, & Hardisson de la Torre, 2002). Alternatively, the general ineffectiveness of *Lb. sakei* species, and in general Gram-positive bacteria, against Gram-negative

bacteria was already reported (Jack, Tagg, & Ray, 1995). The outer membrane of Gram-negative bacteria may protect the cytoplasmic membrane from the action of the antimicrobial compound (Gao, Van Belkum, & Stiles, 1999).

Furthermore, we have observed that *Lb. sakei* isolates E1L-1 and E1L-4, which have been isolated from the final product, i.e., sausage-9 weeks (Ammor et al., 2005) were the most inhibitory for LAB indicator microorganisms, especially for *Lb. sakei* E1L-26, *Lb. sakei* E1L-28 and *Enterococcus* sp. E1L-60 which were all isolated from the sausage-1 week (Ammor et al., 2005). This observation may explain the occurrence of these 2 *Lb. sakei* isolates in the final product. Also, it is interesting to note that *Lb. sakei* isolates were not antagonistic to *Sc. carnosus* the technological bacterium often used in combination with *Lb. sakei* as starter cultures for dry sausages manufacturing.

Among 22 *Ec. faecium* isolates, 21 were inhibitory for *L. innocua* and 3 of them were also inhibitory for *Sc. aureus*. All inhibited indicator microorganisms Gram-positive bacteria. The ability of *Ec. faecium* species, from fermented sausages, to display antibacterial activity against *Listeria* and *Sc. aureus* species was reported by several authors (Callewaert et al., 2000; Cintas, Casaus, Høvarstein, Hernández, & Nes, 1997; Herranz et al., 2001). Leroy, Foulquié Moreno, and De Vuyst (2003) suggested to use *Ec. faecium* RZS C5 as co-culture in food fermentation as regards the boosted activity levels of its bacteriocin in the very early growth phase.

Among 16 *Lc. garvieae* isolates, 4 exhibited antibacterial activity against *L. innocua* and 3 were also inhibitory for *Sc. aureus*. To our knowledge, this is the second report on antibacterial activity from *Lc. garvieae* against *L. innocua* species, but authors of the first report (Villani et al., 2001) did not observed antagonistic activity of this bacterium against *Sc. aureus* as it was observed in this study.

Among 11 *Vc. carniphilus*, 6 exhibited antibacterial activities against some indicator microorganisms and 5 of these 7 isolates were also found to be inhibitory for *H. alvei*, the psychrotrophic spoilage bacterium most frequently isolated from meat and meat products (Castano, Garca Fontan, Fresno, Tornadizo, & Carballo, 2002). As far as it is known, no report has dealt with an antibacterial activity from *Vc. carniphilus* species against pathogenic microorganisms. Moreover, few LAB are able to display antagonistic activity against some Gram-negative bacteria (*H. alvei* in this study) (Pantev et al., 2002; Stevens, Sheldon, Klapes, & Klaenhammer, 1991). Thus, these isolates seem interesting regarding their broad spectra.

As the final goal was to apply a hurdle to reduce the prevalence of *L. monocytogenes* and *Sc. aureus* and thus to enhance the safety and keeping quality of food, we restricted our investigations in the following sections to

the study of only 13 isolates exhibiting antagonistic activity against *L. innocua* ATCC 33090 or *Sc. aureus* E1S-5. Therefore, characterizing the antibacterial compound responsible for the inhibition of these two pathogens was of interest. Antibacterial activity could be detected only on agar plated in overlay assays, and was unsuccessfully researched in cell-free culture supernatant fluids under conditions that eliminate acid and hydrogen peroxide inhibition. *Lb. sakei* E1L-28 was also found to display an additional antibacterial activity close to hydrogen peroxide since the addition of catalase inactivated the inhibition observed by the filtered supernatant adjusted to pH 6.5. Therefore regarding the proteinaceous nature, the thermostability at 80 °C for 10 min of antibacterial compounds and their residual activities after ruling out acid and hydrogen peroxide inhibition, it was concluded that these antibacterial compounds were bacteriocin-like.

Since bacteriocin-like production was unsuccessfully researched in cell-free culture supernatant fluids, we looked to characterize the mode of action of each bacteriocin-like. Two hypotheses could be emitted: the first consisted in the fact that the bacteriocin-like would be composed of N-terminal hydrophilic domain and C-terminal hydrophobic domain and thus the hydrophobic domain would be adsorbed by the hydrophilic substrate of the filter. This hypothesis was discarded since the addition of the critical dilution of the culture broth to the filtered supernatant does not activate the bacteriocin-like synthesis. The second hypothesis consisted in the fact that the bacteriocin-like would remain attached to the wall of the bacteriocin-like producing cell and thus the inhibition would not be effective unless the bacteriocin-like producing cell and the indicator one are in contact. This hypothesis was retained since washed cells were capable of inhibiting indicator microorganisms.

The production of bacteriocins only on agar plated in overlay assays was already reported for strain of *Staphylococcus xylosus* also isolated from sausages (Villani et al., 1997). The apparent inability to produce inhibitors in liquid culture is already reported as a probable consequence of protein inactivation under the growth conditions (Barefoot & Klaenhammer, 1983; Lyon & Glatz, 1991). Additional factors may also be involved in inducing inhibitor activities in liquid cultures (Barefoot & Nettles, 1993; Saucier, Poon, & Stiles, 1995; Tagg, Dajani, & Wannamaker, 1976). Alternatively, the apparent inability to produce the inhibitor in liquid media may reflect the fact that the organism exists in contact with solids when in nature. Further characterizations of the active substances have to be performed.

Lc. garvieae E1L-75, E1L-76 and E1L-86 and *Enterococcus* sp. E1L-59 present interesting inhibitory activities against *L. innocua* and *Sc. aureus*. However, *Lc. garvieae* has been described as an emerging zoonotic pathogen responsible for mastitis in cows and buffalos

(Collins, Farrow, Phillips, & Kandler, 1983; Teixeira et al., 1996). Thus its use as bio-preservative is not recommendable. Also *Enterococcus* sp. E1L-59 belonged neither to *Ec. faecium*, nor to *Ec. casseliflavus* species (Ammor et al., 2005), which are for instance the only suggested enterococci species to use as starter cultures in food fermentation (de Castro, Montano, Casado, Sanchez, & Rejano, 2002; Leroy et al., 2003). Thus its use as bio-preservative depends on further species identification.

Vc. carniphilus is a new species that has been isolated recently from ground beef (Shewmaker et al., 2004) and from red smear soft cheeses (Mayr, Fricker, Maoz, & Scherer, 2004). The clinical significance of this species is not yet determined. However, antibacterial activity displayed by these isolates against *L. innocua*, *Sc. aureus* and *H. alvei* encouraged us to consider them for further investigations.

5. Conclusion

It was shown in this study that several antagonistic activities may occur within the microbial ecosystem of the studied small-scale facility and thus influence the microbial ecosystem dynamics and diversity. Most of these antagonistic activities are subsequent to production of bacteriocins-like. These antibacterial compounds may constitute interesting weapons to fight against biofilms growth and implementation of undesirable microorganisms on the processing surfaces.

Acknowledgments

The authors acknowledge Dr. J. KOK (Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, Department of Genetics, University of Groningen, Haren, The Netherlands) for valuable discussions.

This work has been partly funded by AQS project, DGA contract R01/09, French Ministry of Agriculture.

References

- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., et al. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, *22*, 373–382.
- Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*, 1808–1815.
- Barefoot, S. F., & Nettles, C. G. (1993). Antibiosis revised: Bacteriocins produced by dairy starter cultures. *Journal of Dairy Science*, *76*, 2366–2379.
- Byczkowski, J., & Gessner, T. (1988). Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry*, *20*, 569–580.
- Callewaert, R., Hugas, M., & De Vuyst, L. (2000). Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, *57*, 33–42.
- Castano, A., Garca Fontan, M. C., Fresno, J. M., Tornadizo, M. E., & Carballo, J. (2002). Garca survival of Enterobacteriaceae during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage. *Food Control*, *13*, 107–115.
- Chevallier, I., Talon, R., Laguet, A., Labayle, S., & Labadie, J. (2001). Application de la démarche d'écologie microbienne dirigée dans un atelier fermier charcutier (I). Inventaire de la flore de l'atelier et du produit. In *Proceeding of the 13th agoral meeting, Dijon, France* (pp. 213–218).
- Cintas, L. M., Casaus, P., Høvarstein, L. S., Hernández, P. E., & Nes, I. F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec- dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*, 4321–4330.
- Collins, M. D., Farrow, J. A., Phillips, B. A., & Kandler, O. (1983). *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *Journal of General Microbiology*, *129*(Pt. 11), 3427–3431.
- Çon, A. H., Gökalp, H. Y., & Kaya, M. (2001). Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science*, *59*, 437–441.
- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, *43*, 164–167.
- de Castro, A., Montano, A., Casado, F. J., Sanchez, A. H., & Rejano, L. (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, *19*, 637–644.
- Eklund, T. (1984). The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*, *1*, 179–185.
- Farber, J. M. (1991). Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology—a review. *Journal of Food Protection*, *54*, 58–70.
- Gao, Y., Van Belkum, M. J., & Stiles, M. E. (1999). The outer membrane of Gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 4329–4333.
- Garneau, S., Martin, N. I., & Vederas, J. C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, *84*, 577–592.
- Hansen, J. N. (1994). Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*, 69–93.
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martnez, J. M., Rodriguez, J. M., Nes, I. F., et al. (2001). *Enterococcus faecium* P21: A strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiology*, *18*, 115–131.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, *59*, 171–200.
- Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, *44*, 525–532.
- Jay, J. M. (1986). *Modern food microbiology*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*, *46*, 233–244.
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, *70*, 337–349.
- Kong, S., & Davison, A. J. (1980). The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻, e⁻ and O²⁻ in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *204*, 18–29.

- Leroy, F., Foulquié Moreno, M. R., & De Vuyst, L. (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 235–240.
- Lindgren, S. E., & Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 7, 149–163.
- Liserre, A. M., Landgraf, M., Destro, M. T., & Franco, B. D. G. M. (2002). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. *Meat Science*, 61, 449–455.
- Lyon, W. J., & Glatz, B. A. (1991). Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 701–706.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., & Metaxopoulos, J. (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4 ± 2 °C. *Food Microbiology*, 20, 259–265.
- Mayr, R., Fricker, M., Maoz, A., & Scherer, S. (2004). Anti-listerial activity and biodiversity of cheese surface cultures: Influence of the ripening temperature regime *Europ. Food Research and Technology*, 218, 242–247.
- Montville, T. J., Winkowski, K., & Ludescher, R. D. (1995). Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal*, 5, 797–814.
- Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Pelaez-Martinez, M. C., & Hardisson de la Torre, A. (2002). Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Science*, 62, 237–243.
- Pantev, A., Kabadjova, P., Dalgalarondo, M., Haertle, T., Ivanova, I., Dousset, X., et al. (2002). Isolation and partial characterization of an antibacterial substance produced by *Enterococcus faecium*. *Folia Microbiology*, 47, 391–400.
- Piard, J. C., & Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71, 525–541.
- Piard, J. C., & Desmazeaud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72, 113–142.
- Podolak, P. K., Zayas, J. F., Kastner, C. L., & Fung, D. Y. C. (1996). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *Journal of Food Protection*, 59, 370–373.
- Saucier, L., Poon, A., & Stiles, M. E. (1995). Induction of bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* LV17. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 684–690.
- Snijders, J. M., van Logtestijn, J. G., Mossel, D. A. A., & Smulders, F. J. M. (1985). Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *Veterinary Quarterly*, 7, 277–282.
- Schöbitz, R., Zaror, T., Leon, O., & Costa, M. (1999). A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged meat. *Food Microbiology*, 16, 249–255.
- Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Carvalho, M. S., Elliott, J. A., Joyce, K., et al. (2004). *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1505–1510.
- Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A., & Klaenhammer, T. R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3613–3615.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 722–756.
- Tantillo, M. G., Di, P. A., & Novello, L. (2002). Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* as starter culture in dry sausages. *New Microbiology*, 25, 45–49.
- Teixeira, L. M., Merquior, V. L., Vianni, M. C., Carvalho, M. G., Fracalanza, S. E., Steigerwalt, A. G., et al. (1996). Phenotypic and genotypic characterization of a typical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 664–668.
- Villani, F., Mauriello, G., Aponte, M., Blaiotta, G., Pepe, O., & Moschetti, G. (2001). Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 430–439.
- Villani, F., Sannino, G., Moschetti, G., Mauriello, G., Pepe, O., Amodio-Cochieri, R., et al. (1997). Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages. *Food Microbiology*, 14, 555–566.
- Wagner, M. K., & Moberg, L. J. (1989). Present and future use of traditional antimicrobials. *Food Technology*, 43, 143–147.

2. Caractérisation et sélection de souches de *Lactobacillus sakei* isolées du saucisson sec fermier, en vue de leur utilisation comme ferments

Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis à « Food Microbiology » : **Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S. & Chevallier, I.** Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* species isolated from traditional dry-sausages for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology*, Sous-presse

1.1. Objectifs

L'objectif de ce sous-chapitre était de caractériser les 36 souches de *Lb. sakei* isolées au niveau de cet atelier et identifiées comme dominantes au niveau du produit (saucisson-1 semaine et saucisson-9 semaines). La caractérisation a porté sur certains critères technologiques recherchés généralement dans la fabrication du saucisson sec, mais aussi sur d'autres critères spécifiques à l'atelier étudié (température, concentration en sel utilisée, etc.) Le but étant de sélectionner un ferment à partir de la flore endogène à l'atelier de façon à maîtriser la fermentation et donc assurer une meilleure qualité hygiénique et technologique, tout en préservant la typicité du produit.

1.2. Résultats et discussion

Les 36 souches de *Lb. sakei* ont été caractérisées pour leur aptitude à se développer dans les conditions de fabrication du saucisson sec au niveau de l'atelier étudié (température, pH, taux de sel, etc.), à se développer rapidement, à acidifier rapidement le milieu et à produire des activités protéolytiques, ainsi que pour la présence du gène *KatA* codant pour une catalase hème-dépendante chez *Lb. sakei*. L'ensemble de ces résultats ainsi que ceux des activités antibactériennes obtenues dans la publication 4 ont été traités par une analyse multivariée intégrant des poids correspondant à l'importance du critère de sélection. Il en a résulté la sélection de 2 souches présentant un maximum de critères recherchés dans la production du saucisson sec et adaptés à cet atelier fermier. Ces deux souches, ou une d'elles, pourraient être utilisées en combinaison avec une ou 2 souches sélectionnées par l'Equipe de Microbiologie de la SRV (INRA-Theix) à partir des staphylocoques/*Kocuria* isolées au niveau de cet atelier fermier, en l'occurrence *Staphylococcus equorum* (Morot-Bizot, 2005).

Parmi les résultats très intéressants obtenus lors de la caractérisation de ces 36 souches de *Lb. sakei*, nous avons noté une nette discrimination entre les souches isolées au niveau du

saucisson-9 semaines et les autres souches, principalement isolées au niveau du saucisson-1 semaine. En effet, les premières sont caractérisées par des temps de latence relativement longs par rapport aux dernières. Par contre, elles présentent des taux de croissance et d'acidification remarquablement supérieurs à ceux enregistrés pour les souches isolées du saucisson-1 semaine. Cette même tendance a été vérifiée aussi pour la tolérance au sel. La plupart des souches isolées du saucisson-9 semaines se développaient en présence de 6,5% NaCl après 3 jours d'incubation à 30°C, alors que peu de celles provenant du produit-1 semaine l'étaient. Ces résultats suggèrent une succession microbienne au cours de laquelle, une population spécifique de *Lb. sakei* se développent rapidement et met en place les mécanismes de fermentation avant qu'un deuxième type de *Lb. sakei* prenne la relève et domine complètement la flore microbienne du produit grâce à leurs taux de croissance élevés et leur meilleure adaptabilité à l'anaérobiose et à la diminution de l' a_w . Des résultats similaires ont été rapportés par Duthoit (2003), qui a décrit une succession microbienne au niveau des fromages de Salers.

Il faut noter que l'approche de sélectionner un ferment spécifique à chaque atelier est économiquement vouée à l'échec. Dans le cadre du projet sur la cartographie sensorielle des saucissons secs fermiers du Massif Central, Rason et al. (2004) ont établi une typologie des ateliers fermiers du Massif Central et suivant des critères de procédé de fabrication, six groupes ont été constitués. Cette classification a été retrouvée au niveau des données sensorielles obtenues sur les saucissons secs fermiers du Massif Central par cet atelier (Rason et al., 2003). Il serait donc envisageable de sélectionner un ferment par classe de producteurs et de produits. Certes, il pourrait y avoir une répercussion sur la typicité des produits. Toutefois, les pertes de typicité seraient moindres que si on les ferments du commerce étaient utilisés. De plus cette approche serait technico-économiquement faisable.

1.3. Conclusion

Les bactéries isolées d'un environnement donné sont bien adaptées à cet environnement ; d'où l'idée de produire un ferment à partir de la flore endogène de l'atelier. Les deux souches de *Lb. sakei* sélectionnées dans ce chapitre présentent des caractéristiques technologiques intéressantes in vitro. Néanmoins, ces souches en association avec des staphylocoques sélectionnés à partir de la flore endogène à cet atelier, doivent être testées sur des mêlées avant qu'elles puissent être validées comme ferments.

Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures

Salim Ammor^a, Eric Dufour^a, Monique Zagorec^b, Stéphane Chaillou^b,
Isabelle Chevallier^{a,*}

^aUnité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires, ENITA-CF, Site de Marmilhat, 63370, Lempdes, France

^bUnité Flore Lactique et Environnement Carné, INRA, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Received 2 August 2004; received in revised form 23 November 2004; accepted 23 November 2004

Abstract

A total of 36 *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage, produced without the use of starter cultures, were characterized in respect to their technological properties, i.e. growth and acidification kinetics, ability to grow at different temperatures, pH values or salt concentrations, gas production from glucose, heme-dependent catalase activity, inhibitory activity against pathogens and proteolytic and lipolytic activities.

Growth rates were comprised between 0.12 and 0.55 gen/h; while acidification rates varied from 0.01 and 0.07 pH unit/h. All isolates were able to grow at pH 4.2–9.6 and at 15 °C on acetate agar supplemented with 4% NaCl, but were not able to grow at 0 and 45 °C and with 10% NaCl in the same pH conditions. However, 97% of the isolates were able to grow at 4 °C, but only 11%, and 55% were able to grow at pH 3.9 and with 6.5% NaCl, respectively. All isolates were homofermentative from glucose. Heme-dependant catalase activity was found for 97% of the isolates and 3% displayed antibacterial activity against *Listeria innocua*. Most isolates showed leucine and valine arylamidase and only one exhibited a lipase (C14) activity.

Two strains were selected using a multi-variate analysis. Both of them showed a panel of properties highly desirable in sausage fermentation. We propose the use of these strains, in combination with coagulase-negative staphylococci as starter cultures in the studied small-scale facility in order to improve and standardize sausage safety and quality while preserving their typicality.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Lactic acid bacteria; *Lactobacillus sakei*; Traditional dry sausage; Meat small-scale facility; Starter culture; Typicality; Selection; Characterization

1. Introduction

Traditional fermented food products of meat origin are produced by numerous small-scale and family sized processing units in Europe. Their fermentation relies on natural contamination by environmental flora. This contamination occurs during animal slaughtering and increases during manufacturing. Fermentation is not controlled. Each small-scale facility has a specific house

flora composed of useful micro-organisms for the fermentation and flavor of sausages, as well as of spoilage and pathogenic flora.

The diversity of natural resources, traditions, competition, and income levels of the agricultural sector are emphasized by the European Union in Agenda 2000 (Commission of European Communities, 1999). However, both consumer demand and the framework of the application of regulations, laws and regulatory bodies impose limits on practice, ensuring that safe products are delivered. Food safety is a top priority for the European Community, as indicated in the White Paper on Food Safety (Commission of European

*Corresponding author. Tel.: +33 4 7398 1393;
fax: +33 4 7398 1390.

E-mail address: chevallier@enitac.fr (I. Chevallier).

Communities, 2000), and it is regulated by Commission of European Communities directive 93/43/CEE (Council of the European Communities, 1993). Therefore, traditional fermented food products producers have the obligation to deliver safe products. Likewise, most of decontaminating solutions used for sanitization of processing equipments and environmental surfaces are harsh, killing most of the micro-organisms including those that might have a positive function such as fermentation or inhibition of undesired bacteria. For traditional fermented products, the destruction of the typical house flora may thus lead to manufacturing problems and significant losses of flavor and typicality of these products (Ammor et al., 2004a).

Improving traditional dry sausage safety and typicality may be achieved by the conjunction of two approaches. First, by the introduction of selective decontaminating procedures targeted towards spoilage and pathogenic bacteria, but preserving technological flora (Ammor et al., 2004a), second, by the addition of starter cultures specially selected from the small-scale facility house flora in order to control the fermentation process and thus to improve products safety and technological quality, while preserving their typicality.

According to the definition of Hammes (1996), meat starter cultures are 'preparations which contain living or resting micro-organisms that develop the desired metabolic activity in the meat'. They are, by definition, used to change the sensory properties of the food. In meat fermentations, lactic acid bacteria (LAB) have generally three different purposes, namely (i) to improve safety by inactivating pathogens, (ii) to improve the product stability and shelf life by inhibiting undesirable changes brought about by spoilage micro-organisms or abiotic reactions, and (iii) to provide diversity by the modification of raw material to obtain new sensory properties (Lücke, 2000). For the last purpose, other micro-organisms than LAB, namely, catalase-positive cocci (*Staphylococcus*, *Kocuria*), yeasts (*Debaromyces*) and moulds (*Penicillium*) are involved in the production and stability of the desired sensory properties (Lücke, 2000).

LAB originating from fermented meats are particularly well adapted to the ecology of meat fermentation (Hugas and Monfort, 1997). Thus, meat starter cultures should be selected from these meat LAB. The first stage in the starter culture designing process is to characterize LAB isolated from the given meat products, in order to select the best strains. We recently investigated the microbial flora of a small-scale sausage production unit, and showed that among LAB, *Lactobacillus sakei* was the predominant species present in meat (Ammor et al., 2004b). Therefore, the aim of this study is to characterize and select *L. sakei* strains showing the best technological properties, amongst those isolated from a traditional dry sausage production unit without the use of commercial starter cultures.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The 36 *L. sakei* strains used for the study were isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausage without addition of starter cultures. These isolates were collected by Chevallier et al. (2001) and genotypically identified by Ammor et al. (2004b) as belonging to the *L. sakei* species. Among these isolates 16 (E1L-20–35) and 19 (E1L-1–16) were originating from sausage after 1 (S1W) and 9 (S9W) weeks, respectively, of processing, and one (E1L-36) had been isolated from knife (K) (Chevallier et al., 2001). Bacteria were kept frozen at -20°C in MRS broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 10% glycerol.

Listeria innocua ATCC 33090 and *Staphylococcus aureus* E1S-5, a strain isolated from the same small-scale facility, were grown in BHI medium and used as indicator micro-organisms to test antagonistic activity of *L. sakei* strains. An agar well diffusion assay (Schillinger and Lücke, 1989) was used for this purpose.

2.2. Growth and acidification kinetics

Growth and acidification kinetics of *L. sakei* strains were tested in SB medium designed for simulating some technological conditions of sausage manufacturing. The SB medium contained 10% meat extract (Biokar Diagnostics), 2% D-glucose (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), 2.5% NaCl (Merck-eurolab, Briave le Canal, France) and 1% bactotryptone (BD, Le Pont de Claix, France). The pH of the medium was adjusted to 6.5.

Each isolate was propagated overnight in MRS broth at 30°C . Cells were first grown 6 h in 15 ml MRS broth at 30°C and then inoculated (1% inoculum) to 15 ml MRS broth and incubated at 30°C . The optical density (OD) of each culture was followed at 600 nm with a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian, Australia). When bacterial suspensions reached an OD_{600} value of 0.55 ± 0.02 , a defined volume was used to inoculate 75 ml of SB broth to obtain an $\text{OD}_{600} = 0.05$. Cells were incubated at 15°C and the temperature recorded in the studied small-scale facility. OD_{600} and pH values were recorded after 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, and 48 h of incubation. pH values were recorded using a microelectrode (SenTix, WTW, Germany). Experiments were performed twice and results are expressed as the mean value \pm standard deviation.

2.3. Characterization of physiological properties

Enzymic activities of *L. sakei* strains were assayed using the API ZYM galleries (BioMérieux, Montalieu-Vercieu, France) as described by the manufacturer.

Growth at different temperatures was observed after 3 days of incubation at 15 and 45 °C, or 5 days at 0 and 4 °C on MRS agar plates. Growth at different pH values was observed after 3 days of incubation at 30 °C on MRS agar plates adjusted with HCl (1N) or NaOH (1N) to pH 3.9, 4.2, 5.2, 9.0, and 9.6. Growth on acetate agar (AA) was observed after 3 days of incubation at 30 °C. Growth at different salt concentrations was observed after 3 days of incubation at 30 °C on MRS agar plates added with 4%, 6.5%, or 10% NaCl.

Gas production from glucose was determined in ADAC medium as described by Sperber and Swan (1976).

Except enzymic assay, which was performed once, experiments were performed in triplicate and the results are expressed as the mean value of the three experiments.

2.4. Detection of the presence of the *kata* gene

L. sakei strains were screened by PCR for the presence of the *kata* gene, encoding heme-dependent catalase. The following specific primers were used for this purpose: 702-F (AATTGCCTTCTTCCGTGTA, position 551–536) and 310-R (AGTTGCGCACAAT-TATTTTC, position 127–139). These primers were designed based on the published sequence of the catalase gene *kata* of *Lactobacillus sakei* LTH 677 (Knauf et al., 1992). Chromosomal DNA used for PCR amplification was prepared by the method of Anderson and McKay (1983). PCR reactions were performed in PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Massachusetts, USA) in a total volume of 25 µl containing 1 × PCR buffer + NH₂SO₄ (MBI Fermentas, Mundolsheim, France), 1.5 mmol/l MgCl₂ (MBI Fermentas), 0.2 mmol⁻¹ of each dNTP (MBI Fermentas), 0.8 µmol/l of each primer (Sigma-Genosys, Cambridge, UK), 2U of *Taq* DNA polymerase (MBI Fermentas) and 1 µg/ml of DNA. The amplification consisted in an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles (denaturation at 94 °C, 1 min; primer annealing at 56 °C, 1 min; primer extension at 72 °C, 1 min), a final extension step at 72 °C, and cooling to 4 °C for 7 min. Negative controls without DNA template were included in parallel. Four microliters of the PCR products were submitted to electrophoresis at 100 V/cm for 1 h on a 1.5% agarose gel (Qbiogene, Illkirch, France) in 0.5 × Tris-acetate-EDTA buffer stained with 1.3 mmol/l of ethidium bromide (Qbiogene). A 100-bp DNA ladder (JulesTM, Qbiogene) was used as molecular size marker.

2.5. Statistical analysis

A principal component analysis (PCA) was applied to growth and acidification data obtained for all *L. sakei* isolates. Alternatively, an Agglomerative Hierarchical

Clustering (AHC) was used to select the *L. sakei* isolates that can play the role of meat starter cultures. The computer software used was XLSTAT (Addinsoft, Paris, France).

3. Results and discussion

3.1. Growth and acidification kinetics

Table 1 summarizes growth and acidification properties of each isolate. Growth lag phase was comprised between 14 and 22 h; while acidification lag phase was about 22 h for most of the isolates. Growth rates were comprised between 0.12 and 0.55 generation per hour; while acidification rates varied from 0.01 to 0.07 pH unit per hour. The OD₆₀₀ reached after 48 h extends from 0.25 to 0.78; while the pH values reached 4.84–5.57. A correlation was observed between the final OD reached after 48 h incubation and pH value.

A normalized PCA was carried out on growth and acidification parameters data. Results are shown in Fig. 1. The PC 1 which took into account 62.4% of the total variance discriminates between strains isolated from the final product (S9W), and those from both S1W (sausage after 1 week of fermentation process) and from the knife. Strains belonging to the S9W group were characterized by a longer growth lag phase, but exhibited the fastest growth and acidification rates. This observation suggests a possible succession of several types of *L. sakei* populations. A first population would set-up the fermentation process while a second would ensure and monitor the process.

3.2. Physiological characterization

The ability of the 36 isolates to grow at different salt concentrations (4%, 6.5%, and 10%), temperatures (0, 4, 15, and 45 °C), pH values (3.9, 4.2, 5.2, 9, and 9.6), and on AA medium, as well as gas production from glucose are reported in Table 2. All isolates were able to grow on acetate medium, at 15 °C, at pH 4.2, 5.2, 9 and 9.6, and in the presence of 4% NaCl. In contrast, none could grow at 0, 45 °C and with 10% NaCl. Gas production from glucose was not detected with any isolate. Differences were observed in only three conditions: growth at 4 °C, with 6.5% NaCl, or at pH 3.9. Indeed, of the 36 isolates only one did not show any detectable growth at 4 °C, 16 did not grow with 6.5% NaCl, and only four were able to grow at pH 3.9. Similar results have been reported by Papamanoli et al. (2003) who showed that among 49 *L. sakei* strains isolated from traditional dry sausages, 88% were able to grow at 4 °C, 100% at 15 °C, 35% at 45 °C, 0% at pH 4.0 and 80% with 6.5% NaCl.

Table 1
Growth and acidification kinetics parameters of *L. sakei* isolates

Strain name	Origin	G_L (h)	G_K (gen/h)	OD 48 h	A_L (h)	A_K (pH unit/h)	pH 48 h
E1L-1	S9W	22±0	0.44±0.01	0.63±0.06	22±0	0.03±0.01	5.33±0.02
E1L-2	S9W	20±0	0.26±0.01	0.33±0.06	22±0	0.06±0.00	4.86±0.02
E1L-3	S9W	22±0	0.25±0.09	0.54±0.03	22±0	0.03±0.01	5.12±0.00
E1L-4	S9W	22±0	0.38±0.05	0.55±0.10	22±0	0.05±0.01	4.90±0.03
E1L-5	S9W	22±0	0.32±0.04	0.33±0.03	22±0	0.04±0.00	4.92±0.00
E1L-6	S9W	21±1	0.30±0.04	0.42±0.06	22±0	0.03±0.01	5.17±0.01
E1L-7	S9W	21±1	0.43±0.02	0.39±0.01	22±0	0.04±0.00	5.00±0.04
E1L-8	S9W	22±0	0.55±0.09	0.50±0.07	22±0	0.03±0.00	5.18±0.02
E1L-9	S9W	22±0	0.41±0.02	0.52±0.02	22±0	0.05±0.00	5.09±0.09
E1L-10	S9W	22±0	0.27±0.07	0.53±0.00	22±0	0.04±0.00	5.34±0.02
E1L-11	S9W	22±0	0.33±0.02	0.55±0.02	22±0	0.04±0.00	5.18±0.06
E1L-12	S9W	22±0	0.34±0.04	0.34±0.05	22±0	0.05±0.00	4.88±0.01
E1L-13	S9W	22±0	0.23±0.01	0.42±0.02	22±0	0.05±0.00	4.84±0.04
E1L-14	S9W	21±1	0.19±0.06	0.55±0.02	22±0	0.05±0.00	4.92±0.01
E1L-15	S9W	22±0	0.30±0.03	0.44±0.07	22±0	0.02±0.01	4.97±0.05
E1L-16	S9W	22±0	0.17±0.05	0.29±0.01	22±0	0.05±0.00	4.89±0.03
E1L-17	S9W	20±0	0.22±0.02	0.45±0.01	22±0	0.04±0.00	5.18±0.00
E1L-18	S9W	22±0	0.31±0.09	0.30±0.01	22±0	0.03±0.01	5.18±0.01
E1L-19	S9W	22±0	0.31±0.00	0.25±0.06	22±0	0.07±0.01	4.90±0.03
E1L-20	S1W	19±1	0.14±0.02	0.78±0.02	20±0	0.02±0.00	5.36±0.01
E1L-21	S1W	15±1	0.17±0.00	0.73±0.00	22±0	0.03±0.00	5.40±0.01
E1L-22	S1W	14±0	0.15±0.00	0.78±0.01	22±0	0.03±0.00	5.37±0.02
E1L-23	S1W	20±0	0.12±0.00	0.71±0.00	19±1	0.02±0.00	5.55±0.04
E1L-24	S1W	17±1	0.15±0.00	0.78±0.00	22±0	0.04±0.00	5.25±0.01
E1L-25	S1W	16±0	0.15±0.01	0.73±0.03	22±0	0.03±0.00	5.40±0.02
E1L-26	S1W	18±0	0.14±0.00	0.72±0.02	21±1	0.04±0.01	5.33±0.02
E1L-27	S1W	16±0	0.16±0.01	0.74±0.01	20±0	0.03±0.00	5.36±0.03
E1L-28	S1W	18±0	0.16±0.01	0.54±0.00	22±0	0.02±0.00	5.72±0.00
E1L-29	S1W	16±0	0.14±0.01	0.77±0.02	22±0	0.04±0.00	5.35±0.00
E1L-30	S1W	17±1	0.12±0.01	0.75±0.01	22±0	0.04±0.00	5.37±0.01
E1L-31	S1W	17±1	0.17±0.01	0.75±0.00	22±0	0.03±0.00	5.30±0.00
E1L-32	S1W	18±0	0.15±0.02	0.72±0.03	20±0	0.02±0.00	5.30±0.01
E1L-33	S1W	15±1	0.17±0.02	0.72±0.01	18±0	0.03±0.00	5.57±0.01
E1L-34	S1W	18±0	0.20±0.01	0.63±0.03	20±0	0.03±0.00	5.31±0.00
E1L-35	S1W	19±1	0.16±0.00	0.74±0.03	22±0	0.01±0.00	5.36±0.00
E1L-36	K	18±0	0.16±0.01	0.77±0.00	22±0	0.03±0.00	5.07±0.02

G_L : growth lag phase; G_K : growth rate; OD 48 h: optical density reached after 48 h; A_L : acidification lag phase; A_K : acidification rate; pH 48 h: pH value reached after 48 h; S9W: sausage after 9 weeks of processing; S1W: sausage after 1 week of processing; and K: Knife. Values are expressed as the mean±standard deviation from two independent experiments.

Moreover, it is interesting to note that most of the isolates collected from S9W were able to grow with 6.5% NaCl, while most of those collected from SW1 were not able to grow with this salt concentration. This might result from a selection of strains resistant to the high salt concentration during sausage processing. NaCl-sensitive strains, present at the beginning of the process, would stop growing when NaCl concentration becomes too high. This is in agreement with the hypothesis that different strain populations are developed at different stage of the fermentation process. Therefore, tolerance to NaCl is a major factor for choosing strains as starter culture in dried fermented products (Rovira et al., 1997).

3.3. Detection of the *katA* gene encoding catalase

Hydrogen peroxide can interfere with organoleptic properties of fermented meat products leading to rancidity and discoloration of the final product. *L. sakei* has been reported to possess a heme-dependent catalase, which can be active in meat products as these substrates contain abundant heme sources (Hertel et al., 1998). Catalase hydrolyses hydrogen peroxide (Lücke, 1985). This activity is thus considered as a desired property for starter cultures.

L. sakei isolates were screened for the presence of the *katA* gene. DNA fragments were amplified from chromosomal DNA with specific primers. For all isolates, but E1L-6, a PCR product of the expected size

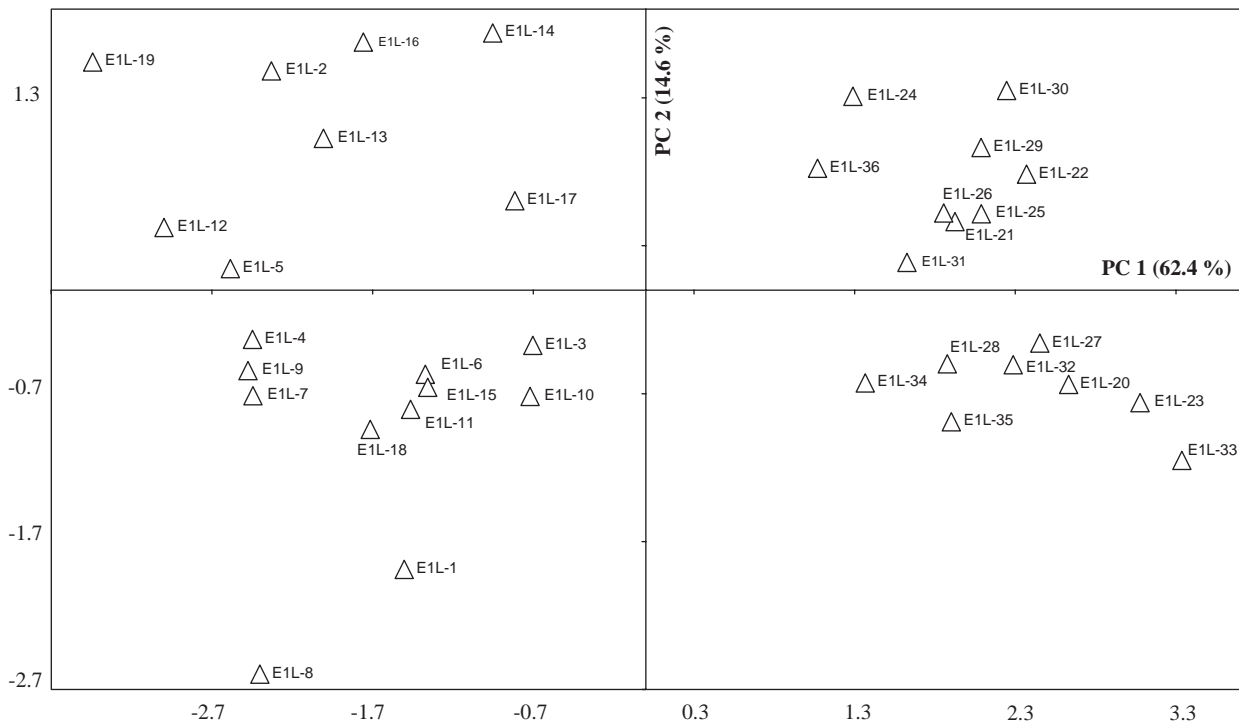


Fig. 1. Principal components analysis similarity map determined by principal components 1 and 2 for growth and acidification kinetics parameters data of *L. sakei* isolates.

(410 bp, see Fig. 2) was obtained, suggesting the presence of a *katA* gene in most strains.

3.4. Antagonistic activity against *L. innocua* and *S. aureus*

LAB originally isolated from traditional sausages are probably the best candidates for improving the microbiological safety of these products, because they are well adapted to the conditions encountered in sausages and should therefore be more competitive than LAB from other sources. We looked for antagonistic activities of *L. sakei* isolates against *L. innocua* ATCC 33090 and *S. aureus* E1S-5.

Of the 36 isolates considered, only 1 was found to exhibit antibacterial activity against *L. innocua* ATCC 33090. No isolate was able to inhibit *S. aureus* E1S-5. Similar results were obtained by Rovira et al. (1997) who showed that among 119 *L. sakei* investigated, only three species displayed inhibitory activity against *L. monocytogenes*. However, Papamanoli et al. (2003) reported that all 49 *L. sakei* investigated displayed antibacterial activity against *L. monocytogenes* and 75% against *S. aureus*.

3.5. Enzymic activities

Most *L. sakei* isolates showed leucine and valine arylamidase. However, no isolate showed cystine

arylamidase and one of them displayed trypsin and α -chymotrypsin activities. The degradation of amino acids into volatile molecules plays a putative role in flavor development of dry sausage. Aldehydes, alcohols and acids, which have very low threshold values, result from the degradation of leucine, valine, phenylalanine and methionine (Montel et al., 1998). Proteolytic activity (proteinase and aminopeptidase activities) has been demonstrated for some *L. sakei* during the ripening process of fermented sausage (Fadda et al., 1999). Nevertheless, it seems difficult to establish the microbial role and the enzymic role of this accumulation of protein catabolism products (Champomier-Vergès et al., 2002).

Lipolytic activities of esterase (C4), esterase lipase (C8) and lipase (C14) were not detected for all isolates, but for E1L-31, which showed a lipase (C14) activity. These results differ with those of Papamanoli et al. (2003) who showed that 31% of the 49 *L. sakei* isolates investigated exhibited a lipolytic activity. Montel et al. (1998) reported that *Lactobacillus* species are weakly lipolytic. Moreover, bacterial lipases seem to be ineffective under conditions that prevail during fermentation of dry sausages (Demeyer et al., 2000).

Acid phosphatase and phosphohydrolase activities were shown for most isolates and only one isolate exhibited alkaline phosphatase. Similar results were reported by Papamanoli et al. (2003).

Only 16% of the isolates showed β -galactosidase activity, 3% β -glucuronidase activity, 3% α -glucosidase

Table 2
Physiological traits of *L. sakei* isolates

Isolate	Temperature				pH					[NaCl]			AA	CO ₂
	0 °C	4 °C	15 °C	45 °C	3.9	4.2	5.2	9	9.6	4%	6.5%	10%		
E1L-1	–	+	+	–	–	+*	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-3	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-4	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-5	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-6	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-7	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+*	–	+	–
E1L-8	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-9	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-10	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+*	–	+	–
E1L-11	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-12	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-13	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-14	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-15	–	+	+	–	–	–*	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-16	–	+	+	–	–	+*	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-17	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-18	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+*	–	+	–
E1L-19	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-20	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-21	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-22	–	+	+	–	+*	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-23	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-24	–	+	+	–	+*	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-25	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-26	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-27	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-28	–	–	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-29	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-30	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-31	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-32	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-33	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-34	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–
E1L-35	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
E1L-36	–	+	+	–	–*	+	+	+	+	+	+	–	+	–

–: Negatif result; –*: one of the three assays is positive; +*: two of the three assays are positive; and +: positive result.

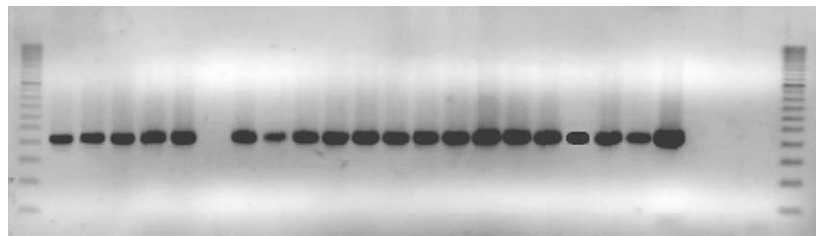


Fig. 2. PCR products obtained from *L. sakei* isolates with primers specific for the *katA* gene (702-F/310-R) (M, 100-bp DNA molecular weight marker; lane 1, E1L-1; lane 2, E1L-2; lane 3, E1L-3; lane 4, E1L-4; lane 5, E1L-5; lane 6, E1L-6; lane 7, E1L-7; lane 8, E1L-8; lane 9, E1L-9; lane 10, E1L-10; lane 11, E1L-11; lane 12, E1L-12; lane 13, E1L-13; lane 14, E1L-14; lane 15, E1L-15; lane 16, E1L-16; lane 17, E1L-17; lane 18, E1L-18; lane 19, E1L-19; lane 20, E1L-20; lane 21, *L. sakei* CIP 103139; lane 22, *Lb. curvatus* CIP 102992; lane 23, *Lb. farciminis* CIP 103136; and lane 24, negative control).

activity, 8% *N*-acetyl- β -glucosaminidase activity, and 6% α -mannosidase and α -fucosidase activities, respectively. Similar results were reported by Papamanoli et al.

(2003). It should be noted that Buckenüskes (1993) suggested that a lactose-negative phenotype is a selection criterion for LAB to be used as meat starter

cultures. However, the ability of *L. sakei* to use lactose may depend from a β -galactosidase or a phospho- β -galactosidase, the presence of which is strain dependent (Obst et al., 1992). Furthermore, it is interesting to note that all isolates did not show a melibiase activity while all, but E1L-26, showed melibiase-positive phenotype with the API 50CH gallery (data not shown) (Table 3).

3.6. Selection of *L. sakei* isolates for their use as meat starter cultures

In order to select the best *L. sakei* isolates, we incorporated into the technological parameters results

data, two virtual isolates representing the ‘best’ and the ‘worst’ LAB starter culture. The results attributed to each variable for the ‘best’ and ‘worst’ starter LAB were determined on the basis of selection criteria reported by Buckenüskes (1993) and Holzapfel (2002), i.e. (1) fast growth and high growth rate, (2) fast production of lactic acid and high acidification rate, (3) ability to grow at different temperatures, (4) ability to grow at different salt concentrations, (5) ability to grow at different pH values, (6) degradation of carbohydrate by homofermentative pathway, (7) catalase positive, (8) lactose negative, (9) formation of flavor and contribution to sensory attributes and (10) antagonistic activity against pathogens.

Table 3
Enzymic activities of *L. sakei* isolates

Isolate	Enzymic activities														
	2	5	6	7	9	10	11	12	14	15	16	18	19	20	
E1L-1	–	–	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	
E1L-2	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
E1L-3	–	–	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	
E1L-4	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-5	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-6	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-7	–	–	+	+	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	
E1L-8	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	+	+	
E1L-9	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-10	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-11	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-12	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-13	–	–	+	+	–	–	+	–	+	–	+	–	–	+	
E1L-14	–	–	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	
E1L-15	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-16	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-17	+	–	+	+	–	–	+	+	–	+	–	–	+	–	
E1L-18	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	
E1L-19	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-20	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-21	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-22	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-23	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	
E1L-24	–	–	+	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	
E1L-25	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-26	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-27	–	–	+	+	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	
E1L-28	–	–	+	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	
E1L-29	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	
E1L-30	–	–	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	
E1L-31	–	+	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	
E1L-32	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-33	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-34	–	–	–	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-35	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	
E1L-36	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	

2: Alkaline phosphatase; 5: lipase (C14); 6: leucine arylamidase; 7: valine arylamidase; 9: trypsin; 10: α -chymotrypsin; 11: acid phosphatase; 12: naphthol phosphohydrolase; 14: β -galactosidase (lactase); 15: β -glucuronidase (hyaluronidase); 16: α -glucosidase (maltase); 18: *N*-acetyl- β -glucosaminidase (chitinase); 19: α -mannosidase; 20: α -fucosidase.

Enzymic activities not detected in any isolates: 3: esterase (C4); 4: esterase lipase (C8); 8: cystine arylamidase; 13: α -galactosidase (melibiase); 17: β -glucosidase (cellulase).

Therefore, considering the ‘best’ LAB starter culture, G_L , A_L , and pH (48 h) values attributed to it were the minimum values of those recorded for all isolates, while G_K , A_K and OD (48 h) values were the maximum ones. A positive result was attributed to tests of growth at different temperatures, pH values, salt concentrations and on AA; presence of a *katA* gene; antagonism against *L. innocua*; antagonism against *S. aureus*; leucine, valine and cystine arylamidase; esterase (C4), esterase lipase (C8) and lipase (C14). A negative result was attributed to tests of gas production from glucose and β -galactosidase. Results of the ‘worst’ LAB starter culture were opposed to those of the ‘best’ one.

To perform an AHC, weights were attributed to each variable, i.e. selection criterion, as regards the importance of the criterion in the production of fermented sausages. The primary purpose of LAB starter cultures use in meat fermentation is to enhance the product safety and to extend its shelf life (Lücke, 2000). This can be achieved by the ability of LAB to reduce the pH and to produce antimicrobial compounds, namely bacteriocins. The ability to reduce pH, which is a result of carbohydrates conversion to lactic acid, is conditioned by the ability of the lactic bacterium to grow and to be competitive in the conditions of sausage manufacturing, i.e. salt concentration, manufacturing temperature and product acidity. Salt concentration is about 2% ($a_w = 0.94$ – 0.98) in the batter and can reach 15% ($a_w = 0.85$ – 0.86) in the final product (Lücke and

Hechelmann, 1987; Montel, 1999). Manufacturing temperature range from 4 to 7 °C when preparing the batter (Baracco et al., 1990) from 18 to 24 °C during the fermentation period (Montel, 1999) and from 12 to 15 °C during the drying period (Montel, 1999). The initial pH of the batter, which is generally about 6, decreases during the fermentation and reaches a values between 4.6 and 5.1. Thereafter, yeast, namely *Debaromyces hansenii*, regulates the acidity of the product (Cook, 1995) and the final pH ranges from 5.1 to 5.5 (Montel, 1999). Thus, the growth and acidification rates and lag phases and the growth at 4, 15 °C, pH 4.2, 5.2 and with 4%, 6.5% and 10% are limiting factors in the starter culture selection, a weight of 1 was attributed to each variable.

As mentioned above, safety improvement and shelf life extension can also be achieved by the production of bacteriocins. However, their influence in sausage appears to be limited because they are often bound to the matrix and are degraded by tissue proteases (Schillinger et al., 1996). Thus, antagonism against *L. innocua* and *S. aureus* was not a limiting factor but appreciable; a weight of 0.5 was attributed to each variable.

The *katA* gene, the homofermentative profile and the lactose-negative phenotype are factors improving the organoleptic quality of sausages; a weight of 0.5 was attributed to each variable.

As LAB are less proteolytic and only weakly lipolytic, in sausages, compared to catalase-positive cocci

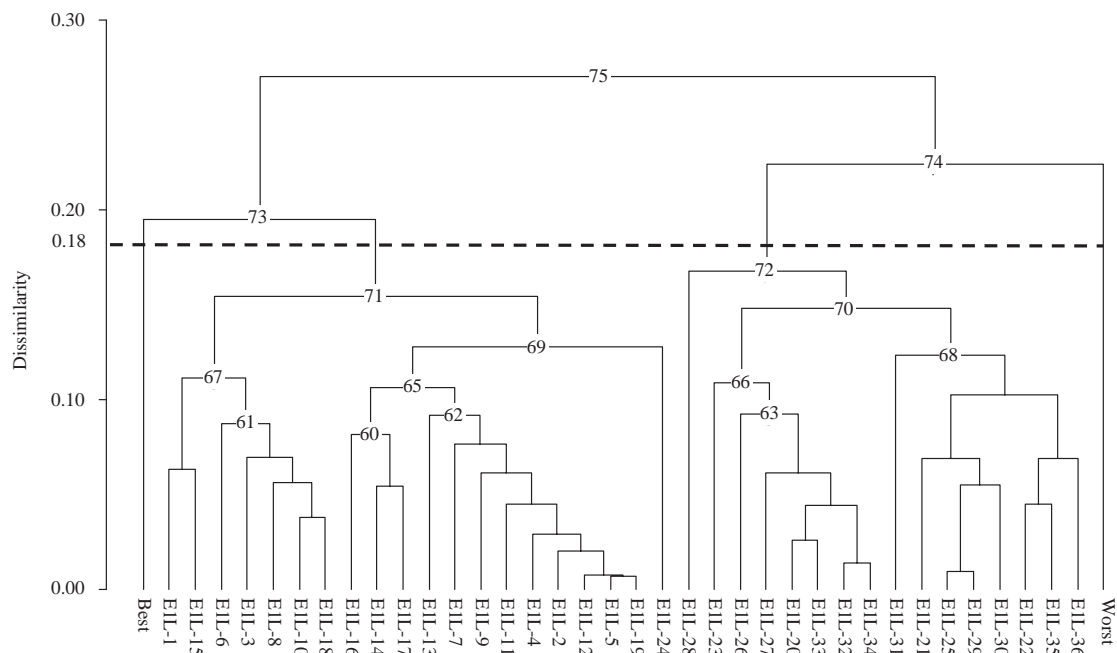


Fig. 3. Hierarchical clustering performed on the technological parameters data. Dashed bar shows level of statistical significance of the discrimination.

Table 4
Dissimilarity matrix of observations forming the node 73 (clusters 1 and 2; Fig. 3)

	Best	E1L-1	E1L-2	E1L-3	E1L-4	E1L-5	E1L-6	E1L-7	E1L-8	E1L-9	E1L-10	E1L-11	E1L-12	E1L-13	E1L-14	E1L-15	E1L-16	E1L-17	E1L-18	E1L-19	E1L-24
Best	0	0.61	0.52	0.63	0.53	0.52	0.60	0.59	0.62	0.55	0.63	0.58	0.51	0.62	0.58	0.58	0.58	0.58	0.61	0.51	0.59
E1L-1	0.61	0	0.21	0.11	0.14	0.17	0.20	0.24	0.15	0.21	0.10	0.11	0.18	0.29	0.22	0.06	0.18	0.21	0.12	0.18	0.34
E1L-2	0.52	0.21	0	0.13	0.06	0.04	0.21	0.13	0.20	0.13	0.15	0.11	0.03	0.12	0.07	0.16	0.11	0.08	0.14	0.03	0.25
E1L-3	0.63	0.11	0.13	0	0.11	0.13	0.17	0.21	0.11	0.17	0.06	0.07	0.14	0.20	0.13	0.11	0.21	0.13	0.08	0.14	0.28
E1L-4	0.53	0.14	0.06	0.11	0	0.03	0.21	0.12	0.16	0.08	0.12	0.05	0.03	0.15	0.08	0.14	0.15	0.12	0.13	0.04	0.26
E1L-5	0.52	0.17	0.04	0.13	0.03	0	0.19	0.10	0.17	0.10	0.13	0.07	0.01	0.13	0.09	0.13	0.12	0.10	0.11	0.01	0.28
E1L-6	0.60	0.20	0.21	0.17	0.21	0.19	0	0.22	0.07	0.14	0.12	0.17	0.19	0.29	0.27	0.20	0.30	0.23	0.10	0.19	0.40
E1L-7	0.59	0.24	0.13	0.21	0.12	0.10	0.22	0	0.19	0.14	0.17	0.15	0.10	0.09	0.19	0.21	0.21	0.20	0.15	0.11	0.24
E1L-8	0.62	0.15	0.20	0.11	0.16	0.17	0.07	0.19	0	0.09	0.07	0.12	0.17	0.28	0.23	0.16	0.28	0.21	0.06	0.17	0.37
E1L-9	0.55	0.21	0.13	0.17	0.08	0.10	0.14	0.14	0.09	0	0.13	0.11	0.09	0.21	0.15	0.21	0.21	0.17	0.15	0.10	0.31
E1L-10	0.63	0.10	0.15	0.06	0.12	0.13	0.12	0.17	0.07	0.13	0	0.07	0.14	0.24	0.17	0.13	0.24	0.16	0.04	0.14	0.31
E1L-11	0.58	0.11	0.11	0.07	0.05	0.07	0.17	0.15	0.12	0.11	0.07	0	0.08	0.19	0.12	0.14	0.19	0.11	0.08	0.08	0.26
E1L-12	0.51	0.18	0.03	0.14	0.03	0.01	0.19	0.10	0.17	0.09	0.14	0.08	0	0.13	0.09	0.14	0.12	0.11	0.11	0.01	0.28
E1L-13	0.62	0.29	0.12	0.20	0.15	0.13	0.29	0.09	0.28	0.21	0.24	0.19	0.13	0	0.10	0.23	0.14	0.12	0.23	0.13	0.15
E1L-14	0.58	0.22	0.07	0.13	0.08	0.09	0.27	0.19	0.23	0.15	0.17	0.12	0.09	0.10	0	0.20	0.09	0.05	0.20	0.09	0.19
E1L-15	0.58	0.06	0.16	0.11	0.14	0.13	0.20	0.21	0.16	0.21	0.13	0.14	0.14	0.23	0.20	0	0.13	0.21	0.11	0.14	0.37
E1L-16	0.58	0.18	0.11	0.21	0.15	0.12	0.30	0.21	0.28	0.21	0.24	0.19	0.12	0.14	0.09	0.13	0	0.10	0.23	0.12	0.27
E1L-17	0.58	0.21	0.08	0.13	0.12	0.10	0.23	0.20	0.21	0.17	0.16	0.11	0.11	0.12	0.05	0.21	0.10	0	0.16	0.10	0.18
E1L-18	0.61	0.12	0.14	0.08	0.13	0.11	0.10	0.15	0.06	0.15	0.04	0.08	0.11	0.23	0.20	0.11	0.23	0.16	0	0.12	0.34
E1L-19	0.51	0.18	0.03	0.14	0.04	0.01	0.19	0.11	0.17	0.10	0.14	0.08	0.01	0.13	0.09	0.14	0.12	0.10	0.12	0	0.28
E1L-24	0.59	0.34	0.25	0.28	0.26	0.28	0.40	0.24	0.37	0.31	0.31	0.26	0.28	0.15	0.19	0.37	0.27	0.18	0.34	0.28	0

(*Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*) (Montel et al., 1998), a weight of 0.25 was attributed to each variable.

The OD (48 h) and pH (48 h) values and the growth at 0, 45 °C, pH 3.9, 9 and 9.6 are not limiting factors but appreciable characters; a weight of about 0.1 was attributed to each variable.

As data were presented in quantitative and qualitative format in which correlation between variables was non-parametric, the analysis consisted of normalized non-parametric (Kendall) AHC using a strong linkage as aggregation method. When the increase in dissimilarity was strong, an automatic truncation stopped aggregating observations.

Fig. 3 presents the dendrogram obtained. Observations were clustered in four groups following a truncation at 0.18 of dissimilarity level. Group 1 encompassed by the ‘best’ LAB starter culture. Group 2 comprised the S9W isolates and the E1L-24 isolate. Group 3 contained the remaining S1W isolates and that from the knife. Finally, group 4 corresponded to the ‘worst’ LAB starter culture. Group 2 was not very distant from the first group, since both depend on node 73; but the difference remains noticeable. Alternatively, groups 3 and 4 depend on node 74. Thus isolates forming group 2 were less distant from the ‘best’ starter culture compared to those of group 3.

Considering groups 1 and 2, the dissimilarity matrix obtained (Table 4) showed that *L. sakei* isolates E1L-12 and E1L-19 were the less distant isolates from the ‘best’ starter culture. Indeed, they showed the lowest dissimilarity level (0.51) from the ‘best’ starter. E1L-2 and E1L-5 were also less distant showing dissimilarity levels of about 0.52.

These results indicate that *L. sakei* E1L-12 and/or E1L-19 could be used in the elaboration of starter cultures for this small-scale facility. A further investigation has to be performed to investigate the behavior of E1L-12, E1L-19, E1L-2 and E1L-5 in the presence of a selected coagulase-negative staphylococci, namely *S. equorum* also isolated from the same small-scale facility. Indeed, Morot-Bizot (2005) showed that *S. equorum* was the dominant catalase-positive cocci isolated from the same studied small-scale facility. This bacterium has been already reported as starter culture in cheese manufacturing (Place et al., 2003). Therefore, as technological flora, both the lactic bacterium and the catalase-positive cocci should coexist without antagonism. Challenge tests have to be also performed to investigate the behavior of these isolates as starter cultures in vivo.

Acknowledgements

The authors thank Fayolle K., Lardon S. and Channonat M. for technical assistance.

References

- Ammor, S., Chevallier, I., Laguet, A., Labadie, J., Talon, R., Dufour, E., 2004a. Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 21, 11–17.
- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E., Chevallier, I., 2004b. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food*

- Microbiol. submitted for publication. doi:10.1016/j.fm.2004.11.005.
- Anderson, D.G., McKay, L.L., 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 549–552.
- Baracco, P., Durand, P., Frentz, J.C., Jacquet, B., Zert, P., et al., 1990. *Encyclopédie de la charcuterie*. Soussana, Paris, p. 845.
- Buckenüskes, H.J., 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 253–271.
- Champomier-Vergès, M.C., Chaillou, S., Cornet, M., Zagorec, M., 2002. *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Res. Microbiol.* 152, 839–848.
- Chevallier, I., Talon, R., Laguet, A., Labayle, S., Labadie, J., 2001. Application de la démarche d'écologie microbienne dirigée dans un atelier fermier charcutier (I): Inventaire de la flore de l'atelier et du produit. In: Tec, Doc (Eds.), *Proceeding of the 13rd Agoral meeting*. Lavoisier, Paris, pp. 213–218.
- Commission of European Communities, 1999. Europe's agenda 2000. Priority Publications Programme XD5 final version 31.8, Commission of European Communities, Brussels, Belgium.
- Commission of European Communities, 2000. White Paper on Food Safety. Commission of European Communities, Brussels, Belgium.
- Cook, P.E., 1995. Fungal ripened meats and meat products. In: Campbell-Platt, G., Cook, P.E. (Eds.), *Fermented Meats*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 110–129.
- Council of the European Communities, 1993. Directive 93/43/CEE, relative to the hygiene of the food products. *OJEC L175*, pp. 1–11.
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., ten Brink, B., Hagen, B., Montel, C., Zanardi, E., Murbrekk, E., Leroy, F., Talon, R., Chizzolini, R., Eerola, S., 2000. Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Res. Int.* 33, 171–180.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G., Toldra, F., 1999. Hydrolysis of Pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 578–584.
- Hammes, W.P., 1996. Qualitätsmerkmale von starterkulturen. In: Buckenhuskes, H. (Ed.), *Stuttgarter Rohwurstforum*. Gewürzmüller, Stuttgart, pp. 29–42.
- Hertel, C., Schmidt, G., Fischer, M., Oellers, K., Hammes, W.P., 1998. Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene *kata* of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1359–1365.
- Holzappel, W.H., 2002. Appropriate starter cultures technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 197–212.
- Hugas, M., Monfort, J.M., 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chem.* 59, 547–554.
- Knauf, H.J., Vogel, R.F., Hammes, W.P., 1992. Cloning, sequence, and phenotypic expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 832–839.
- Lücke, F.K., 1985. Fermented sausages, p. 41–83. In: Wood, B.J.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*, vol. 2. Elsevier, London, UK.
- Lücke, F.K., 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* 56, 105–115.
- Lücke, F.K., Hechelmann, H., 1987. Starter cultures for dry sausages and raw ham composition and effect. *Fleishwirtsch* 67, 307–314.
- Montel, M.C., 1999. Fermented meat products. In: Batt, C.A., Patel, P.D. (Eds.), *Fermented Foods*, *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London, pp. 744–753.
- Montel, M.C., Masson, F., Talon, R., 1998. Bacterial role in flavour development. *Meat Sci.* 49 (S1), S111–S123.
- Morot-Bizot, S., 2005. Maîtrise de la qualité des saucissons fermiers par les staphylocoques. Thèse de Doctorat de l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.
- Obst, M., Hehn, R., Vogel, R.F., Hammes, W.P., 1992. Lactose metabolism in *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 97, 209–214.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65, 859–867.
- Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R., Teuber, M., 2003. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., A starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 30–37.
- Rovira, A., Nieto, J.C., Rodriguez, A., Reguera, J.I., Gonzalez, Z., 1997. Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. *Microbiologia* 13, 201–208.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901–1906.
- Schillinger, U., Geisen, R., Holzappel, W.H., 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 158–164.
- Sperber, W.H., Swan, J., 1976. Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 990–991.

IV.- Amélioration de la qualité hygiénique de l'atelier étudié

1. Etude de l'effet bactéricide sélectif de solutions de décontamination sur des biofilms bactériens incluant des bactéries utiles, d'altération et/ou pathogènes

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication au journal « Food Microbiology » : **Ammor, S., Chevallier, I., Laguet, A., Labadie, J., Talon, R. & Dufour, E., 2004.** Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria. *Food Microbiology*, 21 (1), pp. 11-17.

1.1. Objectifs

Dans la publication 1, nous avons montré que les procédés de nettoyage et de désinfection utilisés par le producteur étaient destructifs pour toutes les flores, spécialement la flore lactique. La destruction de la flore d'intérêt technologique peut conduire à des problèmes de perte de typicité et même à des problèmes de fabrication. En se basant sur ce constat, nous avons essayé de sélectionner des solutions de désinfection pouvant détruire les bactéries d'altération et pathogène sans trop affecter la flore d'intérêt technologique. Par ailleurs, les bactéries existent généralement dans l'environnement attachées et formant des biofilms et sont plus résistantes sous cette forme sessile. L'effet sélectif des solutions de désinfections a été testé sur des biofilms formés de bactéries d'intérêt technologique, d'altération et pathogène toutes isolées de l'atelier étudié.

1.2. Résultats et discussion

Quatorze solutions désinfectantes combinant des effets alcalin, acide, osmotique et/ou biocide ont été appliquées à des biofilms artificiels mono-espèce d'*Ec. faecium* (espèce lactique identifiée comme dominante au niveau des surfaces et du matériel de l'atelier, voir publication 2) (mentionnée comme *Lactobacillus* spp. dans l'article étant donné l'absence d'identification précise au moment de déroulement de ces expérimentations) *Sc. carnosus* (staphylocoque à coagulase-négative recherché dans la production du saucisson sec),

Pseudomonas fluorescens et *Pseudomonas putida* (représentant la flore d'altération) et *L. monocytogenes* (représentant la flore pathogène).

Les résultats ont montré que les solutions alcalines avaient des effets délétères sur toutes les bactéries étudiées. Le « bactégil », utilisé comme désinfectant dans l'atelier d'étude, s'est avéré inefficace contre les bactéries à Gram-négatif, alors qu'il a largement inhibé la flore à Gram-positif, notamment celle d'intérêt technologique. La solution d'acide acétique à pH 5,4 contenant 0,075% p/v de monolaurine s'est montrée la plus sélective. La solution composée de sulfate de sodium (12%) et de monolaurine (0,075% p/v), ainsi que la solution d'acide acétique à pH 5,4 se sont aussi montrées sélectives, mais à moindre échelle que la première. Ces 3 solutions, ainsi qu'une solution d'acide acétique à pH 5,2, ont été testées sur des biofilms multi-espèces composés de 7 espèces bactériennes (les 5 précédemment mentionnées, 1 *Ec. faecium* et 1 *H. alvei*) afin d'étudier leur effet sur la communauté microbienne trouvée dans l'atelier de l'étude. Les résultats obtenus ont confirmé la sélectivité de la solution d'acide acétique à pH 5,4 contenant 0,075 p/v de monolaurine. La plus importante résistance de *L. monocytogenes* en biofilm pluri-espèces qu'en biofilm mono-espèce a aussi été confirmée durant cette étude.

Notons par ailleurs, une différence de comportement entre les 2 souches d'*Ec. faecium* en condition de biofilms multi-espèces vis-à-vis des solutions décontaminantes. Ce-ci pourrait s'expliquer par un effet souche.

1.3. Conclusion

La solution d'acide acétique à pH 5,4 contenant 0,075 p/v de monolaurine pourrait constituer une solution de désinfection sélective pour cet atelier fermier. Toutefois, il est important d'étudier les modalités d'utilisation de cette solution dans cet atelier. En effet, l'efficacité de toute opération de désinfection est conditionnée par l'étape préalable de nettoyage.

Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility

2—Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria

Salim Ammor, Grégoire Tauveron, Eric Dufour, Isabelle Chevallier *

Unité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires, ENITA-CF, Site de Marmilhat, 63370 Lempdes, France

Received 28 August 2004; received in revised form 3 February 2005; accepted 7 February 2005

Abstract

The survival of *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* E1S-5 and/or *Hafnia alvei* E1E-25 in dual species biofilms with bacteriocin-like producing lactic acid bacteria (5 *Vagococcus carniphilus*, 3 *Enterococcus faecium*, 1 *Lactobacillus sakei* and 1 *Enterococcus* sp.) was investigated. The aim was to select strains able to repress the growth of undesirable bacteria in biofilms, i.e., the real mode of bacterial attachment.

Two *E. faecium* and 3 *V. carniphilus* species were highly antagonistic to *L. innocua*, *S. aureus* and *H. alvei* repressing their growth by reduction levels able to reach 2, 2.7 and 2.4 log₁₀ cfu/ml compared to the positive control made of sole the target microorganism. Furthermore, planktonic cells were more sensitive to the bacteriocin-like substances than sessile ones.

First results suggest the possibility of selecting bio-preservatives among the endogenous house flora of the studied small-scale facility, that could be implemented on the processing surfaces to repress the growth of undesirable microorganisms.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antibacterial activity; Lactic acid bacteria; Traditional dry sausages; Small-scale facility; Bacteriocins; Biofilms; Co-culture; Barrier flora

1. Introduction

Biofilms have been of considerable interest in the context of food hygiene. Of special significance is the ability of microorganisms to attach and grow on foods and food-contact surfaces under favourable conditions. Biofilm formation is a dynamic process and different mechanisms are involved in their attachment and growth

(Marshall, 1992). Extracellular polymeric substances play an important role in the attachment and colonization of microorganisms to food-contact surfaces (Marshall, 1992).

Various techniques have been adopted for the proper study and understanding of biofilm attachment and control. If the microorganisms from food-contact surfaces are not completely removed, they may lead to biofilm formation and also increase the biotransfer potential (Kumar & Anand, 1998). Therefore, various preventive and control strategies like hygienic plant lay-out and design of equipment, choice of materials, correct use and

* Corresponding author. Tel.: +33 4 7398 1393; fax: +33 4 7398 1390.
E-mail address: chevallier@enitac.fr (I. Chevallier).

selection of detergents and disinfectants coupled with physical methods can be suitably applied for controlling biofilm formation on food-contact surfaces (Kumar & Anand, 1998). In addition, bacteriocins and enzymes are gaining importance and have a unique potential in the food industry for the effective biocontrol and removal of biofilms. These newer biocontrol strategies are considered important for the maintenance of biofilm-free systems, and as consequence for quality and safety of foods (Kumar & Anand, 1998).

Bacteriocins are ribosomally synthesized, extracellularly released bioactive peptides or peptide complexes (usually 30–60 amino acids) which have a bactericidal or bacteriostatic effect on other (usually closely related) species (Garneau, Martin, & Vederas, 2002). In all cases, the producer cell exhibits specific immunity to the action of its own bacteriocin. Most bacteriocin biosynthesis occurs during or at the end of exponential growth (Tagg, Dajani, & Wannamaker, 1976). Bacteriocins are generally considered to act at the cytoplasmic membrane and dissipate the proton motive force through the formation of pores in the phospholipid bilayer (Montville, Winkowski, & Ludescher, 1995). Nisin is the best defined and the only purified bacteriocin produced by LAB that has been approved for use in food products (Hansen, 1994).

Numerous reviews have suggested that pathogens microorganisms in meat fermented foods may be inhibited by some bacteriocin-producing meat LAB (Foegeing, Thomas, Pilkington, & Klaenhammer, 1992; Laukova, Czikkova, Laczkova, & Turek, 1999; Tyoppinen, Markkula, Petaja, Suihko, & Mattila-Sandholm, 2003). However, few studies (Leriche, Chassaing, & Carpentier, 1999; Zhao, Doyle, & Zhao, 2002) focused on the application of bacteriocin-producing LAB to control the growth of pathogenic microorganisms in biofilms, i.e., the real mode of microbial attachment to processing surfaces and equipments.

Therefore, we report in this paper on the behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms with bacteriocin-like-producing LAB isolated from the same small-scale facility (except *L. innocua*). The aim was to investigate competitive interactions occurring in the small-scale facility microbial ecosystem between LAB and undesirable bacteria. The final goal was to select an endogenous barrier flora to pathogenic and spoilage bacterial adhesion for this small-scale facility.

2. Materials and methods

2.1. Strains and culture conditions

The 10 LAB (E1L-28, E1L-38, E1L-39, E1L-40, E1L-53, E1L-61, E1L-62, E1L-63, E1L-67 and E1L-69) in-

cluded in this study were isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages (Chevallier, Talon, Laguet, Labayle, & Labadie, 2001) and were identified in a previous study as 5 *Vagococcus carniphilus* (E1L-61, E1L-62, E1L-63, E1L-67 and E1L-69), 4 *Enterococcus faecium* (E1L-38, E1L-39, E1L-40 and E1L-53), and 1 *Lactobacillus sakei* (E1L-28) (Ammor et al., 2005). *V. carniphilus* species were shown to display antibacterial activity against *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* E1S-5 and *Hafnia alvei* E1E-25 also isolated from the same small-scale facility (except *L. innocua*) (Ammor, Tauveron, Dufour, & Chevallier, in press). *E. faecium* species E1L-38, E1L-39 and E1L-40 exhibited antibacterial activity against both *L. innocua* and *S. aureus*, while *E. faecium* E1L-53 was antagonistic to only *L. innocua* (Ammor et al., in press). Finally the *Lb. sakei* E1L-28 was antagonistic to *L. innocua* (Ammor et al., in press). All these LAB, but E1L-53, were characterized as bacteriocins-like-producing (Ammor et al., in press).

LAB were subcultured twice (1% inoculum, 24 h, 30 °C) in 15 ml MRS broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and kept frozen at –20 °C in MRS supplemented with 10% glycerol. *L. innocua* ATCC 33090, *S. aureus* E1S-5 and *H. alvei* E1E-25 were subcultured twice (1% inoculum, 24 h, 37 °C) in 10 ml BHI broth (Biokar Diagnostics) and kept frozen at –20 °C in BHI broth supplemented with 30% glycerol.

2.2. Inoculum preparation

Bacterial species were pre-cultivated twice and cultivated in BHI broth at 15 °C for 48 h. Serial dilutions were then performed in BHI broth to obtain approximate cells concentrations of 10⁷ cfu/ml for bacteriocin-like-producing LAB and about 10⁵ cfu/ml for indicator microorganisms. These cells concentrations were chosen on the basis of cells enumeration results obtained for LAB (on MRS agar), for *S. aureus* (on Baird–Parker agar) and for *H. alvei* (on VRBG agar) while describing the microbial ecosystem of the studied small-scale facility (Chevallier et al., 2001). Otherwise, 15 °C was considered as incubation temperature to simulate the temperature recorded in the studied small-scale facility (Chevallier et al., 2001).

2.3. Biofilm formation

Biofilms were grown according to the method of Ammor, Chevallier, Laguet, Labadie, and Talon (2004). Extra-thick fiberglass disks (diameter: 25 mm, Gelmann Sciences, Michigan, USA) were used as support matrix for biofilm growth. Disks were autoclaved at 121 °C for 15 min prior to use. Twelve disks per indicator microorganism and per assay were laid on Brain Heart Agar (BHA) for 1 h to allow their soaking with

nutrients. Twelve other disks per indicator microorganism and per assay were inoculated with 0.5 ml of bacterial culture. Among these 12 disks, 4 disks were considered as controls for the bacteriocin-producing lactic acid bacterium and 4 others as controls for the indicator microorganism. The last 4 disks were inoculated with mixture, at equal volume, of the bacteriocin-producing lactic acid bacterium and the indicator microorganism. After 5–10 min of contact allowing bacteria attachment, the inoculated disks were rinsed twice for 2 min with saline water (20 ml contained in a Petri plate) under gentle agitation (45 rpm/s) (Orbital agitator 43,000, J.P. Selecta, France) to remove unattached cells. After rinsing, the inoculated disks were placed on the sterile disks already laid on the nutritive medium and incubation was run at 15 °C for 3 days.

2.4. Cell enumeration

Enumeration of both species was performed at 0, 24, 48 and 72 h. The inoculated disks were rinsed for 2 min in a Petri dish containing 20 ml of tryptone salt broth (Biokar Diagnostics) under gentle agitation (60 rpm/s). Disks were then placed in a stomacher bag (AES Laboratoire, Combourg, France) containing 100 ml of tryptone salt broth and stomached with a Lab Blender 400 stomacher (Seward, UK) for 6 min. Decimal dilutions were then performed in saline solution (0.9% NaCl) and pour plated (1% inoculum) simultaneously onto MRS agar (pH 6) and onto the appropriate medium of the indicator microorganism (Baird–Parker for *S. aureus*, Palcam for *L. innocua* and VRBG for *H. alvei*). All these agar media were purchased from Biokar Diagnostics. Plating was performed in duplicate using an automatic spiral plater WASP (Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, UK) and plates were incubated for 48 h at 30 °C for LAB and at 37 °C for target microorganisms.

After incubation, enumeration was performed using the WASP colony counting system. The inhibitory effect of the bacteriocin-producing LAB was determined by comparing indicator microorganism cells counts from the control and from the dual species biofilm. Experiments were performed in duplicate and the results are displayed as the mean values.

2.5. Survival of indicator microorganisms in dual species planktonic cultures

Indicator microorganisms were investigated for their behaviour when co-cultivated with the bacteriocin-producing LAB in the planktonic form. Four bacteriocin-producing LAB (*E. faecium* E1L-38, E1L-39 and E1L-40 and *Lb. sakei* E1L-28) were co-cultivated with *Listeria innocua* ATCC 33090 or *Staphylococcus aureus* E1S-5 in dual species planktonic cultures.

Bacterial species were pre-cultivated twice and cultivated in BHI broth at 15 °C for 48 h. Serial dilutions were then performed in BHI broth to obtain approximate cells concentrations of about 10⁷ cfu/ml for bacteriocin-producing LAB and about 10⁵ cfu/ml for indicator microorganisms. Twelve flasks containing 100 ml of BHI broth were considered for each indicator microorganism and for each assay. They were inoculated with 0.5 ml of bacterial culture. Among these 12 flasks, 4 were considered as controls for the bacteriocin-producing LAB and 4 others as controls for the indicator microorganism. The last 4 flasks were inoculated with 0.5 ml mixture, at equal volume, of the bacteriocin-producing lactic acid bacterium and the indicator microorganism. Incubation was run at 15 °C for 3 days and enumeration was performed as described above. Experiments were performed in duplicate and the results are displayed as the mean values.

3. Results

3.1. Survival of *L. innocua* in dual species biofilms

Table 1 presents log₁₀-reductions of *L. innocua* populations following growth with *Lb. sakei*, *E. faecium* and *V. cariphilus* species in dual species biofilms. In all cases, *L. innocua* population decreased suggesting that antagonism was occurring between this bacterium and the lactic one.

Considering *Lb. sakei* E1L-28, the maximum log₁₀-reduction level of *L. innocua* population was observed within 24 h (0.5 log₁₀ cfu/ml). After 72 h of incubation, counts of *L. innocua* recorded in dual species biofilms were higher than those recorded for the control.

Table 1
Log₁₀-reduction of *L. innocua* populations in dual species biofilms

Hours	Lactic acid bacteria									
	E1L-28	E1L-38	E1L-39	E1L-40	E1L-53	E1L-61	E1L-62	E1L-63	E1L-67	E1L-69
0	0.1	0.0	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	-0.4	0.2	0.0
24	0.5	0.7	0.7	1.3	0.6	1.2	1.1	0.7	1.2	1.2
48	0.3	0.3	0.9	0.6	2.0	2.0	1.7	0.6	1.4	>2.0
72	-0.3	-0.2	0.5	0.1	>1.0	2.0	0.5	0.4	>1.1	1.4

Considering *E. faecium* species, the maximum reduction of *L. innocua* populations was observed in the presence of E1L-40 within 24 h ($1.3 \log_{10}$ cfu/ml). While E1L-53 showed the lowest \log_{10} -reduction level within 24 h ($0.6 \log_{10}$ cfu/ml), it was the most inhibitory of *L. innocua* after 48 and 72 h of growth (2.0 and $>1.0 \log_{10}$ cfu/ml, respectively). Within 72 h, counts of *L. innocua* were approximately equal or higher compared with those of the control in the presence of E1L-38 and E1L-40.

V. carniphilus species E1L69 and E1L-61 were highly antagonistic to *L. innocua* compared to *E. faecium* and *Lb. sakei* species. A reduction of $1.2 \log_{10}$ cfu/ml was observed within 24 h and $2 \log_{10}$ cfu/ml or higher after 48 h of growth. However, only E1L-61 was able to maintain a \log_{10} -reductions level of about $2 \log_{10}$ cfu/ml within 72 h. E1L-63 induced the lowest \log_{10} -reduction level of *L. innocua* populations recorded after 24, 48 and 72 h of incubation compared with other isolates belonging to *V. carniphilus* species.

In most cases, \log_{10} -reduction of *L. innocua* population recorded after 72 h of growth were the lowest compared to those recorded after 24 and 48 h of incubation.

3.2. Survival of *S. aureus* in dual species biofilms

E. faecium species were generally inefficient against *S. aureus* E1S-5 in dual species biofilms (Table 2). E1L-40 was the only one able to reduce slightly *S. aureus* population by $0.4 \log_{10}$ cfu/ml. In contrast, counts of *S. aureus* increased in the presence of E1L-39.

V. carniphilus species induced a low reduction of *S. aureus* population within 24 h (Table 2). However, they enhanced \log_{10} -reduction levels varying between 0.4 and $1.5 \log_{10}$ and between 0.9 and $2.7 \log_{10}$ within 48 and 72 h, respectively. E1L-62 was the most efficient after 48 h of growth, but 24 h after E1L-69 showed the most inhibitory effect.

3.3. Survival of *H. alvei* in dual species biofilms

V. carniphilus species were strongly antagonistic to *H. alvei*, with each bacterium providing greater than $2.4 \log_{10}$ cfu/ml differential within 24 h when compared with the control (Table 3). However growth repression of *H. alvei* decreased within 48 h and stabilized at

Table 3

\log_{10} -reduction of *H. alvei* populations in dual species biofilms

Hours	Lactic acid bacteria				
	E1L-61	E1L-62	E1L-63	E1L-67	E1L-69
0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
24	1.0	2.4	0.9	1.2	0.9
48	0.1	1.3	0.2	0.4	0.3
72	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7

$0.7 \log_{10}$ cfu/ml after 72 h of culture. E1L-62 was the most efficient isolate against *H. alvei*.

3.4. Comparison of competitive interactions in planktonic cultures and in biofilms

Table 4 summarizes \log_{10} -reduction levels of *L. innocua* population when grown in dual species planktonic cultures of *E. faecium* species E1L-38, E1L-39, E1L-40 and *Lb. sakei* E1L-28. *L. innocua* was much more sensitive to the presence of the bacteriocin-like-producing LAB in planktonic cultures than in biofilms. Levels of \log_{10} -reduction varied between 1.4 and $2.7 \log_{10}$ cfu/ml within 24 and 48 h, while they comprised between 0.3 and $0.9 \log_{10}$ cfu/ml in biofilms. After 72 h of incubation, target microorganisms were more resistant than within 24 and 48 h.

The same tendency was observed for *S. aureus* since \log_{10} -reduction levels comprised between 0.6 and $1.8 \log_{10}$ cfu/ml within 48 h of growth while they did not exceed $0.2 \log_{10}$ cfu/ml in biofilms (Table 5). Furthermore *L. innocua* was much more sensitive than *S. aureus* to the presence of the bacteriocin-like-producing LAB.

Table 4

\log_{10} -reduction of *L. innocua* populations in dual species planktonic cultures

Hours	Lactic acid bacteria			
	E1L-28	E1L-38	E1L-39	E1L-40
0	0.0	0.1	0.0	-0.1
24	2.0	2.1	1.4	2.3
48	1.6	2.7	2.2	2.4
72	0.9	1.6	1.4	1.9

Table 2

\log_{10} -reduction of *S. aureus* populations in dual species biofilms

Hours	Lactic acid bacteria							
	E1L-38	E1L-39	E1L-40	E1L-61	E1L-62	E1L-63	E1L-67	E1L-69
0	-0.1	-0.1	-0.6	0.1	-0.1	0.0	0.1	0.1
24	-0.1	-0.3	0.4	0.3	0.4	0.1	0.3	0.3
48	0.2	-0.6	0.1	1.1	1.5	1.0	0.4	1.0
72	0.0	-0.1	0.4	1.7	>2.2	0.9	1.3	2.7

Table 5
Log₁₀-reduction of *S. aureus* population in dual species planktonic cultures

Hours	Lactic acid bacteria		
	E1L-38	E1L-39	E1L-40
0	0.0	0.0	0.0
24	0.0	0.1	0.5
48	1.8	0.6	0.7
72	0.7	0.7	0.8

4. Discussion

L. monocytogenes and *S. aureus* are Gram-positive pathogens that have been involved in outbreaks of food-borne disease in which meat represented the incriminated foodstuff (Lindqvist et al., 2001; Sim et al., 2002). These microorganisms adhere and form biofilms on numerous surfaces (Luppens, Reij, van der Heijden, Rombouts, & Abee, 2002; Mafu, Roy, Goulet, & Magny, 1990). Biofilms may represent an important source of contamination for materials or foodstuffs coming into contact with them (Kusumaningrum, Riboldi, Hazeleger, & Beumer, 2003). Several reports have shown that sessile bacterial cells are more resistant to environmental changes and cleaning or disinfection treatments (Kumar & Anand, 1998). Therefore, there is a growing interest in this mode of growth in food processing that aim to improve the microbiological safety of food.

Biofilm control can be achieved by adopting several strategies like physical and chemical methods (Kumar & Anand, 1998), however, in the case of traditional fermented foods for which fermentation relies on natural contamination by the environmental flora, these strategies may led to inhibition or killing of the technological flora that ensure the fermentation and flavour of the traditional fermented product. In that case, the use of bacteriocin-producing LAB could play a role in controlling colonization by pathogenic and spoilage bacteria in food processing facilities.

Therefore, behaviours of *L. innocua*, *S. aureus* and *H. alvei* were investigated in artificially made biofilms of bacteriocins-like-producing LAB. Except *L. innocua*, all considered bacteria were isolated from the same small-scale facility. The aim of this study was to simulate competitive interactions in the small-scale ecological niche. To restrict the extent of acid production and investigate mainly the bacteriocin-like effect, low-glucose medium, i.e., BHI (0.2% glucose), was used. *L. innocua* was used instead of *L. monocytogenes* since the two microorganisms show similar physiological properties with the difference that the former does not belong to the pathogen species of *Listeria*. Moreover, some papers reported a greater sensitivity of *L. monocytogenes* towards some antibacterial compounds than *L.*

innocua (Çon, Gökalp, & Kaya, 2001; Mataragas, Drosinos, & Metaxopoulos, 2003).

L. innocua was sensitive to all considered LAB but at different levels. *Lb. sakei* showed the lowest log₁₀-reduction levels compared to *E. faecium* and *V. carniphilus* species. To our knowledge, it is the first report studying the interaction of a bacterinogenic *Lb. sakei* strain and *Listeria* in biofilms. Alternatively, the ability of enterococcal species to repress the growth of *L. monocytogenes* in biofilms was already reported by Zhao et al. (2002) who showed that 2 *E. durans* species isolated from floor drains inhibited by more than 5 log₁₀ cfu/cm² *L. monocytogenes* population within 24 h at 37 °C.

Levels of reduction decreased within 72 h confirming previous observations made by some authors who reported an immediate reduction of target cell population by 1 or 3 log cycles upon addition of bacteriocin, with little or no effect upon further incubation (Leriche et al., 1999). Maisnier-Patin, Deschamps, Emin, Grata-doux, and Richard (1995) reported that after the first contact with nisin, *L. monocytogenes* cells became resistant to a solution eight times more concentrated.

S. aureus was practically unaffected by the presence of *E. faecium* species, however in the presence of *V. carniphilus* species, log₁₀-reduction levels of this pathogenic bacterium population were able to reach 2.7 log₁₀ cfu/ml. *V. carniphilus* species were also found to be effective against *H. alvei*, the Gram-negative psychrotrophic spoilage bacterium most frequently isolated from meat and meat products (Castano, Garca Fontan, Fresno, Tornadijo, & Carballo, 2002).

Regarding results obtained in broth and in biofilms, planktonic cells of target microorganisms were more sensitive to bacteriocins-like than sessile ones. This is in confirmation with Carpentier and Cerf (1993) who reported that once attached to surfaces bacteria become more resistant to adverse environments.

Furthermore, results obtained in broth were somewhat surprising since all bacteriocin-like substances produced by the considered LAB were unsuccessfully researched in filtered supernatants (Ammor et al., in press). Logically, target microorganism populations would have to be unaffected by the presence of the bacteriocin-like-producing LAB. Since pH values of culture media never decreased below 5.2, the eventuality that the high level of organics acids produced by LAB was at the origin of inhibition was discarded and thus the hypothesis that bacteriocins-like were adsorbed by the filter was more credible than that of the inability to produce inhibitors in liquid culture. Testing different filter types (cellulose acetate, polyethylene sulfate) and pore-sizes (0.22 and 0.48 µm) characterized by a low-binding protein capacity resulted also in inactivation of supernatants residual activity. Thus, the bacteriocin-like substances were adsorbed by filters.

Regarding the results obtained, the use of *E. faecium* E1L-40 and E1L-53 is suggested to control the growth of undesirable microorganisms on material and environmental surfaces. This suggestion is strengthened by the fact that *E. faecium* species has been already suggested as starter cultures for fermentations (de Castro, Montano, Casado, Sanchez, & Rejano, 2002; Foulquie Moreno, Rea, Cogan, & de Vuyst, 2003; Leroy, Foulquie Moreno, & de Vuyst, 2003). However, further characterizations have to be done to be sure of the innocuity of these strains. *V. carniphilus* E1L-61, E1L-62 and E1L-69 also present strong antagonistic performances that could represent a further weapon, according to the hurdle concept, to fight against the settlement of undesirable bacteria on surfaces. However their use is conditioned by the assessment of their clinical significance.

Additional investigations have to be performed to look for the efficiency of these bacteriocin-like-producing LAB in multi-species biofilms. Indeed, Bourion and Cerf (1996) demonstrated the importance of an exopolymer-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* for enhancing the attachment of *L. innocua* and its protection from disinfectants. Thus bacterial response to adverse environments, namely antibacterial compounds, is surely different in mixed cultures than in dual cultures.

5. Conclusion

It was showed in this study that certain bacteriocin-like-producing LAB may repress the growth of some undesirable microorganisms in dual species biofilms and thus may be used as barrier flora against the settlement of these undesirable microorganisms on the processing surfaces equipment in meat small-scale facilities.

Acknowledgement

The authors acknowledge A. Laguet and K. Fayolle for technical assistance. We are also grateful for Sartorius S.A (Gottingen, Germany) for supplying us with different separation filters for free.

This work has been partly funded by AQS project, DGA contract R01/09, French Ministry of Agriculture.

References

Ammor, S., Chevallier, I., Laguet, A., Labadie, J., & Talon, R. (2004). Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria. *Food Microbiology*, *21*, 11–17.

Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, et al. (2005). Phenotypic and genotypic identification of

lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, *22*, 373–382.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (in press). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Journal of Food Control*, doi:10.1016/j.foodcont.2005.02.006.

Bourion, F., & Cerf, O. (1996). Disinfection efficiency against pure culture and mixed-population biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon and rubber. *Sciences des Aliments*, *16*, 151–166.

Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry: a review of the literature. *Journal of Applied Bacteriology*, *75*, 499–511.

Castano, A., Garca Fontan, M. C., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., & Carballo, J. (2002). Survival of Enterobacteriaceae during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage. *Food Control*, *13*, 107–115.

Chevallier, I., Talon, R., Laguet, A., Labayle, S., & Labadie, J. (2001). Application de la démarche d'écologie microbienne dirigée dans un atelier fermier charcutier (I). Inventaire de la flore de l'atelier et du produit. In *Proceeding of the 13th Agoral Meeting* (pp. 213–218). Dijon, France.

Çon, A. H., Gökcalp, H. Y., & Kaya, M. (2001). Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science*, *59*, 437–441.

de Castro, A., Montano, A., Casado, F. J., Sanchez, A. H., & Rejano, L. (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, *19*, 637–644.

Foegeding, P. M., Thomas, A. B., Pilkington, D. H., & Klaenhammer, T. R. (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*, 884–890.

Foulquie Moreno, M. R., Rea, M. C., Cogan, T. M., & de Vuyst, L. (2003). Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, *81*, 73–84.

Garneau, S., Martin, N. I., & Vederas, J. C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, *84*, 577–592.

Hansen, J. N. (1994). Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*, 69–93.

Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, *42*, 9–27.

Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, *85*, 227–236.

Laukova, A., Czikkova, S., Laczko, S., & Turek, P. (1999). Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornád salami. *International Journal of Food Microbiology*, *52*, 115–119.

Leriche, V., Chassaing, D., & Carpentier, B. (1999). Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, *51*, 169–182.

Leroy, F., Foulquie Moreno, M. R., & De Vuyst, L. (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *88*, 235–240.

Lindqvist, R., Andersson, Y., Lindback, J., Wegscheider, M., Eriksson, Y., Tidestrom, L., et al. (2001). One-year study of foodborne

- illnesses in the municipality of Uppsala, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 588–592.
- Luppens, S. B., Reij, M. W., van der Heijden, R. W., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2002). Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4194–4200.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., & Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53, 742–746.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Emin, P., Gratadoux, J. J., & Richard, J. (1995). Utilisation en technologie fromagère, de bactéries productrices de bactériocines pour inhiber les bactéries indésirables dans les fromages. In *Proceeding of the SFM Meeting Gestion des populations microbiennes dans les Industries Agroalimentaires* (pp. 377–382). Dijon, France.
- Marshall, K. C. (1992). Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *American Society of Microbiology*, 58, 202–207.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., & Metaxopoulos, J. (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at $4 \pm 2^\circ\text{C}$. *Food Microbiology*, 20, 259–265.
- Montville, T. J., Winkowski, K., & Ludescher, R. D. (1995). Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal*, 5, 797–814.
- Sim, J., Hood, D., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M., et al. (2002). Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 409–413.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 722–756.
- Tyopponen, S., Markkula, A., Petaja, E., Suihko, M. L., & Mattila-Sandholm, T. (2003). Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. *Food Control*, 14, 181–185.
- Zhao, T., Doyle, M. P., & Zhao, P. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in food processing facilities by competitive inhibition microorganisms. Final report to American Meat Institute Foundation. p. 36.

2. Activités antibactériennes des bactéries lactiques à l'encontre de bactéries d'altération et pathogènes isolées du même atelier fermier de salaison : 2- Comportement des bactéries pathogènes et d'altération dans des biofilms artificiels binaires incluant une bactérie lactique productrice de bactériocine.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis à « Food Control » : **Ammor, S.**, Tauveron, G., Dufour, E. & Chevallier, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same small-scale facility producing traditional dry sausages: 2- Investigation of the antibacterial effect in dual species biofilms. *Food Control*, accepté sous réserve.

1.1. Objectifs

Récemment le concept de « flore barrière » a été proposé pour la maîtrise de la contamination des surfaces et donc la biopréservation des produits alimentaires produits. Le concept consiste en la colonisation des surfaces par des microorganismes d'intérêt technologique ou ne présentant pas d'effet indésirable. Ces germes doivent être très compétitifs et présenter des activités antimicrobiennes à l'encontre de la flore indésirable.

En se basant sur les résultats rapportés dans la publication 4, nous nous sommes attachés à sélectionner une « flore barrière » pour cet atelier, capable de prévenir l'implantation de microcolonies de flores pathogène et d'altération. Pour cela, l'effet antibactérien de 14 bactéries lactiques présentant des activités antibactériennes à l'encontre de *L. innocua*, *Sc. aureus* et/ou *H. alvei* (Publication 4) a été étudié. Cette activité a été testée en conditions de biofilms, le mode réel d'attachement des bactéries au niveau des surfaces et des équipements.

1.2. Résultats et discussion

Les résultats ont montré qu'en aérobiose et en absence d'une matrice carnée, *Lb. sakei* n'inhibait pas la croissance de *L. innocua*. Par contre les souches d'*Ec. faecium* et de *Vc. carniphilus* inhibaient significativement *L. innocua*. En plus de *L. innocua*, ces deux espèces sont capables d'inhiber la croissance de *Sc. aureus* et/ou *H. alvei* en biofilms. Les taux de

réductions pouvaient atteindre 2, 2,7 et 2,4 log₁₀ u.f.c/ml, respectivement pour *L. innocua*, *Sc. aureus* et *H. alvei*.

Les résultats ont aussi montré que *L. innocua*, *Sc. aureus* et/ou *H. alvei* étaient plus sensibles à la présence de la bactérie lactique productrice de « bactériocin-like » lorsqu'elles sont cultivées sous forme planctoniques que lorsqu'elles sont cultivées sous forme sessile.

Le fait que l'on observe une inhibition significative des bactéries cibles en conditions de cultures planctoniques est incompatible avec l'hypothèse 3 qui stipulait que les « bacteriocins-like » était vraisemblablement produites lorsque les cellules productrice et cible sont en contact (voir publication 4). L'hypothèse 1 suggérant une éventuelle rétention de la bactériocine par le filtre apparaît à nouveau comme la plus probable. Néanmoins, même en changeant la nature du filtre (polyéthylène sulfate, connu par son très faible pouvoir de rétention protéique, à la place de l'acétate de cellulose), l'activité n'a pu être détectée dans le surnageant.

1.3. Conclusion

Les résultats obtenus ont montré que les 3 souches de *Vc. carniphilus* présentaient des effets antibactériens plus prononcés que les 2 souches d'*Ec. faecium*. Mais, étant donné le manque d'information sur la signification clinique de *Vc. carniphilus* et considérant que *Ec. faecium* a été préconisé comme ferment dans la production de saucisson sec (Leroy & de Vuyst, 2003), nous suggérons l'utilisation d'une souche d'*Ec. faecium* comme « flore barrière ». Cette proposition est renforcée par le fait que cette espèce n'est pas affectée par la solution de désinfection sélective sélectionnée pour cet atelier.

Des études plus approfondies doivent être envisagées pour tester le comportement de ces 2 souches en atelier et pour évaluer leurs effets sur le produit final. Un soin particulier doit aussi être porté à l'innocuité de la souche ; notamment en vérifiant l'absence du gène *vanA*.



Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria

Salim Ammor^a, Isabelle Chevallier^{a,*}, Arlette Laguet^a, Jean Labadie^b,
Régine Talon^b, Eric Dufour^a

^a *Unité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires, ENITA-CF, Site de Marmilhat, Lempdes 63370, France*

^b *Equipe Microbiologie, Station de Recherches sur la Viande, INRA Theix, 63122, Saint Genès Champanelle, France*

Received 11 February 2003; accepted 12 May 2003

Abstract

The aim of this work was to investigate the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on some spoilage, pathogenic and useful bacteria isolated from a traditional meat workshop.

Fourteen decontaminating solutions, i.e., acid, alkaline, osmotic, biocide solutions or their combinations were tested on five bacterial species grown as monospecies biofilms. The solution made of monolaurin (0.075% w/v) and acetic acid at pH 5.4 was the most selective decontaminating solution. It reduced by only 0.2 and 0.4 log *Lactobacillus* spp. and *Staphylococcus carnosus*, whereas *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Listeria monocytogenes* exhibited reductions of 3.7, 3.2 and 4.2 log, respectively. The acetic solution (pH 5.4) and the solution containing monolaurin (0.075% w/v) and sodium sulfate (12% w/v) were also selective. But their bactericidal effects on *Pseudomonas* species were relatively small.

Four selected solutions were then applied to seven bacterial species grown as multispecies biofilms. The mixture solution of monolaurin (0.075% w/v) and acetic acid at pH 5.4 showed again the best selectivity. Finally, lowering the pH of the acetic solution from 5.4 to 5.2 increased the selective decontamination.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Selective decontamination; Biofilms; Meat; Useful bacteria; Spoilage bacteria; Pathogens

1. Introduction

Food products contamination may occur from environmental routes such as air, people and surfaces. The surface route is the most important to control on a day to day basis. This can be achieved by the implementation of a sanitation program (Holah, 1995). Disinfection is the final stage in a sanitation program. In addition to reducing the level of micro-organisms, it is designed to remove product residues and foreign bodies to ensure both the safety and quality of food products.

The manufacturers use harsh decontamination processes, killing most of the micro-organisms. For traditional fermented products, which are still often not

inoculated with starter cultures and which depend on the indigenous flora, these harsh processes lead to significant losses of flavor and typicality of the products. The low sensorial properties of these products are due to the destruction of the useful flora. Thus, the setting up of targeted disinfection in workshops producing traditional fermented products is therefore necessary.

Few studies dealing with the selective decontamination have been recently reported. Promising results were obtained by Blaszyk and Holley (1998) who succeeded in inhibiting *Brochetrix thermosphacta* and *Listeria monocytogenes* with a solution containing sodium citrate, monolaurin and eugenol, while most of the lactic flora (*Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus*) were preserved. In the same way, Vasseur (1999) observed that a combination of sodium sulfate (12%), sodium hydroxide (pH 10.5) and monolaurin or aliphatic fatty amine, allowed the destruction of *Listeria*

*Corresponding author. Tel.: +33-4-7398-1393; fax: +33-4-7398-1390.

E-mail address: chevalli@enitac.fr (I. Chevallier).

monocytogenes and *Pseudomonas* species, without affecting the survival of some useful species like *Brevibacterium linens* and *Micrococcus* species. Although promising, these experiments were not carried out on multispecies biofilms, the common mode of bacterial attachment on surfaces.

The aim of the present study was to investigate the influence of pH, osmolarity and various molecules on monospecies biofilms formed by pathogenic, spoilage or useful bacteria in order to select those destroying the spoilage and pathogenic bacteria, while preserving the useful bacteria. In a second time, the selected solutions were tested on multispecies biofilms to verify their selectivity in the common mode of bacterial attachment.

2. Materials and methods

2.1. Micro-organisms

The bacterial strains used were isolated from a traditional meat workshop producing traditional dry sausages without inoculation of starter cultures to the batter (Chevallier et al., 2001). For the monospecies biofilm experiments, five micro-organisms were used: two useful bacteria (*Lactobacillus* spp. and *Staphylococcus carnosus*), two spoilage bacteria (*Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*) and one pathogenic bacterium (*Listeria monocytogenes*). For the multispecies biofilm experiments, *Hafnia alvei* and *Enterococcus faecium* were also included in order to have a better representation of spoilage species found in the traditional meat workshop (Chevallier et al., 2001).

2.2. Cultures

Bacteria isolates were precultivated and cultivated at 12°C (the temperature of the studied workshop) for 3–5 days in Standard Medium Broth (SMB) (AFNOR, NF ISO 4833: 1991) containing 5 g of tryptone (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), 2.5 g of yeast extract (Beckton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and 1 g of anhydrous glucose (Merck-eurolab, Briare Le Canal, France). To this medium, 2.5% (w/v) of NaCl (Merck-eurolab) was added in order to simulate the conditions of sausage manufacturing. After growing to approximately 10⁶ cfu/ml (3–5 days according to each bacterium), cells were centrifuged at 12°C (MR 18.22, Jouan, France) for 10 min at 9000 g, washed 3 times in saline solution (physiologic water: 8 g/l of NaCl) and resuspended in 2 ml of saline solution.

2.3. Biofilm formation

Biofilms were grown according to the method of Tremoulet et al. (2002). A few modifications were

carried out: Extra-thick fiberglass disks (diameter: 25 mm, Gelmann Sciences, MI, USA) were used as support matrix for biofilm growth. Disks were autoclaved at 121°C for 15 min prior to use. Two disks per culture were laid on Standard Medium Agar (SMA) (2.5% w/v of NaCl) for 1 h to allow their soaking with nutrients. Two other disks per culture were inoculated with 0.5 ml of bacterial culture at approximately 10⁶ cfu/ml. After 5–10 min of contact allowing bacteria attachment, the inoculated disks were rinsed twice for 2 min with a saline water (20 ml contained in a Petri plate) under gentle agitation (45 rpm/s) (Orbital agitator 43 000, J.P. Selecta, France) to remove unattached cells. After rinsing, the inoculated disks were placed on the sterile disks already laid on the nutritive medium and incubation was run at 12°C for 5 days. One of the two inoculated disks was used as a control, the other was treated with the decontaminating solution.

For the multi-species biofilms experiments, the same protocol was used but disks inoculation was modified. Two disks were inoculated, each one, with a mixture (total: 581 µl) of 83 µl of each isolate culture at a concentration of approximately 10⁶ cfu/ml. The inoculated disks were rinsed twice and placed on the two sterile disks already laid on the nutritive medium. The incubation was run at 12°C for 5 days. One of the two disks was used as a control and the other was treated with the decontaminating solution.

2.4. Decontaminating solutions and treatment procedures

The different decontaminating solutions were prepared in distilled water except monolaurin that was first solubilized in ethanol (95% v/v) (Merck-eurolab) and then diluted in distilled water. Fourteen decontaminating solutions composed of sodium hydroxide (Merck-eurolab), acetic acid (Merck-eurolab), sodium sulfate (Merck-eurolab), monolaurin (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), quaternary ammonium (Bactégil, Sodevi, Saint-Etienne, France) and/or their combinations (Table 1) were tested on the monospecies biofilms. The most effective solutions were then applied on the multi-species biofilms to confirm their selectivity in the common mode of bacterial attachment.

The inoculated disks were introduced in a Petri dish containing 20 ml of the decontaminating solution for the appropriate time of exposure (Table 1) and under gentle agitation (60 rpm/s). Control and treated disks were rinsed twice (2 and 6 min) with sterile saline solution under gentle agitation (45 rpm/s) and placed in a stomacher bag (AES Laboratories, France) containing 20 ml of tryptone salt broth (Biokar Diagnostics). Then, they were stomached with a Lab Blender 400 stomacher (Seward, UK) for 6 min and decimal dilutions were pour plated onto the SMA plates (1% inoculum) using an automatic spiral plater WASP (Don Whitley Scientific

Limited, West Yorkshire, UK) and incubated at 12°C for 5 days.

For the multi-species biofilms, the different species were enumerated on selective media. The selective media used were MRS (De Man et al., 1960) for *Lactobacillus* spp., Chapman for *S. carnosus*, CFC for *Pseudomonas* species, Palcam for *L. monocytogenes*, Slanetz for *E. faecium* and VRBL for *H. alvei*. All these media were purchased from Biokar Diagnostics. Decimal dilutions

of the obtained solutions were pour plated (1% inoculum) on the selective agar plates using the automatic agar plater and incubation were led at 12°C for 5 days.

The selectivity of each treatment was determined by comparing its bactericidal activity on the different species. The log-reduction was the difference between the log of initial cells counts and the log of survival cells following decontamination. Enumeration were performed using the WASP colony counting system. Experiments were performed in duplicate. Plates were incubated at 12°C in medium containing 2.5% (w/v) of NaCl and the decontaminating solutions were applied after 5 days of biofilms growth, i.e., conditions close to the manufacturing temperature and sanitation program used in the workshop.

Table 1

List of decontaminating solutions applied and their parameters

Treatment	Composition and parameters of the treatment
A	CH ₃ -COOH-pH 5.4 (30 min)
B	NaOH-pH 12 (30 min)
C	Na ₂ SO ₄ -12% w/v (pH 8.8) (30 min)
D	NaOH-pH 12 (30 min) + rinse + CH ₃ -COOH-pH 5.4 (30 min)
E	CH ₃ -COOH-pH 5.4 (30 min) + rinse + NaOH-pH 12 (30 min)
F	[NaOH-pH 12 + Na ₂ SO ₄ -12%] (pH = 11.3) (30 min)
G	[NaOH-pH 12 + monolaurine-0.075%] (pH = 11.6) (30 min)
H	[NaOH-pH 12 + Na ₂ SO ₄ -12% (w/v) + monolaurine-0.075%] (pH = 11.5) (30 min)
I	Monolaurine-0.075% (w/v) (pH = 9.6) (30 min)
J	Bactégil ^a (Ammonium IV)-1% (v/v) (pH = 9) (5 min)
K	[CH ₃ -COOH + Na ₂ SO ₄ -12%] (pH = 5.4) (30 min)
L	[CH ₃ -COOH + monolaurine-0.075%] (pH = 5.4) (30 min)
M	[CH ₃ -COOH + Na ₂ SO ₄ -12% (w/v) + monolaurine-0.075%] (pH = 5.4) (30 min)
N	[Na ₂ SO ₄ -12% (w/v) + monolaurine-0.075%] (pH = 8.92) (30 min)
A''	CH ₃ -COOH-pH 5.2 (30 min)

^aThe disinfectant usually used in the studied traditional meat workshop.

2.5. Statistical analysis

The Statgraphics Plus program (Statistical Graphics Corp., Englewood Cliffs, NJ, USA) was used to carry out principal components analysis (PCA) on the obtained data.

3. Results and discussion

3.1. Bactericidal effects of decontaminating treatments on monospecies biofilms

The effect of the decontaminating solutions on bacteria is expressed in log-reductions of initial cell counts (Table 2).

Table 2

Log-reductions of bacterial cells grown in monospecies biofilms following exposition to decontaminating solutions

Treatment	Strains									
	<i>Lactobacillus</i> spp.		<i>Staphylococcus carnosus</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Pseudomonas putida</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	L.I.C	L.R	L.I.C	L.R	L.I.C	L.R	L.I.C	L.R	L.I.C	L.R
A	7.5	0.2	7.6	0.2	7.7	0.6	7.9	0.5	6.3	> 3.8
B	7.5	> 5.0	7.6	3.4	7.7	4.4	7.9	4.1	6.3	> 3.8
C	7.5	0.0	7.6	0.8	7.7	0.4	7.9	0.0	6.3	> 3.8
D	7.5	> 5.0	7.6	4.6	7.7	> 5.2	7.9	> 5.4	6.3	> 3.8
E	7.5	> 5.0	7.6	4.6	7.7	> 5.2	7.9	> 5.4	6.3	> 3.8
F	7.5	> 5.0	7.6	4.6	7.7	> 5.2	7.9	3.1	6.3	> 3.8
G	7.5	> 5.0	7.6	4.6	7.7	0.9	7.9	0.9	6.3	3.3
H	7.5	> 5.0	7.6	> 5.1	7.7	4.2	7.9	4.4	6.3	> 3.8
I	7.5	0.3	7.6	0.7	7.7	0.3	7.9	0.28	6.3	2.0
J	7.5	1.4	7.6	2.0	7.7	0.4	7.9	0.89	6.3	> 3.8
K	7.7	0.3	6.9	0.3	8.2	0.8	7.9	0.46	5.7	1.0
L	7.7	0.2	6.9	0.4	8.2	3.7	7.9	3.3	5.7	> 3.2
M	7.7	> 5.2	6.9	> 4.4	8.2	2.3	7.9	2.0	5.7	> 3.2
N	7.7	0.8	6.9	0.9	8.2	2.4	7.9	2.1	5.7	2.7

L.I.C: log of initial counts; L.R: log-reductions following treatments. See Table 1 for the composition of the decontaminating solutions.

3.1.1. Non-selective decontaminating solutions

The alkaline treatments containing NaOH (pH 12) alone (B) or in combination with other products (D, E, F, G, H) were not selective for the useful bacteria. Indeed, they were highly bactericidal since a large destruction was observed for most of the studied bacteria. More than 5 log-reductions were observed for the *Lactobacillus* strain. These results agree with Bourgeois et al. (1996) who showed that a pH higher than 11 was lethal for most of bacteria. Vasseur et al. (2001) also observed a complete destruction of *L. monocytogenes* and *Pseudomonas* species in solution of NaOH may be attributed to the dissolution of the polymeric substances involved in the binding of cells to surfaces (Vasseur, 1999). Another hypothesis results from the capacity of the alkaline solution to diffuse throughout the protective glycocalyx, to penetrate the cell wall, to disrupt the cytoplasmic membrane and to disturb the ionic gradients (Vasseur et al., 2001). The fast intracellular pH increase induces a saponification of the membrane's lipids and an inhibition of the membrane's energy producing ability. As a consequence, the energy production decreases and the bacterial growth is stopped (Vasseur et al., 2001).

The biocide treatment made of monolaurin (I) was also not selective since it had a weak inhibitory effect towards all the studied bacteria. These results agree with Vasseur et al. (2001) who showed that this biocide had a weak inhibitory activity towards *Pseudomonas* species. Oh and Marshall (1993, 1996) and Verhaegh et al. (1996) also showed that this biocide was not deleterious for *L. monocytogenes*.

Finally, the quaternary ammonium-'Bactegil' (J) was shown to be ineffective on the Gram-negative flora. But it showed an inhibitory effect on the Gram-positive bacteria mainly against the useful flora, even after 5 min of treatment. These results are in agreement with data reported by Isoard (1988) showing that quaternary ammoniums are ineffective on Gram-negative and active on Gram-positive bacteria.

3.1.2. Partially selective decontaminating solutions

The acetic acid solution (A) was partially selective. Indeed, the useful flora was less inhibited than the spoilage and pathogenic bacteria. Although it was efficient against the studied *L. monocytogenes* strain (more than 3.8 log), it had only a weak inhibitory effect against the spoilage bacteria (0.6 log). Results obtained with this treatment against *L. monocytogenes* do not agree with Buchanan et al. (1993) who reported that this bacterium was able to grow in HCl solution, pH 4.3. Three hypotheses may explain this difference. The first is related to the used acetic acid which has been reported to be more detrimental for bacteria than other organic or mineral acids (Vasseur et al., 1999). The second one is

related to the "strain" factor. Ralovich (1992) reported that the minimum pH of growth for this bacterium depends on the studied strain. The last one is based on the fact that cells of the studied bacterium could be in autolysis phase regarding the period of incubation preceding the application of treatments and the amounts of NaCl added to the growth medium. Alternatively, the selectivity of acidic solutions for the useful flora agrees with the literature. Bourgeois et al. (1996) noted that staphylococci could grow at pH 4.2. Lactobacilli were also shown to be able to grow at pH of 3.3 (Kandler and Weiss, 1986; Kleynmans et al., 1989).

The osmotic treatment (C) made of sodium sulfate solution (12% w/v) was also partially selective. However it is less interesting than the acetic acid solution (A) since the useful flora, but also *Pseudomonas* species, were practically unaffected. These results are in agreement with several reports regarding the high resistance of *Pseudomonas* spp. (Vasseur et al., 2001), staphylococci (Kunin and Rudy, 1991) and lactic acid bacteria (Entani et al., 1986; Kandler and Weiss, 1986; Yanagida et al., 1987) to the osmotic stress. However, we showed that *L. monocytogenes* was largely affected by this treatment. This result does not agree with the observation of Arizcun et al. (1998) who reported that *L. monocytogenes* in biofilms are not very sensitive to osmotic stress (10.5% of NaCl). The influence of the "strain" factor or the fact that cells (see above) were in autolysis phase may explain the obtained results. Considering the "strain" factor, it has been shown that *Ps. fluorescens* is more sensitive to osmotic treatment than *P. putida* and *P. fragi* (Vasseur, 1999).

The treatment (K) combining the acetic acid solution (pH 5.4) and Na₂SO₄-12% (w/v) was also partially selective. Although the studied spoilage and pathogenic bacteria were much more inhibited than the useful bacteria, log-reduction levels were lower than or equal to 1.8 log. These levels cannot be sufficient to ensure the product safety. Our observations confirm the results of Arizcun et al. (1998) suggesting that sodium chloride and acid do not seem to have important effects in inactivating *L. monocytogenes*.

3.1.3. Selective decontaminating solutions

The solution (L) combining acetic acid solution (pH 5.4) and monolaurin (0.075% w/v) was selective since the studied spoilage and pathogenic micro-organisms, but not the useful bacteria, were largely inhibited (Table 2). As log-reductions of 3.7, 3.3 and more than 3.2 were observed for *P. fluorescens*, *P. putida* and *L. monocytogenes*, respectively, *Lactobacillus* spp. and *S. carnosus* exhibited reductions of 0.2 and 0.4 log, respectively. These results agree with Oh and Marshall (1996) who showed a complete inactivation of 10⁷ cfu/ml of *L. monocytogenes* by the synergetic action of 1% (v/v) acetic acid solution with 50 or 100 µg/ml of

monolaurin within 20 or 25 min. Wang and Johnson (1997) also observed that bactericidal activity of monolaurin was higher in acidic medium.

The solution made of sodium sulfate and monolaurin (N) was also selective since the spoilage and pathogenic bacteria were much more affected than the useful ones (Table 2). However, it was less efficient than the solution (L). The log-reduction levels did not exceed 2.7 log. The results obtained for solutions (I) and (N) confirmed the observations of Marshall (1998) who reported that antimicrobial effects of monolaurin increased with the decreasing of the water activity (a_w).

3.2. Principal components analysis of solution bactericidal effects

Considering the number of decontaminating solutions applied and the results against each species, it becomes difficult to have a global view of the whole results. Multivariate analysis technique such as principal components analysis (PCA) makes it possible to extract information related to bacteria physiologic responses to decontaminating solutions and to represent the results as a similarity map. PCA combines the variables that explain the largest part of the variance to form the first principal component. The second principal component accounts for the next largest part of variance, and so on, until the total sample variance is combined into component groups. PCA was applied to the log-reduction results obtained with the investigated treatments. The first two principal components (PC) accounted for 89.7% of the total variance with a predominance of the principal component 1 (47.6%) (Fig. 1). According to the PC1, the solutions A, C, I, J,

K, L and N exhibited a positive score, whereas the B, D, E, F, G, H and M solutions displayed a negative score. These results are in agreement with the observations and it indicate that the treatments with a negative-score are very harmful to the useful bacteria. In addition, the treatment (L) and (N) were found on the far right of the map indicating that *L. monocytogenes* and *Pseudomonas* species, but not *Lactobacillus* spp. and *S. carnosus*, are highly inhibited by these two solutions.

Considering information extracted from the data and the PCA performed on the data, it was concluded that the solution made of acetic acid pH 5.4 and of monolaurin (0.075%) (L) was selective preserving the useful flora. The combination of monolaurin (0.075%) and sodium sulfate (12%) (N) was also selective for the useful flora but at a lesser extend than the solution (L). Although the acetic treatment (pH 5.4) was less effective on spoilage bacteria, it had a significant effect on *L. monocytogenes* and preserved efficiently the useful bacteria. Consequently, the treatments (A), (N) and (L) were selected for testing on multi-species biofilms and an acetic acid solution, pH 5.2 was also considered as a treatment.

3.3. Bactericidal effects of the selected treatments on multispecies biofilms

Table 3 shows the inactivation levels of the selected treatments on each bacterium of the multi-species biofilms. The results are expressed in log-reductions of initial cell counts.

The data obtained with the two acetic acid solutions (pH 5.4 and 5.2) (A and A') confirmed the results obtained on the monospecies biofilms. Indeed, spoilage

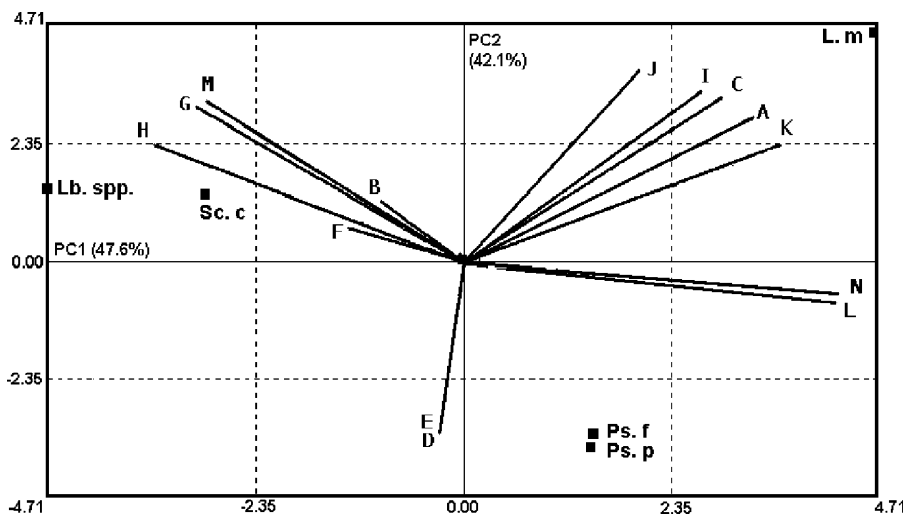


Fig. 1. Factorial biplot defined by the principal components 1 and 2 (PC 1: 47.6%; PC 2: 42.1%) resulting from the PCA performed on the log-reductions levels of monospecies biofilms. (See Table 1 for the correspondence with decontaminating solutions; Lb. spp.: *Lactobacillus* spp., L. m: *Listeria monocytogenes*, Ps. f: *Pseudomonas fluorescens*, Ps. p: *Pseudomonas putida*, Sc. C: *Staphylococcus carnosus*.)

and pathogenic bacteria were much more sensitive to the acidic treatments than the studied useful bacteria. Reductions of the harmful bacteria varied between 0.8 and 2.8 log, while the studied useful bacteria exhibited less than 0.2 log of reduction. Moreover we noted a stronger resistance of *L. monocytogenes* towards the acetic acid solution (pH 5.4) when grown in multi-species biofilms. Indeed, the log-reduction decreased from more than 3.8 in monospecies to 1.0 in multi-species. Inter-species communication may enhance the exchange of resistance genes to this stress. In fact, several authors reported the presence of soluble signals, such as autoinducer-2, that may be exchanged within multi-species communities to convey information be-

tween organisms (Miller and Bassler, 2001; Schauder and Bassler, 2001). Otherwise, we observed that decreasing the pH from 5.4 to 5.2 increased the selectivity of the acetic acid solution. The log-reductions of the useful bacteria remained practically constant, while those of the harmful bacteria increased considerably. A more concentrated acetic acid solution at pH between 4 and 5 is thought to be a very selective decontaminating solution.

The combination of the acetic acid solution (pH 5.4) and monolaurin (0.075%) (L) was found to be very selective. The studied spoilage and pathogenic microorganisms were largely affected by this treatment, whereas the useful bacteria were practically unaffected by the solution (L). Indeed, log-reductions varying between 3.3 and more than 3.7 were measured for the pathogenic and spoilage bacteria, whereas *Lactobacillus* spp. and *S. carnosus* exhibited only 0.1 and 0.3 log of reductions, respectively. These results confirmed the tendency observed for bacteria grown as monospecies biofilm and confirmed the synergetic action of monolaurin and acetic acid.

The solution containing sodium sulfate and monolaurin (N) was also selective since the spoilage and pathogenic bacteria were more inhibited than the useful bacteria (Table 3). However, the log-reduction levels remained insufficient to ensure the safety of the product. Moreover, the harmful bacteria were more resistant when grown in multi-species biofilms. The inter-species communication and the possibility of soluble signal exchanges could explain this observation (Miller and Bassler, 2001; Schauder and Bassler, 2001).

PCA was applied to the log-reduction result data obtained on multispecies biofilms. The two principal components (PC) accounted for 99.5% of the total variance with a large predominance of the principal

Table 3
Log-reductions of bacterial cells grown in multispecies biofilms, following exposition to decontaminating solutions

Strains	Treatment	Treatment			
		A	A''	L	N
<i>Lactobacillus</i> spp.	L.I.C	6.0	6.0	6.0	6.0
	L.R	0.1	0.2	0.1	0.1
<i>Staphylococcus carnosus</i>	L.I.C	4.1	4.1	4.1	4.1
	L.R	0.3	0.3	0.3	0.4
<i>Enterococcus faecium</i>	L.I.C	6.6	6.6	6.6	6.6
	L.R	1.3	1.4	3.8	1.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	L.I.C	6.8	6.8	6.8	6.8
	L.R	2.2	2.8	4.2	1.6
<i>Pseudomonas putida</i>	L.I.C	6.7	6.7	6.7	6.7
	L.R	0.9	1.1	3.9	0.7
<i>Hafnia alvei</i>	L.I.C	6.9	6.9	6.9	6.9
	L.R	1.0	1.2	3.3	0.6
<i>Listeria monocytogenes</i>	L.I.C	6.2	6.2	6.2	6.2
	L.R	1.1	1.2	>3.7	0.6

L.I.C: log of initial counts; L.R: log-reductions following treatments. See Table 1 for the composition of the decontaminating solutions.

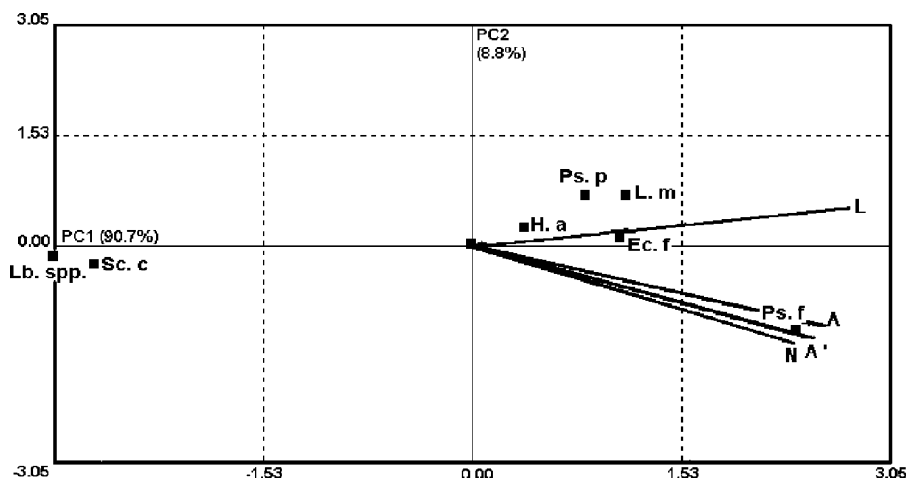


Fig. 2. Factorial biplot defined by the principal components 1 and 2 (PC 1: 90.7%; PC 2: 8.8%) resulting from the PCA performed on the log-reductions levels of multi-species biofilms. (See Table 1 for the correspondence with decontaminating solutions; Lb. spp.: *Lactobacillus* spp., Ec. f: *Enterococcus faecium*, H. a: *Hafnia alvei*, L. m: *Listeria monocytogenes*, Ps. f: *Pseudomonas fluorescens*, Ps. p: *Pseudomonas putida*, Sc. C: *Staphylococcus carnosus*.)

component 1 (PC1) (90.7%) (Fig. 2). It appeared that the four decontaminating solutions (A, A'', L, N) exhibited a positive score. This result was explained by the fact that all these treatments were not harmful to the useful bacteria. Thus, the PC1 discriminated the useful bacteria from the pathogenic and spoilage ones. Likewise, the PC2 discriminated the four treatments into two groups. The first group is made of the treatment (L), which was harmful to the pathogenic and spoilage bacteria. The other group contained the treatment (A, A'' and N) which was less effective against the harmful bacteria and had a preservative effect on useful bacteria. These observations confirm again the highest selectivity of the treatment (L).

4. Conclusion

We can conclude that monolaurin and acetic acid have a synergetic and selective actions, preserving the useful bacteria and inactivating the pathogenic and spoilage bacteria. The acetic acid solution pH 5.4 could be a targeting disinfectant, but it is insufficiently efficient. Lowering the pH of this solution to pH 5.2 increased its efficiency. Alternatively, *L. monocytogenes* is more resistant when grown in multi-species biofilm than when grown as monospecies biofilm. But the synergetic effect of monolaurin and acetic acid enhanced the inactivation of *L. monocytogenes*. The obtained results suggest that selective decontamination processes can be set up in traditional meat workshops allowing to preserve the useful flora and as a consequence the typicality of the dry sausages.

References

- AFNOR ISO 4833, 1991 Microbiology; General guidance for the enumeration of micro-organisms; Colonies count technique at 30 degrees C. In: Analyse microbiologique, Méthodes horizontales. AFNOR, Paris, pp. 77–79.
- Arizcun, C., Vasseur, C., Labadie, J.C., 1998. Effect of several decontamination procedures on *Listeria monocytogenes* growing in biofilms. *J. Food. Prot.* 61 (6), 731–734.
- Blaszyk, M., Holley, R.A., 1998. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *Int. J. Food. Microbiol.* 39, 176–183.
- Bourgeois, C.M., Mesclé, J.F., Zucca, J., 1996. In: Tec & Doc (Eds.), Microbiologie Alimentaire I, Collection Sciences et Techniques Agro-alimentaires, Lavoisier, Paris, pp. 14–15.
- Buchanan, R.L., Golden, M.H., Whiting, R.C., 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J. Food. Prot.* 56, 474–478.
- Chevallier, I., Talon, R., Laguet, A., Labayle, S., Labadie, J., 2001. Application de la démarche d'écologie microbienne dirigée dans un atelier fermier charcutier (I). Inventaire de la flore de l'atelier et du produit. In: Tec & Doc (Eds.), Proceeding of the 13rd Agoral meeting, Lavoisier, Paris, pp. 213–218.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130–135.
- Entani, E., Masai, H., Suzuki, K.I., 1986. *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 544–549.
- Holah, J.T., 1995. Special needs for disinfectants in food handling establishments. In: McDaniel, H.A. (Eds.), Disinfectants: Actions and Applications. Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties), Paris, Vol. 14 (1), pp. 95–104.
- Isoard, P., 1988. In: Tec & Doc (Eds.), Guide de la biocontamination, Lavoisier, Paris, pp. 25–30.
- Kandler, O., Weiss, N., 1986. Regular non-sporing Gram-positive rods. In: Sneath, P.H.A., Mavi, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1208–1234.
- Kleynmans, U., Heinzl, H., Hammes, W.P., 1989. *Lactobacillus suebicus* spp. nov., an obligately heterofermentative *Lactobacillus* species. *System. Appl. Microbiol.* 11, 267–271.
- Kunin, C.M., Rudy, J., 1991. Effect of NaCl-induced osmotic stress on intracellular concentrations of glycine betaine and potassium in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococci*. *J. Lab. Clin. Med.* 118 (3), 217–224.
- Marshall, D.L., 1998. Antimicrobial properties of the multifunctional ingredient monolaurin. Proceedings of the International Conference on Food System Functionality, Atlanta, GA.
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199.
- Oh, D.H., Marshall, D.L., 1993. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food. Microbiol.* 20 (4), 239–246.
- Oh, D.H., Marshall, D.L., 1996. Monolaurin and acetic acid inactivation of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel. *J. Food. Prot.* 59 (3), 249–252.
- Ralovich, B., 1992. Data for properties of *Listeria* strains (a review). *Acta Microbiol. Hung.* 39, 105–132.
- Schauder, S., Bassler, B.L., 2001. The languages of bacteria. *Genes. Dev.* 15, 1468–1480.
- Tremoulet, F., Clement, E., Gaillard-Martinie, B., Labadie, J., 2002. A potential new technique for studying biofilm growth and stress resistance of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and other bacterial species in food plants. *Sci. Aliments* 22, 305–315.
- Vasseur, C., 1999. Etudes physiologiques et moléculaires de la réponse bactérienne à des stress physico-chimiques pour l'élaboration des traitements sélectifs de décontamination des ateliers agro-alimentaires. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Vasseur, C., Baverel, L., Hébraud, M., Labadie, J., 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 86 (3), 469–476.
- Vasseur, C., Rigaud, N., Hébraud, M., Labadie, J., 2001. Combined effect of NaCl, NaOH and biocides (monolaurin or lauric acid) on inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. *J. Food. Prot.* 64 (9), 1442–1445.
- Verhaegh, E.G., Marshall, D.L., Oh, D.H., 1996. Effect of monolaurin and lactic acid on *Listeria monocytogenes* attached to catfish fillets. *Int. J. Food. Microbiol.* 29 (2–3), 403–410.
- Wang, L.L., Johnson, E.A., 1997. Control of *Listeria monocytogenes* by monoglycerides in foods. *J. Food. Prot.* 60 (2), 131–138.
- Yanagida, F., Suzuki, K.I., Kaneko, T., Kozaki, M., Komagata, K., 1987. Morphological, biochemical, and physiological characteristics of spore-forming lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 33, 33–45.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La recherche par le consommateur de produits naturels et authentiques, ainsi que la baisse de l'emploi dans beaucoup de secteurs industriels (Lagrange & Lelièvre, 1995) ont fait que les productions traditionnelle et fermière augmentent au niveau de toute l'Europe depuis les années 1980 (François, 1995). De plus, ces productions représentent un enjeu socio-économique étant donné que la transformation des produits agricoles de la ferme représente une source supplémentaire de revenu pour les agriculteurs qui pérennise durablement les exploitations et favorise leur croissance dans les zones rurales (Lagrange & Lelièvre, 1994).

Le développement des productions fermières est encouragé par la CEE dans le cadre de l'Agenda 2000 (CEE, 1999). Néanmoins, les exploitants de ces ateliers fermiers doivent être en accord avec la directive CEE 43/93 imposant aux producteurs de garantir l'hygiène des produits fermiers qu'ils commercialisent. Nous avons montré dans la publication 1 que malgré cette directive, certains ateliers fermiers peuvent présenter encore des lacunes en terme de maîtrise de l'hygiène, ce qui peut avoir des effets néfastes sur la qualité hygiénique du produit fermier final. En effet, nous avons montré la présence de taux élevés de *Sc. aureus* dans le produit final ainsi que la présence d'un isolat de *L. monocytogenes* au niveau du poussoir. La faible maîtrise de l'hygiène au niveau des ateliers fermiers a été confirmé lors d'une étude beaucoup plus large réalisée dans le cadre du programme européen « Tradisausage ». Cette maîtrise de l'hygiène devient de plus en plus critique lorsqu'on sait que les produits fermiers ne sont pasensemencés par des ferments et que la fermentation dépend principalement de la flore endogène à l'atelier. Toutefois, l'addition de ferments commerciaux engendrerait une perte de la typicité des produits, et n'est donc pas souhaitable.

Nous avons aussi montré dans la publication 1 que les procédures de nettoyage et de désinfection utilisées dans cet atelier n'étaient pas appropriées à ce type de production car elles détruisent toutes les flores sans distinction, y compris celle d'intérêt technologique. Cela pourrait engendrer des pertes de typicité, voir même des problèmes de fabrication. Par ailleurs, nous avons montré que les saucissons secs fermiers produits dans cet atelier, comme dans de nombreux ateliers traditionnels étudiés dans le cadre du programme « Tradisausage », ne sont pas, ou peu acidifiés. Les valeurs élevées du pH des saucissons pourraient s'expliquer par la non addition de sucres à la mûlée. L'ajout d'une quantité appropriée (2 à 2,5%) de glucides apparaît

comme une alternative dans la maîtrise de la qualité hygiénique, mais aussi technologique du saucisson sec.

Il est envisageable d'améliorer l'hygiène dans les ateliers fermiers en mettant en place une démarche de type écologie microbienne dirigée. Diriger l'écologie microbienne dans un atelier peut s'envisager de différentes façons. Il peut être envisagé d'élaborer des ferments spécifiques à l'atelier afin de maîtriser la fermentation sans pour autant altérer la typicité du produit. Cela consiste aussi à mettre en place des procédures de désinfection sélectives capables de détruire la flore pathogène et celle d'altération sans pour trop affecter la flore d'intérêt technologique. Enfin, cela revient à mettre en place une flore barrière endogène à l'atelier, de façon à prévenir le développement de la flore indésirable au niveau des surfaces et équipements de l'atelier.

Dans cette perspective, nous avons montré dans la publication 5 qu'il était possible de sélectionner des ferments lactiques à partir de la flore lactique dominante au niveau du produit, en l'occurrence *Lb. sakei*, et d'envisager de les combiner avec une ou 2 souches de staphylocoques/*Kocuria*, en l'occurrence *Sc. equorum* (Morot-Bizot, 2005), isolées du même atelier. Leur application doit être accompagné d'une concentration appropriée de sucres afin de favoriser leur croissance ; assurant une acidification du produit.

Dans la publication 6, nous avons montré que le produit désinfectant utilisé par l'exploitant de l'atelier étudié n'était pas approprié et qu'une solution d'acide acétique à pH 5,4 contenant 0,075% p/v de monolaurine pourrait constituer une alternative. Cette solution présente une action sélective : elle inhibe largement la flore indésirable et affecte peu celle d'intérêt technologique. Simultanément à l'utilisation de solutions de décontamination sélective, nous avons montré dans la publication 7 que 1 ou 2 souches d'*Ec. faecium* isolées de l'atelier pourraient être utilisées comme « flore barrière » afin de prévenir le développement de *Listeria* et de *Sc. aureus*.

En conclusion, il semble possible de diriger l'écologie microbienne dans les ateliers fermiers afin d'améliorer la qualité hygiénique et sensorielle des saucissons secs fermiers. Ces approches devront être testées au niveau des ateliers fermiers afin de s'assurer de leur efficacité.

Dans le prolongement de ces travaux, d'autres études doivent être menées afin de s'assurer de l'absence d'antagonisme entre les ferments lactiques et les staphylocoques/*Kocuria* retenus. Le comportement de ces ferments doit aussi être étudiés dans des mêlées afin de tester leurs

performances dans une matrice carnée. Par ailleurs, les souches d'*Ec. faecium* sélectionnées pour leur rôle de « flore barrière » doivent être testées en conditions de biofilms pluri-espèces afin de s'assurer de leur efficacité dans les conditions réelles d'attachement des bactéries aux surfaces et aux équipements de l'atelier. En plus, la possibilité d'utiliser des solutions de décontamination sélective, doivent être étudiées. Par la suite, les procédures de nettoyage et de désinfection retenues doivent être testées *in vivo*. D'autres études doivent être menées afin d'enrichir la base de données spectrales afin que les identifications par spectroscopie de fluorescence soient précises. Enfin, il serait judicieux de purifier, caractériser, étudier le mode d'action et la cinétique de production des « bacteriocins-like ».

A plus long terme, si l'efficacité de ces approches est vérifiée dans les études ci-dessus mentionnées, il serait envisageable de les généraliser à d'autres ateliers fermiers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarts, H. J., L. E. Hakemulder, & A. M. Van Hoef.** 1999. Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. *Int. J. Food Microbiol.* **49**:95-102.
- Abee, T., L. Krockel, & C. Hill.** 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* **28**:169-185.
- Abelyan, V. A., & L. A. Abelyan.** 1997. Production of immobilized cells of *Sporolactobacillus inulinus* in a continuously filling fermenter. *Appl. Biochem. Microbiol.* **33**:205-207.
- Abriouel, H., A. Herrmann, J. Starke, N. M. Yousif, A. Wijaya, B. Tauscher, W. Holzapfel, & C. M. Franz.** 2004. Cloning and heterologous expression of hematin-dependent catalase produced by *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1228. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:603-606.
- AFNOR-NF-T72-101.** 1981. Antiseptiques et désinfectants. In AFNOR (ed.). AFNOR, Paris.
- Ahmad, N., & E. H. Marth.** 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35 degree in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *J. Food Prot.* **52**:688-695.
- Amann, R. I., W. Ludwig, & K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Amiel, C., L. Mariey, M.-C. Curk-Daubié, P. Pichon, & J. Travert.** 2000. Potential of Fourier infrared spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria. *Le Lait* **80**:445-459.
- Andrighetto, C., L. Zampese, & A. Lombardi.** 2001. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Lett. Appl. Microbiol.* **33**:26-30.
- Anwar, H., & J. W. Costerton.** 1992. Effective use of antibiotics in the treatment of biofilm associated infections. *Am. Soc. Microbiol. News* **58**:665-668.
- Axelsson, L.** 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, p. 1-72. In S. Salminen & A. von Wright (ed.), *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*, 2^{ème} ed. Marcel Dekker Inc., New York.
- Aymerich, T., M. G. Artigas, M. Garriga, J. M. Monfort, & M. Hugas.** 2000. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* **88**:686-694.
- Bannari, S.** 1998. Sélection de ferments aromatiques pour saucisson sec - Contrôle d'implantation des bactéries par électrophorèse. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Baracco, P., P. Durand, J. C. Frentz, B. Jacquet, P. Zert, et al.** 1990. Encyclopédie de la charcuterie, 3^{ème} ed. Soussana, Paris.
- Bell, R. G.** 1997. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *J. Appl. Microbiol.* **82**:292-300.
- Bellon-Fontaine, M. N., & O. Cerf.** 1988. Nettoyage et désinfection dans les industries alimentaires, vol. 40. CDIUPA, Massy, France.
- Benthin, S., & J. Villadsen.** 1995. Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:647-654.
- Berthier, F., & S. D. Ehrlich.** 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:97-106.

- Berthier, F., & S. D. Ehrlich.** 1999. Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int J Syst Bacteriol* **49**:997-1007.
- Borch, E., M. L. Kant-Muermans, & Y. Blixt.** 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **33**:103-120.
- Borchardt, S. A., E. J. Allain, J. J. Michels, G. W. Stearns, R. F. Kelly, & W. F. McCoy.** 2001. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3174-3179.
- Bourion, F.** 1996. Les biofilms dans les bio-industries, 2^{ème} ed. ASEPT, Laval, France.
- Bousfield, I. J., R. M. Keddie, T. R. Dando, & S. Shaw.** 1985. Simple rapid methods of cell wall analysis as an aid in the identification of aerobic coryneform bacteria, p. 222-234. *In* M. Goodfellow & D. E. Minnikin (ed.), *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press, London.
- Bover-Cid, S., M. Izquierdo-Pulido, & M. Carmen Vidal-Carou.** 2001. Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Sci.* **57**:215-221.
- Breukink, E., H. E. van Heusden, P. J. Vollmerhaus, E. Swiezewska, L. Brunner, S. Walker, A. J. Heck, & B. de Kruijff.** 2003. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J. Biol. Chem.* **278**: 898-903.
- Briandet, R.** 1999. Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms -Aspects physico-chimiques. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Rennes, France.
- Briandet, R., T. Meylheuc, C. Maher, & M. N. Bellon-Fontaine.** 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5328-5333.
- Bucharles, C., J. P. Girard, J. Sirami, & S. Pascal.** 1984. Characteristics of a dry sausage showing excessive acidity. *Sci. Alim.* **4**:137-143.
- Buckenhüskes, H. J.** 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:253-272.
- Byczkowski, J. Z., & T. Gessner.** 1988. Biological role of superoxide ion-radical. *Int. J. Biochem.* **20**:569-580.
- Callewaert, R., M. Hugas, & L. de Vuyst.** 2000. Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **57**:33-42.
- Calvin, S., & G. Giey.** 2000. Première étape vers la mise en place de l'HACCP et de mesures de décontamination sélective. Projet de fin d'études. Ecole Nationale des Ingénieurs Travaux Agricoles de Clermont-Ferrand.
- CEE.** 1999. Europe's agenda 2000. Priority Publications Programme XD5 final version 31.8. Commission of European Communities.
- Champomier-Verges, M. C., S. Chaillou, M. Cornet, & M. Zagorec.** 2002. Erratum to "*Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects" [*Research in Microbiology* 152 (2001) 839]. *Res. Microbiol.* **153**:115-123.
- Characklis, W. G.** 1990. Microbial fouling control, p. 585-633. *In* W. G. Characklis & K. C. Marshall (ed.), *Biofilms*. Wiley & sons Inc, New York, USA.
- Chasco, J., G. Lizaso, & M. J. Beriain.** 1996. Cured colour development during sausage processing. *Meat Sci.* **44**:203-211.

- Chevallier, I., & F. Leriche.** 1998. Etude technique de l'adaptation de la méthode HACCP aux ateliers de transformation fermière (viande), Synthèse ENITA Clermont-Ferrand / CRA Auvergne., Lempdes.
- Christensen, B. E.** 1989. The role of extracellular polysaccharide in biofilms. *J. Biotechnol.* **10**:181–202.
- Collins, M. D., J. A. Farrow, B. A. Phillips, & O. Kandler.** 1983. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **129**:3427-3431.
- Collins, M. D., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, S. Ferusu, & D. Jones.** 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:310-316.
- Collins, M. D., J. Samelis, J. Metaxopoulos, & S. Wallbanks.** 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:595-603.
- Coppola, R., B. Giagnacovo, M. Iorizzo, & L. Grazia.** 1998. Characterization of lactobacilli involved in the ripening of soppressata molisana, a typical southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol.* **15**:347-353.
- Coppola, R., M. Iorizzo, R. Saotta, E. Sorrentino, & L. Grazia.** 1997. Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol.* **14**:47-53.
- Dabin, E., & R. Jussiaux.** 1994. Le saucisson sec, p. 23-145. *In* E. Dabin (ed.), Collection Science et Technologie des Métiers de Bouche. ERTI-Editeur, Paris.
- Dainty, R., & H. Blom.** 1995. Flavour chemistry of fermented sausages, p. 176-193. *In* G. Campbell-Platt & P. E. Cook (ed.), Fermented meats. Blackie Academic & Professional, London.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, & E. P. Greenberg.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**:295-298.
- Dawson, R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott, & K. M. Jones.** 1986. Data for Biochemical Research, 3^{ème} ed. Oxford Science Publications.
- de Roissart, H.** 1986. Bactéries lactiques, p. 343. *In* F. M. Luquet (ed.), Laites et produits laitiers : vache, brebis, chèvre, vol. 3. Lavoisier, Paris.
- Decho, A. W.** 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview *Continental Shelf Research* **20**:1257-1273.
- Dellaglio, F., H. de Roissart, S. Torriani, M. C. Curk, & D. Janssens.** 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques, p. 25-116. *In* H. de Roissart & F. M. Luquet (ed.), Bactéries lactiques, vol. 1. Lorica, Uriage.
- Dellapina, G., D. Blanco, E. Pancini, S. Barbuti, & M. Campanini.** 1994. Microbiological evolution in Italian Felino, Milan and Hungarian-style salami. *Ind. Conserv.* **69**:85-90.
- Deretic, V., M. J. Schurr, J. C. Boucher, & D. W. Martin.** 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* **176**:2773-2780.
- Dossmann, M. U., R. F. Vogel, & W. P. Hammes.** 1996. Mathematical description of the growth of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus pentosus* under conditions prevailing in fermented sausages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**:334-339.
- Duthoit, F., J. J. Godon, & M. C. Montel.** 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3840-3848.

- Dutka-Malen, S., S. Evers, & P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:24-27.
- Dykes, G. A., T. E. Cloete, & A. von Holy.** 1995. Taxonomy of lactic acid bacteria associated with vacuum-packaged processed meat spoilage by multivariate analysis of cellular fatty acids. *Int. J. Food Microbiol.* **28**:89-100.
- Dykes, G. A., & A. von Holy.** 1995. Differentiation of *Lact. sake* and *Lact. curvatus* isolated from naturally fermented Greek dry salami by SDS-PAGE of whole-cell proteins. *J. Appl. Bacteriol.* **79**:480-482.
- Earnshaw, R. G.** 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems, p. 211-232. *In* B. J. B. Wood (ed.), *The lactic acid bacteria in health and disease*, vol. 1. Elsevier, London.
- Eerola, S., R. Maijala, A. X. Roig Sagués, M. Salminen, & T. Hirvi.** 1996. Biogenic amines in dry sausages as affected by starter culture and contaminant amine-positive *Lactobacillus*. *J. Food Sci.* **61**:1243-1246.
- Eisinger, J., & J. Flores.** 1979. Front-face fluorometry of liquid samples. *Anal. Biochem.* **94**:15-21.
- Eldar, A., C. Ghittino, L. Asanta, E. Bozzetta, M. Gorla, M. Prearo, & H. Bercovier.** 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.* **32**:85-88.
- Enan, G., A. A. el-Essawy, M. Uyttendaele, & J. Debevere.** 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *Int. J. Food Microbiol.* **30**:189-215.
- Encinas, J. P., T. M. Lopez-Daz, M. L. Garca-Lopez, A. Otero, & B. Moreno.** 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* **54**:203-208.
- Fadda, S.** 2002. Incidence des ferments bacteriens sur les qualites hygieniques et sensorielles des saucisson. Exposé présenté aux étudiants DEA Nutrition et Sciences des Aliments, Octobre 2002.
- Fadda, S., Y. Sanz, G. Vignolo, M. Aristoy, G. Oliver, & F. Toldra.** 1999a. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3540-3546.
- Fadda, S., Y. Sanz, G. Vignolo, M. Aristoy, G. Oliver, & F. Toldra.** 1999b. Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:578-584.
- Fadda, S., G. Vignolo, & G. Oliver.** 2001. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnol. Lett.* **23**:2015-2019.
- Fischer, S., & M. Palmer.** 1995. Fermented meat production and consumption in the European Union, p. 217-233. *In* G. Campbell-Platt & P. E. Cook (ed.), *Fermented meats*, 1^{ère} ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Fleet, G. H.** 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **50**:101-117.
- Fletcher, M.** 1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J. Bacteriol.* **170**:2027-2030.
- Foegeding, P. M., A. B. Thomas, D. H. Pilkington, & T. R. Klaenhammer.** 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:884-890.
- Fournaud, J.** 1976. La microbiologie du saucisson sec. *L'aliment et la vie* **64**:82-91.

- Fournaud, J.** 1982. Type de germes rencontrés aux différents stades de la filière charcutière, p. 109-132. *In* CNRS (ed.), Hygiène et technologie de la viande fraîche, Paris.
- Fournaud, J., & R. Lauret.** 1985. Bactériologie des carcasses de bovins à l'abattoir. *Sci. Alim.* **5**:25-30.
- Frahm, E., I. Heiber, S. Hoffmann, C. Koob, H. Meier, W. Ludwig, R. Amann, K. H. Schleifer, & U. Obst.** 1998. Application of 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:450-453.
- François, M.** 1995. Agro-alimentaire Paysan Européen: Un projet de recherche sur les produits transformés à la ferme, p. 73-78. *In* L. Lagrange (ed.), Différenciation et qualité des produits alimentaires. ENITA, Clermont-Ferrand.
- Gardini, F., M. Martuscelli, M. A. Crudele, A. Paparella, & G. Suzzi.** 2002. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Sci.* **61**:275-283.
- Gardini, F., G. Suzzi, A. Lombardi, F. Galgano, M. A. Crudele, C. Andrighetto, M. Schirone, & R. Tofalo.** 2001. A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Res.* **1**:161-167.
- Garneau, S., N. I. Martin, & J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* **84**:577-592.
- Garrity, G. M., & J. G. Holt.** 2001. "Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria." p. 155-166. *In* D. R. Boone & R. W. Castenholz (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2^{ème} ed, vol. 1 (The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria). Springer-Verlag, New York.
- Gatti, Fornasari, & Neviani.** 2001. Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* by SDS-PAGE of cell-wall proteins. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**:352-356.
- Gelinas, P., & J. Goulet.** 1983. Efficacy of 8 disinfectants on 3 types of surfaces contaminated by *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **29**:1715-1730.
- Genot, C., F. Tonetti, T. Montenay-Garestier, & R. Drapron.** 1992. Front-face fluorescence applied to structural studies of proteins and lipid-protein interactions of visco-elastic food products. 1 - Designing of front-face adaptor and validity of front-face fluorescence measurements. *Sci. Alim.* **12**:199-212.
- Gilarova, R., M. Voldrich, K. Demnerova, M. Cerovsky, & J. Dobias.** 1994. Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **24**:315-9.
- Gill, C. O., & T. Jones.** 2000. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *J. Food Prot.* **63**:167-173.
- Giovannacci, I., S. Queguiner, C. Ragimbeau, G. Salvat, J. L. Vendevre, V. Carlier, & G. Ermel.** 2001. Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. *J. Appl. Microbiol.* **90**:131-147.
- Giraffa, G., P. De Vecchi, & L. Rossetti.** 1998. Note: identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *J. Appl. Microbiol.* **85**:918-924.
- Glenn, E., R. Geisen, & L. Leistner.** 1989. Control of *Listeria monocytogenes* in mould ripened raw sausages by strains of *Penicillium nalgiovense*. *Mitteilungsbl Bundesanstalt Fleischforsch* **105**:317-324.
- González, C. J., J. P. Encinas, M. L. García-López, & A. Otero.** 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiol.* **17**:383-391.
- González-Fernández, C., E. M. Santos, I. Jaime, & J. Rovira.** 2003. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiol.* **20**:275-284.

- Gould, G. W.** 1991. Antimicrobial compound, p. 461-483. *In* I. Goldberg & R. Williams (ed.), *Biotechnology and Food Ingredients*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Grazia, L., P. Romano, A. Bagni, D. Roggiani, & G. Guglielmi.** 1986. The role of moulds in the ripening process of salami. *Food Microbiol.* **3**:19-25.
- Gutmann, I., & A. W. Wahlefeld.** 1974. L(+) lactate: determination with lactic dehydrogenase and NAD, p. 1452-1456. *In* H. U. Bergemeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, 2^{ème} ed. Academic Press, London, New York.
- Haeghebaert, S., E. Delarocque Astagneau, V. Vaillant, A. Gallay, F. Le Querrec, & P. Bouvet.** 1998. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1996. *Bull. Epidemiol. Hebd.* **1998**:36-39.
- Hammes, W. P., A. Bantleon, & S. Min.** 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**:165-174.
- Hammes, W. P., & C. Hertel.** 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* **49**:S125-S138.
- Hammes, W. P., & H. J. Knauf.** 1994. Starters in the processing of meat products. *Meat Sci.* **36**:155-168.
- Hansen, J. N.** 1994. Nisin as a model food preservative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**:69-93.
- Herald, P. J., & E. A. Zottola.** 1988. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J. Food Sci.* **53**:1549-1552.
- Herranz, C., P. Casaus, S. Mukhopadhyay, J. M. Martnez, J. M. Rodriguez, I. F. Nes, P. E. Hernandez, & L. M. Cintas.** 2001. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.* **18**:115-131.
- Hertel, C., G. Schmidt, M. Fischer, K. Oellers, & W. P. Hammes.** 1998. Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene *katA* of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1359-1365.
- Hibma, A. M., S. A. Jassim, & M. W. Griffiths.** 1996. In vivo bioluminescence to detect the attachment of L-forms of *Listeria monocytogenes* to food and clinical contact surfaces. *Int. J. Food Microbiol.* **33**:157-167.
- Holzappel, W. H., P. Haberer, R. Geisen, J. Bjorkroth, & U. Schillinger.** 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:365S-373S.
- Holzappel, W. H., & U. Schillinger.** 1992. The genus *Leuconostoc*, p. 1500-1535. *In* A. Balows, H. Truper, M. Dworkin, W. Harder, & K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2^{ème} ed. Springer-Verlag, New York.
- Hood, S. K., & E. A. Zottola.** 1995. Biofilms in food processing. *Food Control.* **6**:9-18.
- Huang, L., C. W. Forsberg, & L. N. Gibbins.** 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:1230-1234.
- Hugas, M.** 1998. Bacteriocinogenic lactic bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* **49**:S139-S150.
- Hugas, M., M. Garriga, M. Pascual, T. Aymerich, & J. M. Monfort.** 2002. Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. *Food Microbiol.* **19**:519-528.
- Hugas, M., & J. M. Monfort.** 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chem.* **59**:547-554.
- Hyginov.** 1995. Guide pour l'élaboration d'un plan de nettoyage et désinfection. Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologie, Nouzilly.

- Ingham, S. C., & M. W. Moody.** 1990. Enumeration of aerobic plate count and *E. coli* during blue crab processing by standard methods, Petrifilm and Redigel. *J. Food Prot.* **53**:423-427.
- Isoard, P.** 1988. Guide de la biocontamination, 1^{ère} ed. Lavoisier, Paris.
- Janssen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau, & K. Kersters.** 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* **142**:1881-93.
- Jay, J. M.** 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:525-532.
- Jay, J. M.** 1986. *Modern Food Microbiology*, 3^{ème} ed. ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Jeong, D. K., & J. F. Frank.** 1994a. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environments. *J. Food Prot.* **57**:576-586.
- Jeong, D. K., & J. F. Frank.** 1994b. Growth of *Listeria monocytogenes* at 21°C in biofilms with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environments. *Lebensm. Wiss. Technol.* **27**:415-424.
- Jouve, J. L.** 1994. La maîtrise de la sécurité et de la qualité des aliments par le système HACCP, p. 503-528. *In Tec&Doc (ed.), La qualité des produits alimentaires, politique, incitations gestion et contrôle.* Lavoisier, Paris.
- Kabadjova, P., X. Dousset, V. Le Cam, & H. Prevost.** 2002. Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5358-5366.
- Kabara, J. J.** 1993. Medium-chain fatty acids and esters, p. 307-342. *In P. M. Davidson & A. L. Branen (ed.), Antimicrobials in Foods*, 2^{ème} ed. Marcel Dekker Inc., New York.
- Kalac, P., J. Spicka, M. Krzek, & T. Pelikanova.** 2000. The effects of lactic acid bacteria inoculants on biogenic amine formation in sauerkraut. *Food Chem.* **70**:355-359.
- Kandler, O.** 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**:209-224.
- Kanwar, S. S., B. S. Chadha, H. K. Tewari, & V. K. Sharma.** 1995. Continuous production of lactic acid from molasses by free and immobilized *Sporolactobacillus cellulosolvens*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:687-688.
- Kashket, E. R.** 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**:233-244.
- Ke, D., F. J. Picard, F. Martineau, C. Menard, P. H. Roy, M. Ouellette, & M. G. Bergeron.** 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3497-3503.
- Kersters, K.** 1985. Numerical methods in the classification of bacteria by protein electrophoresis. Academic Press.
- Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:39-85.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte, & G. Reuter.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**:103-125.
- Knauf, H. J., R. F. Vogel, & W. P. Hammes.** 1992. Cloning, sequence, and phenotypic expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH677. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:832-839.
- Knox, K. W., & A. J. Wicken.** 1976. Grouping and cross-reacting antigens of oral lactic acid bacteria. *J. Dent. Res.* **55**:A116-22.
- Kong, S., & A. J. Davison.** 1980. The role of interactions between O₂, H₂O₂, .OH, e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**:18-29.

- Koort, J., P. Vandamme, U. Schillinger, W. H. Holzapfel, & J. Björkroth.** 2004. *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* is a later synonym of *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1621-1626.
- Krockel, L., U. Schillinger, C. M. A. P. Franz, A. Bantleon, & W. Ludwig.** 2003. *Lactobacillus versmoldensis* sp. nov., isolated from raw fermented sausage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:513-517.
- Kunene, N. F., I. Geornaras, A. von Holy, & J. W. Hastings.** 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1084-1092.
- Labadie, J.** 1998. L'écologie microbienne dirigée, nouveau concept de maîtrise des procédés de fermentation et de maturation. *C.R. Acad. Agric. Fr.* **4**:57-70.
- Laban, P., C. Favre, F. Ramet, & J. P. Larpent.** 1978. Lactobacilli isolated from French saucisson (taxonomic study). *Zentralbl. Bakteriol. [Orig B]* **166**:105-111.
- Lagrange, L., & J. Lelièvre.** 1994. Evolution d'un échantillon d'exploitations agricoles atypiques, Synthèse ENITA de Clermont-Ferrand, Lempdes.
- Lagrange, L., & J. Lelièvre.** 1995. Propos sur la production fermière ou problématique de la production fermière, p. 67-72. *In* L. Lagrange (ed.), *Différenciation et qualité des produits alimentaires*. ENITA, Clermont-Ferrand.
- Lakowicz, J. R.** 1983. Protein fluorescence, p. 341 - 389. *In* J. R. Lakowicz (ed.), *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York.
- Lancefield, R. C.** 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exper. Med.* **57**:571-595.
- Larpent-Gourgaud, M., O. Michaux, C. Callon, O. Brenot, J. Sirami, P. Bonnin, & B. Boissonnet.** 1993. Etude comparée des flores d'aromatisation du saucisson de fabrication industrielle ou artisanale. *V.P.C* **4**:23-47.
- Larsen, R. W., R. Jasuja, R. K. Hetzler, P. T. Muraoka, V. G. Andrada, & D. M. Jameson.** 1996. Spectroscopic and molecular modeling studies of caffeine complexes with DNA intercalators. *Biophys. J.* **70**:443-452.
- Leblanc, L., & E. Dufour.** 2002. Monitoring the identity of bacteria using their intrinsic fluorescence. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**:147-53.
- Lebrun, E., M. Boireau, M. Bouix, J. Y. Leveau, & B. Deteurtre.** 2001. Applications de marqueurs fluorescents au suivi de la croissance de *Oenococcus oeni* au cours de la fermentation malolactique.
- Lee, S.-H., & J. F. Frank.** 1991. Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. *J. Food Prot.* **54**:4-6.
- Leisner, J. J., M. Vancanneyt, J. Goris, H. Christensen, & G. Rusul.** 2000. Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:19-24.
- Leroy, F., & L. de Vuyst.** 1999. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5350-5356.
- Lindgren, S. E., & W. J. Dobrogosz.** 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **7**:149-63.
- Little, B. J., P. Wagner, J. S. Maki, M. Walch, & R. Mitchell.** 1986. Factors influencing the adhesion of microorganisms to surfaces. *J. Adh.* **20**:187-210.
- Louisot, P.** 1983. *Biochimie Générale et Médicale*. SIMEP, Lyon.
- Luchansky, J. B., K. A. Glass, K. D. Harsono, A. J. Degnan, N. G. Faith, B. Cauvin, G. Baccus-Taylor, K. Arihara, B. Bater, A. J. Maurer, et al.** 1992. Genomic analysis of

- Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3053-3059.
- Lücke, F. K., J. M. Brummer, H. J. Buckenhuskes, A. Garrido Fernandez, M. Rodrigo, & J. E. Smith.** 1990. Starter culture development, p. 211 - 236. *In* P. Zeuthen, J. C. Cheftel, C. Eriksson, T. R. Gormley, P. Linko, & K. Paulus (ed.), *Processing and quality of foods: Food Biotechnology: Avenues to Healthy and Nutritious Products*, vol. 2. Elsevier Applied Science, London.
- Lücke, F. K., & H. Hechelmann.** 1987. Starter cultures for dry sausages and raw ham composition effect. *Fleischw.* **67**:307-314.
- Lyon, W. J., & B. A. Glatz.** 1991. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:701-706.
- Mafu, A. A., D. Roy, J. Goulet, & P. Magny.** 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* **53**:742-746.
- Mäkelä, P. M.** 1992. Fermented sausage as a contamination source of ropy slime-producing lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* **55**:48-51.
- Marconi, E., E. Sorrentino, L. Mastrocola, & R. Coppola.** 2000. Rapid detection of meso-diaminopimelic acid in lactic acid bacteria by microwave cell wall hydrolysis. *J. Agric. Food. Chem.* **48**:3348-3351.
- Mares, A., K. Neyts, & J. Debevere.** 1994. Influence of pH, salt and nitrite on the heme-dependent catalase activity of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **24**:191-198.
- Maris, P.** 1995. Modes of action of disinfectants. *Rev. Sci. Tech.* **14**:47-55.
- Martuscelli, M., M. A. Crudele, F. Gardini, & G. Suzzi.** 2000. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**:228-232.
- Masson, F., R. Talon, & M. C. Montel.** 1996. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **32**:199-207.
- Matin, A.** 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:3-10.
- Mayr, R., M. Fricker, A. Maoz, & S. Scherer.** 2004. Anti-listerial activity and biodiversity of cheese surface cultures: influence of the ripening temperature regime. *Europ. Food Res. Technol.* **218**:242-247.
- McLean, R. J., M. Whiteley, D. J. Stickler, & W. C. Fuqua.** 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**:259-263.
- Metaxopoulos, J., S. Stavropoulos, A. Kakouri, & J. Samelis.** 1996. Yeasts isolated from traditional greek dry salami. *Ital. J. Food Sci.* **8**:25-32.
- Molinier, A.** 1985. Les produits de désinfection: fonctions actives, formulation. Gestion et maîtrise du nettoyage et de la désinfection en agro-alimentaire, Paris, 9-10 décembre.
- Moll, G. N., W. N. Konings, & A. J. Driessen.** 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**:185-198.
- Molly, K., D. Demeyer, G. Johansson, M. Raemaekers, M. Ghistelinck, & I. Geenen.** 1997. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chem.* **59**:539-545.
- Montel, M. C.** 1999. Fermented meat products, p. 744-753. *In* C. A. Batt & P. D. Patel (ed.), *Fermented foods*. Academic Press, New-York.
- Montel, M. C., & M. C. Champomier.** 1987. Arginine catabolism in *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2683-2685.
- Montel, M. C., F. Masson, & R. Talon.** 1998. Bacterial role in flavour development. *Meat Sci.* **49**:S111-S123.

- Montel, M. C., J. Reitz, R. Talon, J. L. Berdague, & S. Rousset-Akrim.** 1996. Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiol.* **13**:489-499.
- Montel, M. C., & R. Talon.** 1986. Les bactéries lactiques des viandes. *V.P.C* **7**:76-80.
- Montel, M. C., R. Talon, M. Cantonnet, & J. Fournaud.** 1992. Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**:73-77.
- Montel, M. C., R. Talon, J. Fournaud, & M. C. Champomier.** 1991. A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:469-472.
- Montel, M. C., R. Talon, J. Fournaud, & J. P. Larpent.** 1994. Fonctions des bactéries lactiques dans les produits carnés, p. 183-192. *In* H. de Roissart & F. M. Luquet (ed.), *Les bactéries lactiques*, vol. 1. Lorica, Uriage.
- Montville, T. J., K. Winkowskia, & R. D. Ludeschera.** 1995. Models and Mechanisms for Bacteriocin Action and Application. *Int. Dairy J.* **5**:797-814.
- Mora, D., M. Scarpellini, L. Franzetti, S. Colombo, & A. Galli.** 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:675-678.
- Morimoto, R. I., A. Tissières, & C. Georgopoulos.** 1990. The stress response, function of the proteins as perspectives, p. 1-36. *In* R. I. Morimoto, A. Tissières, & C. Georgopoulos (ed.), *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Morot-Bizot, S.** 2005. Maîtrise de la qualité des saucissons fermiers par les staphylocoques. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.
- Moschetti, G., G. Blaiotta, F. Villani, & S. Coppola.** 2000. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:422-424.
- Muto, A., & S. Osawa.** 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:166-169.
- Naumann, D., V. Fijala, H. Labischinski, & P. Giesbrecht.** 1988. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. *J. Mol. Struct.* **174**:165-170.
- Noonpakdee, W., S. Sitthimonchai, S. Panyim, & S. Lertsiri.** 2004. Expression of the catalase gene *katA* in starter culture *Lactobacillus plantarum* TISTR850 tolerates oxidative stress and reduces lipid oxidation in fermented meat product. *Int. J. Food Microbiol.* **95**:127-135.
- Ntsama-Essomba, C.** 1996. Mécanismes de résistance aux désinfectants d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* obtenues en biofilms. Thèse de Doctorat. Université de Paris sud, Paris, France.
- Nychas, G. J., & J. S. Arkoudelos.** 1990. Staphylococci: their role in fermented sausages. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **19**:167S-188S.
- Olesen, P. T., & L. H. Stahnke.** 2000. The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat Sci.* **56**:357-368.
- Ordóñez, J. A., E. M. Hierro, J. M. Bruna, & L. de la Hoz.** 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **39**:329-367.

- Papamanoli, E., P. Kotzekidou, N. Tzanetakis, & E. Litopoulou-Tzanetaki.** 2002. Characterization of *Micrococccaceae* isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiol.* **19**:441-449.
- Papamanoli, E., N. Tzanetakis, E. Litopoulou-Tzanetaki, & P. Kotzekidou.** 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* **65**:859-867.
- Parente, E., S. Grieco, & M. A. Crudele.** 2001. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *J. Appl. Microbiol.* **90**:943-952.
- Pieto, & Bardoneschi.** 1990. La désinfection. *In Tec&Doc* (ed.), Microbiologie alimentaire, vol. 1. Lavoisier, Paris.
- Pot, B., P. Vandamme, & K. Kersters.** 1994. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints, p. 493-521. *In* M. Goodfellow & A. G. O'Donnell (ed.), *Modern microbial methods: chemical methods in bacterial systematics*. John Wiley and Sons Ltd, London.
- Pujol, D.** 1995. Les cinq paramètres de la commercialisation, p. 27-31, La valorisation des ressources agricoles locales: l'expérience de LEADER I. Observatoire Européen de l'Innovation et du Développement rural, Bruxelles.
- Rachman, C. N., P. Kabadjova, H. Prevost, & X. Dousset.** 2003. Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminis* with 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. *J. Appl. Microbiol.* **95**:1207-1216.
- Rachman, C. N., P. Kabadjova, R. Valcheva, H. Prevost, & X. Dousset.** 2004. Identification of *Carnobacterium* Species by Restriction Length Polymorphism of the 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Region and Species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4468-4477.
- Rahkio, M., & H. Korkeala.** 1996. Microbiological contamination of carcasses related to hygiene practice and facilities on slaughtering lines. *Acta Vet. Scand.* **37**:219-228.
- Rapposch, S., P. Zangerl, & W. Ginzinger.** 2000. Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk. *J. Dairy Sci.* **83**:2753-2758.
- Rasch, M., & S. Knochel.** 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**:275-278.
- Rason, J., A. Lebecque, L. Leger, & E. Dufour.** 2003. Delineation of the sensory characteristics of traditional dry sausages. I - Typology of the traditional workshops in Massif Central. The 5th Pangborn Sensory Science Symposium: A sensory revolution, Boston, MA, USA, 20-24 Jul.
- Rason, J., A. Lebecque, L. Leger, & E. Dufour.** 2004. Saucisson secs: Diversité des ateliers fermiers charcutiers du Massif central. *V.P.C* **24**:31-41.
- Rebecchi, A., S. Crivori, P. G. Sarra, & P. S. Cocconcelli.** 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **84**:1043-1049.
- Rementzis, J., & J. Samelis.** 1996. Rapid GC analysis of cellular fatty acids for characterizing *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* strains of meat origin. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**:379-384.
- Richard, J.** 1996. Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs: Mythe ou réalité ? *Le Lait* **76**:179-189.

- Rizzo, A. F., H. Korkeala, & I. Mononen.** 1987. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2883-2888.
- Rodas, A. M., S. Ferrer, & I. Pardo.** 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:412-422.
- Rodriguez, J. M., L. M. Cintas, P. Casaus, N. Horn, H. M. Dodd, P. E. Hernandez, & M. J. Gasson.** 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:109-115.
- Rodtong, S., & G. W. Tannock.** 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3480-3484.
- Ronner, A. B., & A. C. L. Wong.** 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber. *J. Food Prot.* **56**:750-758.
- Sagripani, J. L., & A. Bonifacino.** 2000. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to liquid disinfectants on contaminated surfaces before formation of biofilms. *J. AOAC Int.* **83**:1415-1422.
- Salvat, G., M. T. Toquin, & G. Ermel.** 1997. Epidémiologie de *Listeria monocytogenes* dans la filière porcine. *V.P.C* **18**:264-268.
- Samelis, J., J. Metaxopoulos, M. Vlassi, & A. Pappa.** 1998. Stability and safety of traditional Greek salami - a microbiological ecology study. *Int. J. Food Microbiol.* **44**:69-82.
- Sanchez, I., S. Sesena, & L. Palop.** 2003. Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *Int. J. Food Microbiol.* **82**:181-189.
- Santos, E. M., C. Gonzalez-Fernandez, I. Jaime, & J. Rovira.** 1998. Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of 'chorizo'. *Int. J. Food Microbiol.* **39**:123-128.
- Sanz, Y., S. Fadda, G. Vignolo, M. C. Aristoy, G. Oliver, & F. Toldra.** 1999a. Hydrolysis of muscle myofibrillar proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*. *Int. J. Food Microbiol.* **53**:115-125.
- Sanz, Y., S. Fadda, G. Vignolo, M. C. Aristoy, G. Oliver, & F. Toldra.** 1999b. Hydrolytic action of *Lactobacillus casei* CRL 705 on pork muscle sarcoplasmic and myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.* **47**:3441-3448.
- Schillinger, U., H. S. Chung, K. Keppler, & W. H. Holzapfel.** 1998. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Microbiol.* **85**:657-663.
- Schillinger, U., M. Kaya, & F. K. Lucke.** 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:473-478.
- Schillinger, U., & F. K. Lucke.** 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* **4**:199-208.
- Schillinger, U., & F. K. Lücke.** 1990. Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. *Fleischw.* **70**:1296-1299.
- Schillinger, U., Geisen, R., & W.H. Holzapfel.** 1996. Potential antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* **7**:158-164.
- Schleifer, K. H., & E. Stackebrandt.** 1983. Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**:143-187.
- Shaw, B. G., & C. D. Harding.** 1984. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *J. Appl. Bacteriol.* **56**:25-40.

- Sheridan, J. J., B. Lynch, & D. Harrington.** 1992. The effect of boning and plant cleaning on the contamination of beef cuts in a commercial boning hall. *Meat Sci.* **32**:185-194.
- Shewmaker, P. L., A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, M. d. G. S. Carvalho, J. A. Elliott, K. Joyce, T. J. Barrett, L. M. Teixeira, & R. R. Facklam.** 2004. *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1505-1510.
- Silla Santos, M. H.** 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**:213-231.
- Smith, J. L., & S. A. Palumbo.** 1983. Use of starter cultures in meats. *J. Food Prot.* **46**:997-1006.
- Snijders, J. M., J. G. van Logtestijn, D. A. Mossel, & F. J. Smulders.** 1985. Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *Vet. Q.* **7**:277-282.
- Sobrinho, O. J., J. M. Rodriguez, W. L. Moreira, M. F. Fernandez, B. Sanz, & P. E. Hernandez.** 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **13**:1-10.
- Song, H. J., & J. Richard.** 1997. Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol.* **36**:155-161.
- Sperber, W. H., & J. Swan.** 1976. Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**:990-991.
- Stackebrandt, E., & B. M. Goebel.** 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.
- Stahnke, L. H., A. Holck, A. Jensen, A. Nilsen, & E. Zanardi.** 2002. Maturity acceleration of Italian dried sausage by *Staphylococcus carnosus*—Relationship between maturity and flavor compounds. *J. Food Sci.* **67**:1914-1921.
- Stanley, P. M.** 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol.* **29**:1493-1499.
- Stiles, M. E., & W. H. Holzappel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**:1-29.
- Sunesen, L. O., & L. H. Stahnke.** 2003. Mould starter cultures for dry sausages—selection, application and effects. *Meat Sci.* **65**:935-948.
- Suzzi, G., & F. Gardini.** 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:41-54.
- Sylvander, B.** 1994. La qualité: du consommateur final au producteur. *Etud. Rech. Syst. Agraires Dév.* **28**:27-49.
- Tailliez, P., J. Tremblay, S. D. Ehrlich, & A. Chopin.** 1998. Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:530-538.
- Talon, R., J. Labadie, & J. P. Larpent.** 1980. Characterization of the inhibitory power of *Lactobacillus* of meat origin. *Zentralbl. Bakteriol. [B]* **170**:133-142.
- Talon, R., S. Leroy-Sétrin, & S. Fadda.** 2002. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products, p. 175-191. *In* F. Toldra (ed.), *Research advances in the quality of meat and meat products*. Research Signpost, Kerala.
- Tannock, G. W., A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, J. Ng, K. Munro, & T. Alatossava.** 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4264-4267.
- Tantillo, M. G., P. A. Di, & L. Novello.** 2002. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sake* as starter culture in dry sausages. *New Microbiol.* **25**:45-49.

- Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel, & W. P. Hammes.** 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH 673. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:460-468.
- Turakhia, M. H., & W. G. Characklis.** 1989. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: Effect of calcium. *Biotechnol. Bioeng.* **33**:406-414.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, & J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407-438.
- Vaneechoutte, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, & K. Kersters.** 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **72**:227-233.
- Vasseur, C.** 1999. Etudes physiologiques et moléculaires de la réponse bactérienne à des stress physico-chimiques pour l'élaboration des traitements sélectifs de décontamination des ateliers agro-alimentaires. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Vauterin, L., & P. Vauterin.** 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Europ. Microbiol.* **1**:37-41.
- Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy, G. Prevost, C. Lapeyre, M. Bes, Y. Brun, & J. Fleurette.** 1996. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **30**:271-280.
- Viallon, C.** 1996. Incidence des Levures sur la flaveur du saucisson sec. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- Vignolo, G. M., F. Suriani, A. Pesce de Ruiz Holgado, & G. Oliver.** 1993. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:344-349.
- Villani, F., L. Sannino, G. Moschetti, G. Mauriello, O. Pepe, R. Amodio-Cocchieri, & S. Coppola.** 1997. Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosum* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages. *Food Microbiol.* **14**:555-566.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, et al.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**:4407-4414.
- Ward, D. M., R. Weller, & M. M. Bateson.** 1990. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well-studied thermal community. *FEMS Microbiol. Rev.* **6**:105-115.
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, & H. G. Trüper.** 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:463-464.
- Weber, H.** 1994. Dry sausage manufacture: The importance of protective cultures and their metabolic products. *Fleischw.* **74**:278-282.
- Weidner, S., W. Arnold, & A. Puhler.** 1996. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:766-771.
- Wiatr, C. L.** Feb, 19 1991. Enzyme blend containing cellulase to control industrial slime. USA patent 4994390.
- Williams, A. G., & J. W. Wimpenny.** 1978. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **104**:47-57.

- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, & S. V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-6535.
- Wimpenny, J., W. Manz, & U. Szewzyk.** 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:661-671.
- Wood, B. J. B., & W. H. Holzapel.** 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Yu, S. L., D. Bolton, C. Laubach, P. Kline, A. Oser, & S. A. Palumbo.** 1999. Effect of dehairing operations on microbiological quality of swine carcasses. *J. Food Prot.* **62**:1478-1481.
- Zakrzewska-Czerwinska, J., M. Mordarski, & M. Goodfellow.** 1988. DNA base composition and homology values in the classification of some *Rhodococcus* species. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2807-2813.
- Zeuthen, P.** 1995. Historical aspects of meat fermentations, p. 53-68. *In* G. Campbell-Platt & P. E. Cook (ed.), *Fermented meats*. Blackie Academic & Professional, London.
- Zlotkin, A., A. Eldar, C. Ghittino, & H. Bercovier.** 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**:983-985.
- Zottola, E. A.** 1997. Microbial biofilms: a concern for the meat industry? *In*: the World Congress on Food Hygiene, The Hague, The Netherlands.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Liste des produits chimiques autorisés au contact des denrées alimentaires

(Arrêté du 27 octobre 1975 modifié par les arrêtés du 5 avril 1991 et du 15 juin 1993) (Leyral et Vierling, 1997)

L'article 10 du décret du 12/2/1973 précise qu'il est interdit d'utiliser, dans les industries et commerces de l'alimentation des matériaux ou objets destinés à être mis en contact de denrées alimentaires dont la propreté n'aura pas été assurée. Seules sont autorisés les substances figurant sur la liste ci-de

ssous à l'exception des colorants alimentaires autorisés et des matières premières aromatiques inoffensives à condition que leur addition ait pour seul but de donner à spécialité commerciale un caractère destiné à le distinguer d'autres produits. La liste des constituants autorisés est fixée par avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique. Pour un certain nombre de substances, les textes réglementaires précisent les formules ou la structure générale, les concentrations et éventuellement les critères de pureté, les indications et limites d'utilisation.

AGENTS DE SURFACE PRPREMENT DITS :

1-Agents de surfaces anioniques :

- ◆ Savons (sels alcalins des acides gras et résiniques)
- ◆ Alkylsulfates alcalins
- ◆ Alkylsulfonates alcalins
- ◆ Dioctyl-sulfosuccinate d'alpha oléfines
- ◆ Alkylaryl-polyglycol éther-sulfonates alcalins
- ◆ Acides mono et dialkyl-diphényl-oxyde disulfoniques et leurs sels alcalins.

2-Agents de surfaces cationiques (y compris les substances utilisées pour leurs effets désinfectants) :

- ◆ Chlorure ou bromure de triméthyl-alkyl-ammonium
- ◆ Chlorure ou bromure de diméthyl-dialkyl-ammonium
- ◆ Chlorure ou bromure de méthyl-trialkyl-ammonium
- ◆ Chlorure ou bromure de diméthyl-arylalkyl-ammonium
- ◆ Chlorure ou bromure de diméthyl-éthylaryl-ammonium
- ◆ Chlorure ou bromure de méthyl-aryl-dialkyl-ammonium
- ◆ Chlorure ou bromure d'aryl-trialkyl-ammonium
- ◆ Chlorure ou bromure de méthyl-diaryl-dialkyl-ammonium
- ◆ Chlorure ou bromure de diméthyl-arylalkyl-phenoxy-éthoxyéthyl-ammonium
- ◆ Chlorure ou bromure d'alkyl-benzyl-imidazolium
- ◆ Chlorure d'alkyl pyrinidium
- ◆ Chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium.

3-Agents de surfaces non anioniques :

- ◆ Acides gras et résines polyéthoxylés
- ◆ Propylène-glycols polyéthoxylés
- ◆ Lanoline polyhydroxylée
- ◆ Alcools gras polyéthylés et les sels alcalins de leurs dérivés sulfatés et leurs éthers benzyliques
- ◆ Sucroglycérides de suif oxyéthyléné
- ◆ Alcanolamides d'acides gras
- ◆ Esters d'acides gras de saccharose et sucroglycérides
- ◆ Mono et di-stéarates de saccharose
- ◆ Mono et di-palmitates de saccharose
- ◆ Mono et di-oléarates de saccharose
- ◆ Sucroglycérides des acides gras et des corps gras alimentaires
- ◆ Oxyde de dodécyl-diméthyl-amine
- ◆ Monolaurate de polyoxyéthylène
- ◆ Sorbitane ou polysorbitane
- ◆ Ethoxylats d'alcools gras bloqués en bout de chaîne par un radical butyle
- ◆ Caprylil-capryl-glucoside
- ◆ Esters de polyols polyéthoxylés.

4-Agents de surfaces amphotères (ou ampholytes)

- ◆ 1 alkyl, 3 diméthyl-ammonio propane, 3 carboxy-méthylbétaine.

DESINFECTANTS :

- ◆ Eau oxygénée
- ◆ Hypochlorites alcalins
- ◆ Chlorure de chaux
- ◆ Paratoluène chlorosulfamide sodée
- ◆ Alcool éthylique
- ◆ Butylglycol
- ◆ Chlorhydrate de décyloxy-3, hydroxy-2, amino-1 propane
- ◆ Chlorhydrate de poly(hexaméthylène biguanide)
- ◆ Acide peracétique
- ◆ Acides chlorocyanuriques
- ◆ Acide sorbique
- ◆ Dichloroglycoluril
- ◆ Acide hydroxyacétique
- ◆ Alcool isopropylique.
- ◆ Glutaraldéhyde
- ◆ Permanganate de potassium
- ◆ Chlorure d'iode
- ◆ dioctyléthylène triamine
- ◆ Laurylpropylène triamine
- ◆ Acide laurylpropylène-diaminoacétique
- ◆ Aldéhyde formique
- ◆ Bromure de potassium
- ◆ Acide sorbique
- ◆ Lauryldiéthylène triamine
- ◆ Dio ou trioctyldiéthylène triamine
- ◆ Acide octylphosphonique
- ◆ Chlorure d'iode
- ◆ Acide lauryldiéthylène-triaminoacétique.

DIVERS:

1-Acides (effet désincrustant et détartrant)

- ◆ Acide sulfurique
- ◆ Acide chlorhydrique
- ◆ Acide nitrique
- ◆ Acide orthophosphorique
- ◆ Acide acétique
- ◆ Acide alkyl-sulfonique
- ◆ Acide alkylaryl-sulfonique
- ◆ Acide lactique
- ◆ Acide citrique
- ◆ Acide tartrique
- ◆ Acide sulfamique
- ◆ Acide adipique
- ◆ Acide succinique.

2-Bases

- ◆ Soude caustique
- ◆ Potasse caustique
- ◆ Chaux
- ◆ Ammoniaque
- ◆ Alcanolamides.

3-Sels minéraux

- ◆ Carbonates alcalins
- ◆ Bicarbonates alcalins
- ◆ Percarbonates alcalins
- ◆ Perborate de sodium
- ◆ Carbonate de magnésium
- ◆ Phosphates alcalins

6-Azurants optiques

- ◆ Bis (phénylurée)-4,4' stilbène disulfonate-2,2' de sodium
- ◆ Bis ((phénylamino 2) diéthanolamino 6) triazinyl 1,3,5 amino 4)-4,4' stilbène disulfonate-2,2' de sodium

- ◆ Phosphate trisodique chloré
- ◆ Sulfate de magnésium
- ◆ Sulfates alcalins
- ◆ Bisulfates alcalins
- ◆ Bisulfites alcalins (anhydride sulfureux)
- ◆ Sulfate d'aluminium
- ◆ Silicates alcalins
- ◆ Silicoaluminate de sodium
- ◆ chlorures alcalins
- ◆ Chlorure d'ammonium.

4-Charges et adjuvants insolubles

- ◆ Carbonate de calcium
- ◆ Ponce
- ◆ Silice pulvérulente, kieselghur et autres Substances inertes.

5-Séquestrants

- ◆ Polyphosphates alcalins
- ◆ Gluconates alcalins
- ◆ Glucoheptonates alcalins
- ◆ EDTA et ses sels
- ◆ Acide hydroxyéthylène diphosphonique
- ◆ Acide amino-tris-méthylène diphosphonique
- ◆ Acide phosphono-3 carboxyhexane dioïque
- ◆ Acide polyacrylique et polyacrylates de sodium
- ◆ Acide diéthylène triamine-penta (méthylène phosphonique)
- ◆ Polyacide phosphatino-carboxylique.
- ◆ Gomme xanthane, alginates, carraghénates et pectines
- ◆ Phosphates acide de stéaryle
- ◆ Polyvinyle pyrrolidone
- ◆ Copolymères acryliques
- ◆ Polymères réticulées de l'acide acrylique
- ◆ Stéarate d'aluminium

- ◆ Bis ((diphénylamino 2) triazinyl 1,3,5 amino 4)-4,4' stilbène disulfonate-2,2' de sodium
 - ◆ Bis ((phénylamino 2) méthyléthanolamino 6) triazinyl 1,3,5 amino 4)-4,4' stilbène disulfonate-2,2' de sodium
 - ◆ Bis ((parachlorophénylamino 2) dicyanoéthanolamino 6) triazinyl 1,3,5 amino 4)-4,4' stilbène disulfonate-2,2' de sodium
 - ◆ Bis ((anilino 2) méthoxyéthylène amino 6) triazinyl 1,3,5 amino 4)-4,4' stilbène disulfonate-2,2' de sodium
 - ◆ Bis ((phénylamino 2) morpholino 6) triazinyl 1,3,5 amino 4)-4,4' stilbène disulfonate-2,2' de sodium
 - ◆ (Diméthylamino 3-5) méthylcarboxylamide 6) (sulfamyl 3) phényl carboxylamide 2 pyrazine
 - ◆ (Parasulfamidophényl 1) (parachlorophényl 3) (dihydro 4-5) pyrazole
 - ◆ Alpha (benzimidazolyl 2) bêta (N-hydroxyéthylbenzimidazolyl 2) éthylène.
- 7-Agents antimousse et antiredéposition**
- ◆ Méthyle polysiloxanes
 - ◆ Méthylcellulose, carboxyméthylcellulose, éthylcellulose

- ◆ Acide benzoïque et sels de sodium, potassium et magnésium
- ◆ 2-bromo-2- nitropropane 1,3 diol
- ◆ 1-2 benzoisothiazoline-3-one
- ◆ Orthophényl phénolate de sodium

8-Agents auxiliaires

- ◆ Urée
- ◆ Alcool benzylique
- ◆ Glycol
- ◆ Enzymes
- ◆ Propylène glycol
- ◆ Sorbitol
- ◆ Acide borique.

9-Colorants

- ◆ Colorants alimentaires autorisés par la réglementation
- ◆ Colorants pyranine
- ◆ Bleu brillant FCF

10-Solvants

- ◆ Trichloro 1,1,2-trifluoro-1,2,2-éthane
- ◆ Monoéthyl ester du propylène glycol
- ◆ Monoéthyl ester du dipropylène glycol.

SUBSTANCES ADMISES DANS LES PRODUITS DE RINÇAGE DE LA VAISSELLE

- ◆ Acides citrique, acétique, lactique, hydroxy-1 éthane diphosphonique-1,1
- ◆ Alcools éthylique et isopropylique
- ◆ Agents de surface
- ◆ Copolymères d'oxydes d'éthylène et de propylène
- ◆ Sucroglycérides de suif oxyéthyléné

- ◆ Copolymères d'alkyl éthers et d'oxydes d'éthylène et de propylène.
- ◆ Ethoxylates d'alcools gras bloqués en bout de chaîne par un radical butyle
- ◆ Cumène sulfonate de sodium
- ◆ Xylène sulfonate de sodium
- ◆ Condensats et d'oxyde de butylène
- ◆ Polymères acryliques.

ANNEXE 2 : Principaux désinfectants utilisés dans l'agro-alimentaire

COMPOSES		AVANTAGES	INCONVENIENTS
HALOGENES	Dérivés chlorés	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Spectre d'activité étendu ◆ Faible coût ◆ Facilement rinçables 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Résidus toxiques ◆ Irritant ◆ Inactivé par les matières organiques ◆ Activité diminuée avec l'augmentation du pH ◆ Mauvaise stabilité ◆ Corrosifs
	Iodophores	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Spectre d'activité étendu ◆ Faible toxicité 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Coût plus élevé ◆ Irritant ◆ Phénomène de coloration, forment un complexe pourpre en présence d'amidon ◆ Inactivé par les matières organiques ◆ Corrosifs ◆ Difficilement rinçables
OXYDANTS	Ozone	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Spectre d'activité étendu ◆ Pas de résidu toxique ◆ Peu corrosif ◆ Facilement rinçable 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Irritant ◆ Fortement inactivé par les matières organiques ◆ Utilisation limitée aux pH acides à neutre ◆ Mauvaise stabilité
	Eau oxygénée	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Pas de résidu toxique ◆ Non Irritant ◆ Peu corrosif ◆ Facilement rinçable 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Spectre d'activité étroit (bactéricide) ◆ Inactivé par les matières organiques ◆ Utilisation limitée aux pH acides à neutre ◆ Mauvaise stabilité
	Acide peracétique	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Spectre d'activité étendu ◆ Pas de résidu toxique ◆ Efficace à basse température ◆ Facilement rinçable 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Irritant ◆ Inactivé par les matières organiques ◆ Mauvaise stabilité ◆ Corrosif

ANNEXE 2 (Suite)

COMPOSES		AVANTAGES	INCONVENIENTS
ALDEHYDES	Formol	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Spectre d'activité étendu ◆ Faible coût ◆ Peu sensible aux matières organiques ◆ Peu sensible au pH ◆ Stabilité en solution ◆ Peu corrosif ◆ Facilement rinçable 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Résidus toxiques, forte odeur ◆ Irritant ◆ Action lente
	Glutaraldéhyde	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Spectre d'activité étendu ◆ Peu toxique et moins irritant que le formol ◆ Action plus rapide que le formol ◆ Peu sensible aux matières organiques ◆ Peu corrosif ◆ Facilement rinçable 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Plus coûteux que le formol ◆ Stabilité délicate
	Ammonium quaternaire	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Très faible toxicité, ne libèrent aucune odeur ◆ Non Irritant ◆ Très grande stabilité ◆ Non corrosifs ◆ Activité détergente (pouvoir mouillant) 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Spectre d'activité étroit (bactéries Gram positif) ◆ Phénomènes de résistance acquise ◆ Coût élevé ◆ Inactivés par les matières organiques ◆ Difficilement rinçable (Formation de films résiduels)
	Amphotères	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Spectre d'activité étendu ◆ Très faible toxicité (biodégradabilité importante) ◆ Non Irritants ◆ Peu sensibles aux matières organiques ◆ Bonne stabilité ◆ Non corrosifs ◆ Activité détergente (pouvoir mouillant) ◆ Préviennent les dépôts minéraux 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Coût élevé ◆ Efficacité limitée à pH<3 ◆ Difficilement rinçable (Formation de mousse)

ANNEXE 3 : Liste des publications

1. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

1. 1. Articles

1.1. 1. Périodiques

1. **Ammor, S.**, Chevallier, I., Laguët, A., Labadie, J., Talon, R. & Dufour, E., **2003**. Improvement of food quality and safety in meat traditional workshops. *Science des Aliments*, 23(1), pp.101-103.
2. **Ammor, S.**, Chevallier, I., Laguët, A., Labadie, J., Talon, R. & Dufour, E., **2004**. Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria. *Food Microbiology*, 21(1), pp. 11-17.
3. **Ammor, S.**, Yaâkoubi, K., Chevallier, I. & Dufour, E., **2004**. Identification by fluorescence spectroscopy of lactic acid bacteria isolated from small-scale facility producing dry sausages. *Journal of Microbiological Methods*, 59(2), pp. 271-281.
4. **Ammor, S.**, Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E. & Chevallier, I., **2005**. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22(5), pp. 373-382.
5. **Ammor, S.**, Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S. & Chevallier, I., **2005**. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* species isolated from traditional dry-sausages for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology*, 22(6), pp. 529-538.
6. Chevallier, I., **Ammor, S.**, Laguët, A., Labayle, S., Castanet, V., Dufour, E. & Talon, R., **2006**. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Control*, 17(6), pp. 446-453.
7. **Ammor, S.**, Tauveron, G., Dufour, E. & Chevallier, I., **2006**. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same small-scale facility producing traditional dry sausages: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17(6), pp. 454-461.
8. **Ammor, S.**, Tauveron, G., Dufour, E. & Chevallier, I., **2006**. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same small-scale facility producing traditional dry sausages: 2- Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in artificially made binary biofilms including a bacteriocin-like producing lactic acid bacteria. *Food Control*, 17(6), pp. 462-468.

1.1.2. Mémoires et thèse

1. **Ammor, S.**, **2000**. Suivi technico-économique et qualitatif de la fabrication du fromage frais de chèvre au Maroc. Mémoire d'Ingénieur en Sciences Agricoles, ESAM.

2. **Ammor, S., 2001.** Etude de quelques procédures de désinfection sur des biofilms microbiens, en vue de la mise en place d'une décontamination sélective en ateliers fermiers charcutiers. Mémoire du DEA Nutrition et Sciences des Aliments, Université Blaise Pascal.
3. **Ammor, S., 2004.** Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Docteur en physico-chimie et Qualité des Bioproduits, ENSAR.

1.1.3. Communications à des colloques ou congrès

1. Chevallier, I., **Ammor, S.**, Laguet, A., Talon, R., Dufour, E. & Labadie, J., **2002.** Application de la démarche d'écologie microbienne dirigée dans un atelier fermier charcutier (II): Décontamination sélective de la flore de l'atelier. 13^{èmes} Rencontres Agoral, 26-27 mars, Nancy (France), Affiche.
2. **Ammor, S.**, Chevallier, I., Laguet, A., Dufour, E., Talon, R. & Labadie, J., **2002.** Gestion de la qualité hygiénique et organoleptique dans les ateliers fermiers charcutiers. 9^{èmes} Journées des Sciences du Muscle et de Technologie de la Viande, 15-16 Octobre, Clermont-Ferrand (France), Affiche.
3. **Ammor, S.**, Chevallier, I. & Dufour, E., **2003.** Etude de l'écosystème d'un atelier fermier charcutier : Dénombrement et identification des bactéries lactiques. 12^{ème} réunion du Club des Bactéries Lactiques, 19-21 Mai, Aurillac (France), Affiche.
4. **Ammor, S.**, Chevallier, I. & Dufour, E., **2003.** Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from traditional dry sausage workshop. In: 1st FEMS Congress, 29 June - 3 July, Ljubljana (Slovénie), Poster.
5. Chevallier, I., Tauveron, G., **Ammor, S.**, Laguet, A. & Dufour, E., **2003.** Capacité des bactéries lactiques d'atelier fermier de salaison à inhiber les flores pathogènes et d'altérations en biofilm. Détection, dénombrement et caractérisation des micro-organismes dans la chaîne alimentaire: Intérêts et limites, 13-14 Novembre, Paris (France), Affiche.
6. **Ammor, S.**, Yaâkoubi, K., Chevallier, I. & Dufour, E., **2004.** La spectroscopie de fluorescence : un outil pour l'identification de bactéries lactiques des produits carnés. VI^{ème} Congrès National de la SFM, 10-12 Mai, Bordeaux (France), Communication orale.
7. **Ammor, S.**, Chevallier, I. & Dufour, E., **2004.** Activités antibactériennes des bactéries lactiques isolées d'un atelier fermier de salaison. VI^{ème} Congrès National de la SFM, 10-12 Mai, Bordeaux (France), Affiche.
8. **Ammor, S.**, Rachman, C., Dufour, E., Prévost, H., Dousset, X. & Chevallier, I., **2004.** Description of a new strain of *Vagococcus carniphilus* isolated from the processing equipment in a small-scale facility producing traditional dry-sausages. In: Food safety under extreme conditions, 6-8 September, Jaén (Espagne), Poster.
9. Chevallier, I., **Ammor, S.** & Dufour, E., **2004.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional workshop producing dry sausages. In: Food safety under extreme conditions, 6-8 September, Jaén (Espagne), Communication orale.

10. **Ammor, S.**, Chevallier, I. & Dufour, E., **2004**. Ecologie microbienne dirigée au niveau des ateliers fermiers de salaison : sélection de bactéries lactiques pour le rôle de ferment. 13^{ème} réunion du Club des Bactéries Lactiques, 8-10 Septembre, Nantes (France), Communication orale.
11. Yaakoubi, K., **Ammor, S.**, Dufour, E. & Chevallier, I., **2004**. Identification des bactéries lactiques isolées d'un atelier fermier par des méthodes moléculaires et spectroscopiques. 13^{ème} réunion du Club des Bactéries Lactiques, 8-10 Septembre, Nantes (France), Affiche.
12. **Ammor, S.**, Chevallier, I. & Dufour, E., **2004**. Ecologie microbienne dirigée au niveau des ateliers fermiers de salaison : un moyen de préserver la typicité des saucissons secs fermiers du Massif central. Colloque Produits Alimentaires Fermiers, 6-7 Octobre, Lempdes (France), Communication orale.

1.2. Synthèse scientifique

1.2.1. Communications présentées à des congrès et publiées dans une revue à comité de lecture ou un ouvrage

1. Chevallier, I., **Ammor, S.**, Laguet, A., Talon, R., Dufour, E. & Labadie, J., **2002**. Application de la démarche d'écologie microbienne dirigée dans un atelier fermier charcutier (II): Décontamination sélective de la flore de l'atelier. In : Prévission, Analyse et Gestion du Risque Alimentaire. Tec & Doc (Eds.), Lavoisier, Paris, pp. 345-350.
2. Chevallier, I., **Ammor, S.**, Laguet, A., Talon, R., Labadie, J. & Dufour, E., **2002**. Hygiène et sécurité des produits de montagne, le cas des ateliers fermiers. In : Agriculture et produits alimentaires de montagne. G., Giraud & M., Petit (Eds.), ENITA, Lempdes, pp. 99-103.
3. **Ammor, S.**, Chevallier, I. & Dufour, E., **2003**. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from traditional dry sausage workshop. FEMS Microbiology Letters, 222 (S1), pp.132.
4. **Ammor, S.**, Chevallier, I. & Dufour, E., **2004**. Ecologie microbienne dirigée au niveau des ateliers fermiers de salaison : un moyen de préserver la typicité des saucissons secs fermiers du Massif central. In : Produits Alimentaires Fermiers. E., Dufour (Eds.), ENITA, Lempdes, pp. 127-128.

2. DOCUMENTS A VOCATION DE TRANSFERT

2.1. Rapports techniques et séminaires

2.1.1. Rapports techniques

1. **Ammor, S.**, **1998**. Etude monographique de la zone d'action du centre de travaux 32-03. Synthèse pour la Direction Provinciale d'Agriculture de Fès.
2. **Ammor, S.**, **1999**. La filière "Lait" du Maroc: diagnostic et perspectives de développement. Synthèse pour le Bureau du Lait du Ministère Marocain de l'Agriculture, du Développement Rural et des Eaux et Forêts.

3. **Ammor, S.,** Corre, S., Le Carrou, J., Mevellec, M., Theraud, M. **2003.** Quel est l'intérêt des esters de l'acide butyrique dans l'alimentation du porc et du veau de boucherie ? Synthèse pour la société XERIS SA.

2.1.2. Séminaires

1. **Ammor, S., 2004.** Ecologie microbienne dirigée dans les ateliers fermiers de salaison. UQMAA-ENITIAA, 23 Février, Nantes (France).

2.2. Travaux co-encadrés

1. Moussa, M., **2002.** Contribution à la mise en place de méthodes analytiques pour le contrôle de la qualité microbiologique des fromages de chèvre. Stage de fin d'étude de l'ESA de Mograne (Tunisie).
2. Yesraoui, R. **2002.** Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques d'un fromage de chèvre élaboré par une technique locale (fromage frais et affiné à croûte fleurie). Stage de fin d'étude de l'ENA de Meknès (Maroc).
3. Tauveron, G., **2003.** Capacité des bactéries lactiques d'atelier fermier de salaison à inhiber les flores pathogènes et d'altérations en biofilm. Stage de DEA Nutrition et Sciences des Aliments, Clermont-Ferrand.
4. Yaakoubi, K., **2004.** Identification des bactéries lactiques isolées d'un atelier fermier par des méthodes moléculaires et spectroscopiques. Stage de DEA Nutrition et Sciences des Aliments, Clermont-Ferrand.