

Juin 2021

# Impact écologique et technologique de *Hafnia alvei* au cours de la conservation de viande de bœuf sous vide

IDELE, Service Qualité des carcasses et des viandes  
Mathilde HAZON, Mickaël FLEURY, Salomé MARTIN,  
Christophe DENOYELLE, Clémence BIECHE-TERRIER  
IDELE, laboratoire d'analyses et de technologie de produits  
Valérie HARDIT, Catherine MALAYRAT



Université de Caen, E.A. 4651 ABTE Aliments  
Bioprocédés Toxicologie Environnements  
Nathalie DESMASURES, Jean-Michel BRÉ, Claire  
PISTIEN, Aziz SMIRA



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Économie **Environnement** Bien-être animal Hygiène **Sécurité sanitaire** Nutrition **SANTÉ** Consommation  
**Environnement** Bien-être animal Hygiène **Sécurité sanitaire** Nutrition **SANTÉ** Consommation Économie  
Bien-être animal Hygiène **Sécurité sanitaire** Nutrition **SANTÉ** Consommation Économie **Environnement**  
Hygiène **Sécurité sanitaire** Nutrition **SANTÉ** Consommation Économie **Environnement** Bien-être animal  
**Sécurité sanitaire** Nutrition **SANTÉ** Consommation Économie **Environnement** Bien-être animal Hygiène  
Nutrition **SANTÉ** Consommation Économie **Environnement** Bien-être animal Hygiène **Sécurité sanitaire**  
**SANTÉ** Consommation Économie **Environnement** Bien-être animal Hygiène **Sécurité sanitaire** Nutrition  
Consommation Économie **Environnement** Bien-être animal Hygiène **Sécurité sanitaire** Nutrition **SANTÉ**  
Économie **Environnement** Bien-être animal Hygiène **Sécurité sanitaire** Nutrition **SANTÉ** Consommation

Juin 2021

# Impact écologique et technologique de *Hafnia alvei* au cours de la conservation de viande de bœuf sous vide

## Contexte général

La bonne conservation des produits est un enjeu économique et sociétal pour l'industrie agroalimentaire. Des contrôles sont mis en place pour écarter les produits à mauvaise conservation (microbiologique ou organoleptique). Une précédente étude réalisée dans le cadre de l'appel à projet 2015 (SECU-15-13) a caractérisé les flores bactériennes présentes sur de la viande bovine conditionnée sous vide. Il a alors été mis en évidence que l'espèce *Hafnia alvei* peut être liée à des cas de conservations atypiques (c'est-à-dire dont les développements bactériens dépassent les seuils de conformité sans altérer les produits), responsables de pertes économiques pour la filière.

## Objectifs

L'objectif de ce projet est d'étudier spécifiquement *Hafnia alvei* pour améliorer la connaissance et la détection, voire, si nécessaire, la maîtrise de cette bactérie parmi la flore microbienne des viandes.

Suite à une étude bibliographique sur les bactéries associées à la viande, aux défauts de conservation et précisant les caractéristiques de *Hafnia alvei*, le projet s'est organisé en deux parties expérimentales décrites dans l'encadré ci-contre afin de :

- Etudier la cinétique de développement de *Hafnia alvei* dans la viande de bœuf dans différentes conditions de conservation ;
- Développer une méthode moléculaire spécifique de quantification de *Hafnia* dans les matrices carnées.

## Dispositif expérimental

### 1) Cinétique de contamination :



Analyse sensorielle et microbiologique (*Enterobacteriaceae* et flore aérobie mésophile)

### 2) Méthode de quantification :

- Extraction d'ADN à partir de 66 isolats proches de *Hafnia alvei*
- Typage moléculaire par ERIC-PCR
- Identification d'amorces et validation par PCR point final
- Mise au point d'un protocole de qPCR en laboratoire puis sur matrice carnée

## Principaux résultats

Par inoculation de souches de *Hafnia alvei* sur de la viande sous vide préalablement cautérisée, cette étude a montré que la bactérie n'entraînait pas d'altération de l'aspect visuel ou odorant de la viande lors d'une conservation sous vide à 2 ou 4°C pendant 40 jours.

La croissance des populations bactériennes a lieu principalement entre 0 et 30 jours de conservation puis se stabilise à environ  $8.10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> pour *Hafnia alvei* et  $1,5.10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> pour la flore aérobie mésophile. Dans cette étude, la température de conservation ne semble pas influencer les effectifs bactériens.

Ce travail a permis de souligner la diversité des souches de *Hafnia* isolées à partir de viande de bœuf conditionnée sous vide avec 17 géotypes mis en évidence et une capacité variable à produire du gaz. En ce qui concerne la mise au point d'une méthode d'analyse sélective pour *Hafnia alvei*, bien que la définition d'amorces spécifiques de l'espèce *Hafnia alvei* se soit révélée relativement complexe, les essais réalisés en PCR quantitative mettent en avant l'intérêt du couple qF1dc2/qR1dc2 qui présente les meilleures performances.

## Pour en savoir plus

mathilde.hazon@idele.fr

nathalie.desmasures@unicaen.fr



Juin 2021  
Compte rendu N° 0021401007

IDELE, Service Qualité des carcasses et des viandes  
Mathilde HAZON, Mickaël FLEURY, Salomé MARTIN,  
Christophe DENOYELLE, Clémence BIECHE-TERRIER  
IDELE, Laboratoire d'analyses et de technologie des produits  
Valérie HARDIT, Catherine MALAYRAT



Université de Caen, Laboratoire ABTE Aliments  
Bioprocédés Toxicologie Environnements  
Nathalie DESMASURES, Jean-Michel BRE, Claire PISTIEN,  
Aziz SMIRA



# Impact écologique et technologique de *Hafnia alvei* au cours de la conservation de viande de bœuf sous vide

Etude financée par Interbev

Projet SECU-18-25

# Table des matières

1. Introduction.....	7
1.1. Contexte.....	7
1.2. Objectifs et déroulement du projet.....	7
2. Etude bibliographique .....	9
2.1. Populations bactériennes associées à la viande .....	9
2.1.1. Présentation générale des populations bactériennes.....	9
2.1.2. Evolution des populations bactériennes au cours de la conservation .....	10
2.1.3. Populations bactériennes associées à une mauvaise conservation des viandes sous vide .....	10
2.2. <i>Hafnia alvei</i> : taxonomie et caractéristiques .....	11
2.2.1. Historique et taxonomie.....	11
2.2.2. Caractérisation de <i>Hafnia alvei</i> .....	12
2.2.3. Activité et capacités de <i>Hafnia alvei</i> .....	16
2.3. Conclusion.....	18
3. Etude expérimentale.....	19
3.1. Etude par contamination artificielle de la croissance de <i>Hafnia alvei</i> sur la conservation de la viande bovine conditionnée sous vide .....	19
3.1.1. Matériel et méthodes.....	19
3.1.2. Résultats et interprétations .....	22
3.1.3. Conclusion.....	27
3.2. Caractérisation d'isolats et mise au point d'une méthode qPCR pour la quantification de l'espèce <i>Hafnia alvei</i> dans les viandes bovines conditionnées sous vide .....	28
3.2.1. Matériels et méthodes.....	28
3.2.2. Résultats et discussion.....	36
3.2.3. Conclusion.....	55
4. Conclusions et perspectives.....	56
4.1. Perspectives .....	56
5. Références bibliographiques.....	57
6. Annexes.....	62
6.1. Souches utilisées dans cette étude .....	62
6.2. Hauteur de gaz (mm) dans la cloche Durham à 30°C en aérobiose par 66 isolats bactériens proches de <i>Hafnia</i> provenant de viande de bœuf sous vide .....	64
6.3. Hauteur de gaz (mm) dans la cloche Durham à 5°C en aérobiose par 66 isolats bactériens proches de <i>Hafnia</i> provenant de viande de bœuf sous vide .....	65
6.4. Hauteur de gaz (mm) dans la cloche Durham à 30°C en anaérobiose par 66 isolats bactériens proches de <i>Hafnia</i> provenant de viande de bœuf sous vide.....	66



# 1. Introduction

## 1.1. Contexte

La conservation des produits est un enjeu économique et sociétal pour l'industrie agroalimentaire. C'est un sujet de recherche en constante évolution et les innovations permettent d'assurer une maîtrise du produit ainsi qu'une prolongation de sa durée de vie. Des contrôles sont mis en place pour écarter les produits à mauvaise conservation.

Une précédente étude réalisée dans le cadre de l'appel à projet 2015 (SECU-15-13) (Bièche-Terrier et al., 2018) et conduite en partenariat avec l'Université de Caen avait pour but de caractériser les flores bactériennes présentes dans les muscles et portions unitaires de viandes bovines conditionnées sous vide. Cette étude s'est notamment basée sur des analyses métagénomiques permettant d'identifier des espèces bactériennes de manière plus approfondie par rapport à la culture bactérienne utilisée habituellement pour réaliser les analyses microbiologiques de la viande. En particulier, parmi les produits supposés présenter une mauvaise conservation d'après une analyse bactériologique portant sur la flore aérobie mésophile et les entérobactéries, l'étude a distingué des produits à conservation « atypique », c'est-à-dire dont la conservation est bonne d'un point de vue sensoriel malgré des développements bactériens dépassant les seuils de conformité établis par les professionnels de la viande. L'un des cas identifiés de conservation atypique concerne des produits dans lesquels les taux d'*Enterobacteriaceae* dépassent les seuils de conformité actuellement recommandés par les professionnels de la viande de boucherie. Or il se trouve que dans ce cas précis de conservation atypique, l'analyse métagénomique a permis de distinguer que les *Enterobacteriaceae* sont dominées par l'espèce *Hafnia alvei*.

Les entreprises de viande se sont alors demandé s'il était possible de distinguer ces produits à taux élevés en *Hafnia alvei*, potentiellement propres à la consommation, afin de les commercialiser plutôt que de les refuser pour « non-conformité ».

## 1.2. Objectifs et déroulement du projet

L'objectif de ce projet est d'étudier spécifiquement *Hafnia alvei* pour améliorer la connaissance, la détection et, si nécessaire, la maîtrise de cette bactérie parmi la flore microbienne des viandes. Pour cela, le projet est organisé en deux parties :

- La première partie du projet consiste en une étude bibliographique. Cette revue de littérature recense tout d'abord les bactéries associées à la viande et en particulier celles retrouvées lors de défauts de conservation de viandes. Un focus est ensuite réalisé sur *Hafnia alvei* : taxonomie, caractéristiques et conditions de culture.
- La suite du projet est une étude expérimentale permettant de compléter les éléments trouvés dans la littérature, réalisée en deux parties :
  - Une étude de contamination artificielle de produits carnés par *Hafnia alvei* a été réalisée à l'IDELE. Elle vise à caractériser la croissance de *Hafnia alvei* sur des viandes de bœuf conditionnées sous vide, définir la quantité de cette bactérie pouvant être observée et vérifier l'altération des viandes dans les conditions habituelles de conservation en entreprise de viande.

- La seconde partie de l'étude expérimentale cherche à mettre au point une méthode d'identification et de quantification précise de *Hafnia alvei* parmi les *Enterobacteriaceae* présentes sur la viande. Une méthode moléculaire d'identification et de quantification de *Hafnia* sp. par qPCR a été développée par l'Université de Caen, laboratoire ABTE. L'essai par contamination artificielle a servi à valider cette méthode de quantification.

## 2. Etude bibliographique

### 2.1. Populations bactériennes associées à la viande

#### 2.1.1. Présentation générale des populations bactériennes

La caractérisation des populations bactériennes associées aux viandes est un enjeu pour la filière. La contamination des viandes par des bactéries sur la chaîne d'abattage est inévitable mais certains procédés peuvent permettre de limiter leur présence et réduire leur développement. Entre autres, les procédures de dépouillement et d'éviscération, le lavage des mains et du matériel visent à prévenir les contaminations de surface de la viande. De plus, le refroidissement des carcasses permet de réduire la croissance de certaines bactéries. Cependant, malgré toutes les mesures préventives mises en place, des contaminations croisées supplémentaires peuvent toujours avoir lieu lors du désossage et de la découpe (McSharry et al., 2021). Dans ce contexte où une contamination bactérienne de la viande est inévitable, la présence et le développement de bactéries non pathogènes lors de la conservation des viandes permet notamment, par compétition, d'éviter le développement de bactéries potentiellement pathogènes pouvant entraîner des problèmes de santé humaine.

Les bactéries lactiques dominent généralement le microbiote de surface des viandes de bœuf quel que soit le type de conservation (Sutherland et al., 1975; Ercolini et al., 2011; Charmpi et al., 2020; McSharry et al., 2021). Parmi ces bactéries, les *Lactobacillaceae* et *Carnobacteriaceae* sont fréquemment identifiées (Ercolini et al., 2011; Charmpi et al., 2020). Les bactéries lactiques et *Pseudomonas* spp. dominent généralement dans les produits conditionnés sous vide (Sutherland et al., 1975; McSharry et al., 2021). Cependant, certains cas ont relevé de fortes concentrations en *Brochothrix thermosphacta* et les *Enterobacteriaceae* (Reid et al., 2017; Bièche-Terrier et al., 2018; McSharry et al., 2021).

Une étude espagnole visant à dénombrer les *Enterobacteriaceae* (milieu de culture VRBGA) dans des préparations de viande de bœuf, porc et volaille a comptabilisé une majorité de bactéries du genre *Escherichia* (32,5%), suivi de *Serratia* (17%), *Hafnia* (12,5%) et *Salmonella* (12%) (Capita et al., 2020). En particulier, dans la viande de bœuf, les genres le plus fréquents sont *Serratia* et *Hafnia* (Säde et al., 2013; Capita et al., 2020; Charmpi et al., 2020) majoritairement représentés par les espèces *Serratia liquefaciens* et *Hafnia alvei* (Säde et al., 2013; Capita et al., 2020).

Selon les études, les populations d'*Enterobacteriaceae* dominantes varient suivant les types de conditionnement. Sur de la viande de bœuf stockée entre 0 et 15°C en conditions aérobies, Doulgeraki et al. (2011) montrent que la population d'*Enterobacteriaceae* est dominée par *Serratia liquefaciens* et *Serratia proteamaculans*. Sous atmosphère modifiée (40% CO<sub>2</sub>-30% O<sub>2</sub>-30% N<sub>2</sub>), cette même étude identifie majoritairement *Hafnia alvei* ainsi que quelques *Proteus vulgaris*. Cependant, Säde et al. (2013) dénombrent plus de *Serratia* sur de la viande de bœuf sous atmosphère modifiée (O<sub>2</sub> majoritaire, 25-35% de CO<sub>2</sub>) et identifient plutôt *Hafnia* en milieu anaérobie. Globalement, *Hafnia alvei* semble être retrouvée sur de la viande stockée sous différentes conditions (aérobie, atmosphère modifiée, sous vide) (Doulgeraki et al., 2012) : environ deux tiers des échantillons de viande vendue au détail présentent des *Hafnia alvei* (Ridell, 1999). Cependant, l'application d'antimicrobiens (Kang et al., 2002) ou la présence d'antimicrobiens actifs dans les emballages (Doulgeraki et al., 2012) semble réduire voire éliminer la bactérie.

### 2.1.2. Evolution des populations bactériennes au cours de la conservation

Une augmentation du nombre de bactéries lactiques est généralement observée lors d'un stockage de viande de bœuf sous vide (Sutherland et al., 1975; Ercolini et al., 2011) jusqu'à dominer la flore bactérienne. La quantité de bactéries à la fin du stockage est liée à la quantité de bactéries initialement présente dans la viande, avant conditionnement sous vide et aux conditions de conservation (température, durée...)(stockage entre 0 et 2°C durant 9 semaines dans le cadre de l'étude de Sutherland et al. (1975)) : moins la viande est contaminée au départ, plus faible est le nombre de bactéries retrouvées dans la viande après 9 semaines de conservation.

Ainsi, lors d'une conservation classique de la viande de bœuf conditionnée sous vide (en l'absence d'oxygène), les bactéries lactiques restent majoritaires ce qui tend à limiter la dégradation des produits. Dans l'étude de Charmpi et al. (2020), les quelques *Carnobacteria* présentes initialement disparaissent au cours de la fermentation. Parmi les *Enterobacteriaceae*, le genre *Hafnia* est retrouvé après 7 jours de fermentation pour tous les types de viandes testés (porc, cheval, divers gibiers) sauf le bœuf où le genre *Serratia* est majoritaire (Charmpi et al., 2020). Cependant, ce résultat doit être nuancé : Sæde et al. (2013) identifient des proportions équivalentes de *Hafnia* et *Serratia* (respectivement 40 et 42%) dans des viandes de bœuf et de volaille conservées sous vide.

Sur des portions de viande de bœuf conditionnées sous atmosphère, la diversité d'espèces et de souches d'*Enterobacteriaceae* semble augmenter (Doulgeraki et al., 2011) alors que la concentration en *Enterobacteriaceae* n'augmente pas systématiquement dans des emballages sous vide correctement réalisés (Bièche-Terrier et al., 2018; McSharry et al., 2021).

### 2.1.3. Populations bactériennes et mauvaise conservation des viandes sous vide

De nombreuses bactéries peuvent être retrouvées sur des viandes plus ou moins dégradées. Parmi elles peuvent être citées *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium* spp., différentes *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudomonas* spp. et *Shewanella putrefaciens* (Borch et al., 1996). Cependant, leur présence n'implique en aucun cas une corrélation avec l'altération organoleptique du produit. La synthèse bibliographique de Fougry (2016) fait l'état des lieux du potentiel altérant de différentes bactéries dans les produits carnés.

#### 2.1.3.1. Flore en présence

En 1975, une étude microbiologique de la dégradation de viande de bœuf sous vide identifie beaucoup de bactéries à Gram négatif et suppose que cette dégradation est due à *Pseudomonas* spp. sans pouvoir le prouver (Sutherland et al., 1975). Quelques années plus tard, cet constat est complété par l'identification d'un nombre élevé de bactéries *Pseudomonas* ainsi que de *Hafnia alvei* et de *Lactobacillus* (Hanna et al., 1979) sur des paquets défectueux (gonflés, odeur d'œuf pourri, parfois couleur verte, potentiellement dû à une erreur de température de stockage en entreprise avant la mise sous vide). Plus de la moitié des bactéries présentes dans ce cas sont des bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*) (Hernández-Macedo et al., 2011; Rossi Junior et al., 2011; Hernández-Macedo et al., 2012; Mansur et al., 2019) mais des *Clostridiaceae* et des *Enterobacteriaceae* (principalement *Hafnia alvei* et *Serratia*) sont aussi présentes dans des proportions moindres (Hernández-Macedo et al., 2011; Rossi Junior et al., 2011; Hernández-Macedo et al., 2012).

#### 2.1.3.2. Dégagements gazeux

L'un des critères de dégradation sur des lots de viande conditionnée sous vide est l'observation d'un paquet « gonflé » ou pouvant dégager une odeur anormale lors de son ouverture. L'analyse des composés volatils présents dans ces paquets a permis d'identifier plusieurs composés issus d'activité bactérienne : surtout des alcools, des aldéhydes et du CO<sub>2</sub> (Hernández-Macedo et al., 2011). La production de gaz résulte notamment de l'activité fermentaire des *Lactobacillus* et de *Hafnia alvei* (Hanna et al., 1979). Par un test d'inoculation, Hanna et al. (1979) ont identifié *Hafnia alvei* comme étant probablement la cause de l'odeur de sulfure d'hydrogène parfois présente à l'ouverture de paquets défectueux de viande stockée sous vide. Un changement d'odeur du produit peut aussi être attribué à la production de diamines malodorantes issues de la dégradation d'acides aminés tels que la lysine ou l'ornithine (Stanbridge and Davies, 1998).

#### 2.1.3.3. Couleur de la viande

De plus, la possible apparition d'une couleur verte sur le produit défectueux a été mise en parallèle avec une augmentation des microorganismes présents en surface de la viande (Stanbridge and Davies, 1998; Hernández-Macedo et al., 2012). Cependant, les études ne montrent pas l'implication directe de *Hafnia alvei* dans la dégradation (odeur, couleur) de la viande.

#### 2.1.3.4. Conservations atypiques

Récemment, des conservations atypiques ont été recensées chez de nombreux fournisseurs et sur tous types de pièces de viande. Cette conservation atypique se définit à partir de dénombrements microbiologiques dépassant les seuils de conformité actuellement définis par les professionnels pour les entérobactéries et la flore aérobique mésophile sans que l'état du produit ne soit altéré. Une récente étude réalisée avec le soutien d'Interbev (Bièche-Terrier et al., 2018) a décrit deux cas de conservation atypique :

- Dans un premier cas, la flore lactique n'est pas assez nombreuse par rapport à la flore aérobique mésophile. Ceci est dû à un problème méthodologique. En effet, les bactéries du genre *Carnobacterium*, faisant partie de la flore lactique, ne se développent pas sur le milieu de culture MRS utilisé pour dénombrer la flore lactique. Le résultat est alors sous-estimé. Les produits sont considérés non-conformes à cause de ce biais.
- Dans un deuxième cas, la concentration en flore lactique est plus faible au bénéfice des *Enterobacteriaceae* qui dépassent leur seuil de conformité défini et représentent alors 86% des isolats cultivés. Cette famille bactérienne est répartie entre l'espèce *Hafnia alvei* (37% des *Enterobacteriaceae*) ou des genres très proches de *Hafnia alvei* (32,9%) (*Obesumbacterium proteus* ou autres genres non identifiés). La différenciation des espèces *Hafnia alvei* et *Obesumbacterium proteus* a été difficile à réaliser dans cette étude.

## 2.2. *Hafnia alvei* : taxonomie et caractéristiques

### 2.2.1. Historique et taxonomie

*Hafnia alvei* est une espèce ubiquiste retrouvée dans des environnements très variés : surface de l'eau, sol, eaux usées, végétation, ensilage, contenu intestinal, fèces, viande, produits laitiers, poisson, contaminant dans les boissons (Ridell, 1999). Sa découverte a été faite par L. Bahr en 1919 (Bahr, 1919) sous le nom de *Bacillus paratyphi-alvei*. Etant

donné que le premier isolement de cette espèce bactérienne a été réalisée à partir du système digestif d'abeilles, le nom « alvei » a été choisi pour l'identifier.

*Hafnia alvei* est une bactérie à Gram négatif faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae* (Ridell, 1999; Université Paris Descartes). Cette espèce bactérienne, décrite à partir de 1954 par Møller (NCBI : txid569), est la première espèce connue du genre *Hafnia*. Historiquement, plusieurs noms ont été donnés à cette espèce : *Paracolobacter aerobacter*, *Paracolobactrum aerogenoides*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter hafniae*, *Enterobacter alvei*, *Bacterium cadaveris*, *Bacillus asiaticus*, *Bacillus paratyphi alvei* (Ridell, 1999; Janda and Abbott, 2006). Il existe aujourd'hui trois espèces connues du genre *Hafnia* : *Hafnia alvei*, *Hafnia paralvei* (Huys et al., 2010) et *Hafnia psychrotolerans* (Gu et al., 2015).

Plusieurs espèces bactériennes partagent une grande similarité avec *Hafnia alvei*. Au sein des *Enterobacteriaceae*, la distinction entre *Hafnia* et *Klebsiellae* a été réalisée par Bascomb et al. (1971) malgré 78% de similarité entre les deux genres bactériens. Une similarité phénotypique avec *Yokenella regensburgei* a conduit à une confusion de ces deux espèces jusqu'en 1985 où elles ont été taxonomiquement séparées (Ridell, 1999). Génétiquement, *Hafnia alvei* partage environ 50% de son code génétique avec *Obesumbacterium proteus* (Ridell, 1999). Cette ressemblance rend les deux espèces difficilement identifiables avec les techniques de culture en laboratoire actuelles. Dans une comparaison de neuf souches de *Obesumbacterium proteus* avec une souche de *Hafnia alvei*, Prest et al. (1994) remarquent un pourcentage de similarité variant entre 62 et 99%. En particulier, les bactéries *O. proteus* du biogroupe 1 sont les plus proches de *Hafnia alvei*.

Dans la littérature, plusieurs méthodes ont pu être testées pour identifier des isolats d'*Enterobacteriaceae*. Par spectrométrie de masse, 96,7% des isolats ont été bien identifiés (Richter et al., 2013). Cependant, dans cette étude, quelques erreurs sont relevées. Notamment, sur 19 isolats de *Hafnia alvei*, 16 ont bien été identifiés et un a été confondu avec *Obesumbacterium proteus*. Prest et al. (1994) ont testé la méthode API 20E, le biogroup testing, les profils de plasmides, le ribotyping et l'enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR pour identifier *Obesumbacterium proteus*. Parmi celles-ci, la méthode ERIC-PCR apporte le meilleur compromis entre la rapidité d'analyse, la simplicité et la capacité de discrimination. La méthode ribotyping a aussi été testée par Koivula et al. (2006). Deux couples d'amorces conçus dans cette étude ont permis de distinguer le biogroupe 2 de *Obesumbacterium proteus* mais n'ont pas permis la différenciation du biogroupe 1 avec *Hafnia alvei* par l'intermédiaire d'une PCR point final ou en temps réel. Ces différentes études démontrent la difficulté qu'il peut y avoir à distinguer les espèces bactériennes *Obesumbacterium proteus* et *Hafnia alvei* et la nécessité de poursuivre le travail de développement méthodologique nécessaire pour une bonne identification de ces bactéries.

### 2.2.2. Caractérisation de *Hafnia alvei*

*Hafnia alvei* est une bactérie aéro-anaérobie facultative (Ridell, 1999; Brightwell et al., 2007). La plupart des souches sont mobiles et capables de croître dans une grande gamme de températures (0,2°C à 43°C pour les extrêmes) (Ridell, 1999). C'est pourquoi les environnements sous vides, humides, anaérobies et les températures de stockage des aliments sont très favorables au développement de *Hafnia alvei* (Ridell, 1999). En 1983 (Greipsson and Priest, 1983), 47 souches de *Hafnia alvei* ont été testées afin de déterminer les caractéristiques de cette bactérie. Celles-ci sont résumées dans le Tableau 1. Toutes

les souches de *Hafnia alvei* ont produit des colonies de couleur blanche à jaune, non mucoïdes.

Tableau 1 : Caractéristiques de *Hafnia alvei* (adapté de Greipsson and Priest (1983))

Caractéristique	% de souches montrant une réaction positive (n = 47)	Caractéristique	% de souches montrant une réaction positive (n = 47)
<b>Tests de dégradation<sup>1</sup></b>			
Acide ribonucléique	0	Pullulan	0
Esculine	4	Tributyryne	60
Caséine	2	Tyrosine	2
ADN	2	Tween 20	13
Gélatine	8,5	Tween 0	0
Amidon	4	Xanthine	0
<b>Capacité de croissance</b>			
Gélose Brilliant green bile	25	pH 4,9	100
Gélose MacConkey	100	pH 8,25	100
Gélose Deoxycholate-citrate	100	4°C	100
Gélose Violet Red Bile	100	15°C	100
Glucose			
NaCl 2%	100	37°C	100
NaCl 5%	100	44°C	100
NaCl 7,5%	6		
<b>Utilisation de carbone</b>			
Adonitol	0	Maltose	100
D-Arabinose	4	Mannitol	100
L-Arabinose	100	Mannose	98
Arbutine	13	Mélibiose	0
Cellobiose	6	A-Méthylglucoside	2
Dulcitol	0	Ribose	100
Erythritol	0	Raffinose	4
Fructose	100	Rhamnose	98
Galactose	100	Salicin	10
Glucose	100	Sorbitol	2
Glycérol	100	Sucrose	0
Inositol	0	Tréhalose	100
Inuline	0	Xylose	98
Lactose	7		
<b>Croissance sur des substrats carbonés</b>			
Acétate	42	Malate	98
Arginine	0	Malonate	55
Asparagine	100	Muconate	0
Benzoate	0	Oxalate	0
Butyrate	0	Phénylalanine	8
Cystéine	0	Propionate	0
Glutamate	62	Pyruvate	100

Glycine	0	Serine	100
Histidine	98	Succinate	98
Lactate	100	D-Tartrate	0
Leucine	0	Tryptophane	2
Lysine	20	Valine	2

#### Tests biochimiques

Arginine dihydrolase	2	Méthyl red	21
Lysine décarboxylase	100	Uréase	4
Ornithine décarboxylase	100	Motilité dans de l'agar semi-solide	87
Oxydation du gluconate	83	Voges-Proskauer	87

#### Résistance aux antibiotiques

Carbenicilline	0	Erythromycine	83
Céphaloridine	70	Furazolidone	0
Chloramphénicol	2	Néomycine	0
Cloxacilline	89	Novobiocine	89

<sup>1</sup> Analyse de la capacité de la bactérie à dégrader le composé. Par exemple, 4% des souches testées ont été capables de dégrader l'esculine.

En complément des antibiotiques présentés dans le Tableau 1, il semble que *Hafnia alvei* soit intermédiaire ou résistante pour l'amoxicilline et l'acide clavulanique, résistante aux C1G (ex : céfalotine), sensible aux carboxypénicillines (ex : ticarcilline), sensible à la céfoxitine et sensible au céfuroxime (Université Paris Descartes).

La culture de *Hafnia alvei* peut être réalisée sur des milieux peu inhibiteurs tels que MacCoke, Drigalski ou une gélose Violet Red Bile Glucose, communément utilisée pour dénombrer les *Enterobacteriaceae* (Greipsson and Priest, 1983; Joly and Reynaud, 2003; AFNOR, 2004). Selon l'ouvrage, la température optimale de multiplication peut varier de 20-22°C à 37°C (Joly and Reynaud, 2003; AFNOR, 2004). En termes de culture, la norme NF ISO 21528-2 de décembre 2004 pour le dénombrement des *Enterobacteriaceae* laisse le choix entre deux températures d'incubation. Il est alors recommandé de préférer une incubation à 30°C dans le cadre d'un procédé technologique et à 37°C lors d'une recherche d'indicateurs d'hygiène. Le risque à 37°C est de perdre certaines bactéries psychrotrophes lors de la culture.

En culture, la distinction entre *Hafnia alvei* et d'autres espèces bactériennes peut parfois être difficile. Par exemple, la morphologie des colonies de *Hafnia alvei* et de *Salmonella* sont proches (Joly and Reynaud, 2003). Quelques caractères différentiels sont listés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractères différentiels de *Hafnia alvei* et d'autres espèces bactériennes (caractères lus après 1-2 jours à 37°C) (adapté de (Le Minor and Richard, 1993))

	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Salmonella</i> ubiquistes	<i>Serratia</i> <i>marcescens</i>	<i>Yersinia</i> <i>pseudo-</i> <i>tuberculosis</i>
Lactose	-	-	-	-
Test-ONPG	+	-	+	+
H <sub>2</sub> S	-	+	-	-
LDC	+	+	+	-
Uréase	-	-	-	+
TDA	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-
Citrate de Simmons	+*	+	+	-

\* : positif à 22°C, négatif à 37°C

### 2.2.3. Activité et capacités de *Hafnia alvei*

L'activité fermentaire de *Hafnia alvei* produit du gaz. Lors d'un test d'inoculation, *Hafnia alvei* a été identifiée comme la source probable de l'odeur de sulfure d'hydrogène parfois présente dans des emballages de viande de bœuf sous vide (Hanna et al., 1979). Bien que *Hafnia alvei* produise des composés ayant une odeur soufrée (Irlinger et al., 2012), la plupart des souches testées ne produisent pas de H<sub>2</sub>S (Greipsson and Priest, 1983; Le Minor and Richard, 1993). Plus récemment une étude a montré que l'application de différents traitements (eau, eau + bactéries lactiques, eau + bactéries lactiques + air chaud) sur de la viande de bœuf avant hachage peut permettre de limiter le nombre de *Hafnia alvei* et de réduire la production de gaz après 7 jours de conservation sous vide à 4°C (Kang et al., 2002).

*Hafnia alvei* est aussi connue pour sa capacité à produire un biofilm (Zhu et al., 2019; Capita et al., 2020). Les conditions (substrat, température...) dans lesquelles certaines souches développent des biofilms sont cependant variables (Vivas et al., 2008). *In vitro*, la température optimale pour le développement d'un biofilm est de 25°C. Cette capacité à produire un biofilm est notamment gérée par le système de « quorum sensing », un système permettant aux bactéries de communiquer et donc d'adapter leur comportement et leur développement en fonction du milieu et de la densité de la population (Tan et al., 2014). De plus, les composés produits (N-acylhomoserine lactones) par *Hafnia alvei* dans le cadre de cette activité de quorum sensing sont connus pour participer à la dégradation de la nourriture (viande, lait) (Tan et al., 2014), d'où l'association fréquente de la bactérie avec des viandes présentant des défauts de conservation. Cependant, une étude a montré l'absence de lien direct entre la présence de *Hafnia alvei* productrice de N-acylhomoserine lactones et la dégradation sensorielle de viande de bœuf conservée sous vide (Bruhn et al., 2004). Il convient donc d'être prudent sur le potentiel lien entre *Hafnia alvei* et la dégradation des viandes.

*Hafnia alvei* est une bactérie généralement non pathogène. Sa présence dans les aliments ne compromet pas l'innocuité des produits. Il existe d'ailleurs sur le marché une souche de *Hafnia alvei* utilisée comme levain d'affinage en fromagerie. Récemment, une souche de *Hafnia alvei* (4597) a même été utilisée comme probiotique pour réguler l'appétit et limiter l'obésité chez des souris (Lucas et al., 2019). Cependant, il arrive parfois que *Hafnia alvei* soit identifiée comme un pathogène opportuniste chez l'homme

notamment chez des patients souffrants déjà d'autres pathologies, indépendantes de *Hafnia alvei* (Gunthard and Pennekamp, 1996; Ridell, 1999; Litrenta and Oetgen, 2017), ou chez des ruminants (Padilla et al., 2015).

### 2.3. Conclusion

*Hafnia alvei* a été identifiée dans un certain nombre de produits carnés. Bien que parfois retrouvée sur des viandes présentant des défauts de conservation, notamment sur de la viande de bœuf conditionnée sous vide, le développement de *Hafnia alvei* ne semble pas corrélé à l'apparition d'altérations de la qualité de viande. Ce constat réalisé dans une précédente étude (Bièche-Terrier et al., 2018) sur des viandes de conservation atypique reste à confirmer.

Une forte concentration en *Hafnia alvei* sur la viande pourrait dépendre d'une forte contamination initiale ou de la croissance de cette bactérie pendant la conservation. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle pas d'estimation de la cinétique de croissance de cette bactérie sur matrice carnée en fonction de la concentration initiale de la bactérie et des conditions de conservation.

Le projet actuel va chercher à apporter des éléments de réponse à cette question par une première étude expérimentale où des souches de *Hafnia alvei* seront inoculées sur de la viande à concentration contrôlée.

L'identification de *Hafnia alvei* peut aussi parfois être compliquée. Cette bactérie, de la famille des *Enterobacteriaceae*, est en effet très proche d'autres espèces bactériennes (ex : *Obesumbacterium proteus*) et les techniques de culture en laboratoire peuvent ne pas suffire à distinguer avec certitude les différentes espèces. Un développement méthodologique est donc nécessaire pour mieux identifier, isoler et par la suite caractériser *Hafnia alvei*. Ceci fera l'objet de la deuxième partie expérimentale de ce projet.

Suite à la proposition de (Adeolu et al., 2016), une nouvelle nomenclature des *Enterobacterales* a été créée en 2021. Dans ce nouveau cadre, le genre *Hafnia* spp. n'appartient plus aux *Enterobacteriaceae* mais à une nouvelle famille nommée *Hafniaceae*. Ce changement est postérieur à la réalisation de la présente étude

### 3. Etude expérimentale

D'après l'étude bibliographique (dont l'étude microbiologique précédente des viandes de bœuf conditionnées sous vide (Bièche-Terrier et al., 2018)), *Hafnia alvei* est retrouvée sur des produits parfaitement conservés (organoleptiquement et en conformité avec les critères actuellement définis pour la flore aérobie mésophile et les entérobactéries notamment) comme sur des produits présentant des taux d'*Enterobacteriaceae* non conformes selon les critères actuels, associés ou non à une dégradation organoleptique de la viande. Cependant aucun élément ne permet de confirmer ou infirmer le pouvoir altérant de cette bactérie. De plus, les conditions de croissance de *Hafnia alvei* lors d'un vieillissement sous vide ne sont pas précisément connues. La première phase de l'étude expérimentale va apporter des éléments de réponse à ces questions.

Afin de mieux identifier et quantifier *Hafnia alvei* parmi les *Enterobacteriaceae* présentes sur les viandes, la deuxième partie de cette étude consiste en la mise au point de méthodes spécifiques à la détection/quantification de *Hafnia alvei*, pour lesquelles les méthodes actuelles de culture ne sont pas assez précises.

#### 3.1. Etude par contamination artificielle de la croissance de *Hafnia alvei* sur la conservation de la viande bovine conditionnée sous vide

Au travers d'un test de croissance dans lequel une souche de *Hafnia alvei* estensemencée artificiellement sur un morceau de viande bovine, différents paramètres ont été étudiés :

- la souche inoculée,
- la concentration initiale bactérienne,
- la température de stockage,
- la durée de conservation.

##### 3.1.1. Matériel et méthodes

###### 3.1.1.1. Collecte des échantillons de viande et préparation

Des ronds de gîte ont été collectés en atelier de découpe. Ce muscle a été sélectionné car il a l'avantage d'être long, large, régulier et rigide ce qui facilite sa découpe en tranches et des prélèvements homogènes pour la suite du protocole.

A l'arrivée au laboratoire, les ronds de gîte sont parés. L'intégralité de la surface du muscle est cautérisée afin d'éliminer l'ensemble des microorganismes présents et de s'assurer que les résultats de l'étude sont uniquement attribuables à *Hafnia alvei*, artificiellement inoculée.

Le plus stérilement possible, les ronds de gîtes sont coupés en tranches de 2,5 cm d'épaisseur. Les parties carbonisées sont éliminées.

###### 3.1.1.2. Choix des souches bactériennes et préparation

Une précédente étude réalisée dans le cadre de l'appel à projet 2015 (Bièche-Terrier et al., 2018) et conduite en partenariat avec l'Université de Caen a permis d'isoler plusieurs souches de *Hafnia alvei*. Parmi elles, deux souches ont été sélectionnées pour le projet actuel : la souche 14205 (qui sera nommée souche 1 dans la suite de ce rapport) et

la souche 17635 (nommée souche 2). La souche 1 a une production de gaz standard, c'est-à-dire comparable à la majorité des autres souches de *Hafnia alvei* précédemment étudiées. La souche 2 produit du gaz en plus grande quantité (Figure 11). Le choix de ces deux souches permet donc d'étudier la production de gaz lors de la conservation sous vide, ce critère étant un facteur d'altération du produit et pouvant mener au retrait du marché et à des pertes économiques dans le cas d'un emballage gonflé.

Les deux souches de *Hafnia alvei* sont mises en culture en eau peptonée puis incubées 24 heures à +30°C. Des tests précédemment réalisés au sein du laboratoire ont permis de démontrer qu'avec ce mode opératoire, les cultures obtenues sont concentrées à 10<sup>9</sup> UFC/mL. Ceci permettra par la suite de maîtriser la concentration bactérienne qui va être inoculée sur la viande : 0, 10<sup>1</sup> ou 10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup>,

#### 3.1.1.3. *Inoculation et stockage*

Sur chaque tranche de rond de gîte, une fraction de dilution de chaque souche de *Hafnia alvei* est étalée au râteau sur chaque face. Les tranches sont identifiées puis mises en sachets sous vide et conservées au réfrigérateur. Deux températures de conservation ont été testées : +2°C et +4°C, mimant les températures de stockage par un professionnel.

Au cours de cette étude, 3 durées de conservation ont été testées : 0, 33 et 40 jours après inoculation de *Hafnia alvei*.

L'analyse a été réalisée en triple exemplaire pour chaque combinaison souche/concentration/température/durée ce qui correspond à un total de 108 tranches, soit 12 ronds de gîte (Figure 1).

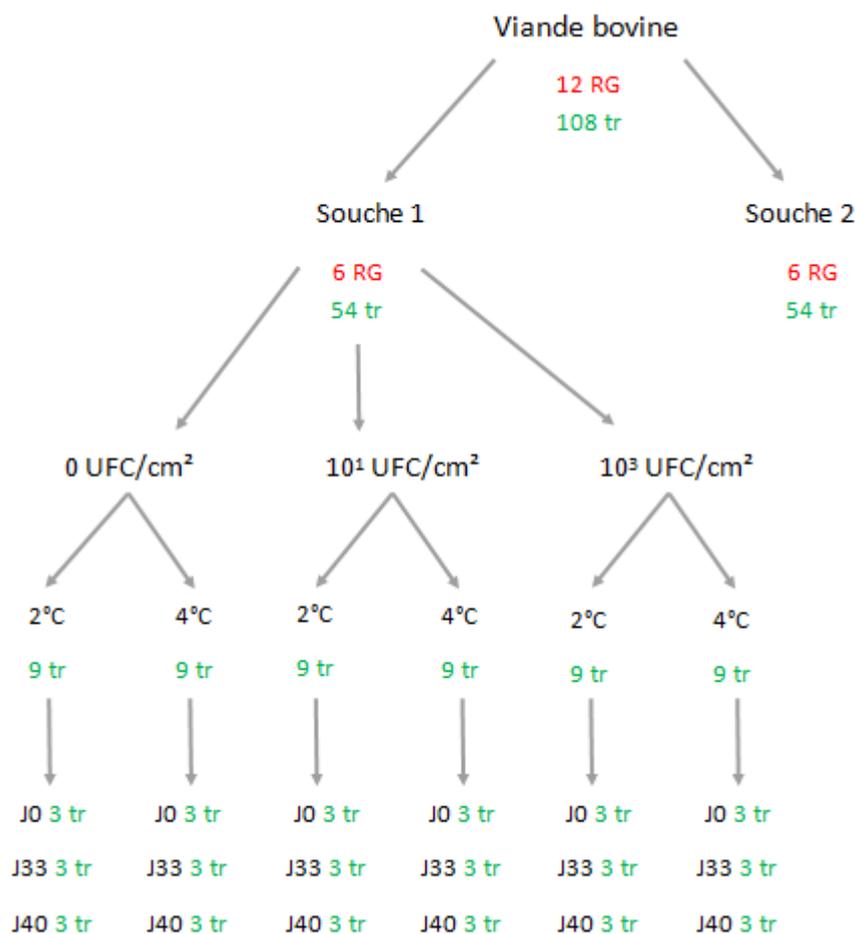


Figure 1 : Représentation schématique de la répartition des tranches (tr) de rond de gîte (RG) de bœuf en fonction de la concentration initiale de bactérie, de la durée et de la température de conservation, pour une souche donnée

#### 3.1.1.4. Observation sensorielle

À l'issue de la conservation, une première évaluation visuelle est réalisée. Elle consiste à vérifier :

- l'absence de gonflement du produit sous vide, pouvant indiquer une production de gaz
- l'absence de verdissement de la viande, signifiant une forte altération du produit.

#### 3.1.1.5. Analyse microbiologique

Pour réaliser les analyses microbiologiques à partir des tranches de viande, des triangles sont découpés sur chaque face et sur 2 mm d'épaisseur, à l'aide d'un cadre de prélèvement de 5x5 cm de côté (Figure 2). Deux triangles issus de côtés différents d'une tranche (avant et arrière) sont réunis dans un sachet à filtre pour analyse. Les deux triangles restants sont congelés pour une éventuelle contre-analyse. De l'eau physiologique (V/V) est ajoutée aux sachets à filtre. Après homogénéisation au stomacher®, le contenu des sachets constitue les solutions mères à partir desquelles les dénombrements bactériens vont être réalisés.



Figure 2 : Triangles découpés sur une face dans une tranche de viande après conservation sous vide

Le milieu Violet Red Bile Glucose agar (VRBG) est utilisé pour dénombrer les entérobactéries dans la masse selon la NF ISO 21528-2 de décembre 2004. L'ensemencement est réalisé en double couche afin que les bactéries soient en semi-anaérobiose puis les boîtes de culture sont incubées à +30°C pendant 24h.

Le milieu Plate Count Agar (PCA) est utilisé pour étudier la flore aérobie mésophile (FAM) totale, dont *Hafnia alvei*, selon la NF EN ISO 4833-1 d'octobre 2013. L'ensemencement est réalisé dans la masse et les boîtes de culture sont incubées à +30°C pendant 72h.

Dans le cadre de cet essai, les muscles ayant été stérilisés par cautérisation avant l'inoculation de *Hafnia alvei*, le dénombrement de bactéries sur le milieu VRBG indique le nombre d'unités de *Hafnia alvei* formant colonies et le dénombrement sur le milieu PCA permet d'estimer la flore persistante après cautérisation.

### 3.1.2. Résultats et interprétations

#### 3.1.2.1. Observation sensorielle

Aucune altération (ni gonflement, ni verdissement, ni odeur désagréable) n'est observée sur l'ensemble des échantillons de viande bovine ayant subi le test de vieillissement sous vide à 2°C ou 4°C jusqu'à 40 jours de conservation, en présence ou non d'inoculum de *Hafnia alvei*. De plus, après réoxygénation, la viande reprend sa couleur rouge caractéristique.

#### 3.1.2.2. Analyse microbiologique

En l'absence d'inoculation de *Hafnia alvei* (témoin à 0 UFC/cm<sup>2</sup>), aucune colonie n'est observable sur les géloses VRBG après 0, 33 et 40 jours de conservation sous vide à +2°C ou +4°C (Figure 3). Ceci confirme l'efficacité de la cautérisation pour supprimer toutes les *Enterobacteriaceae* en surface des muscles et l'absence d'*Enterobacteriaceae* à cœur.

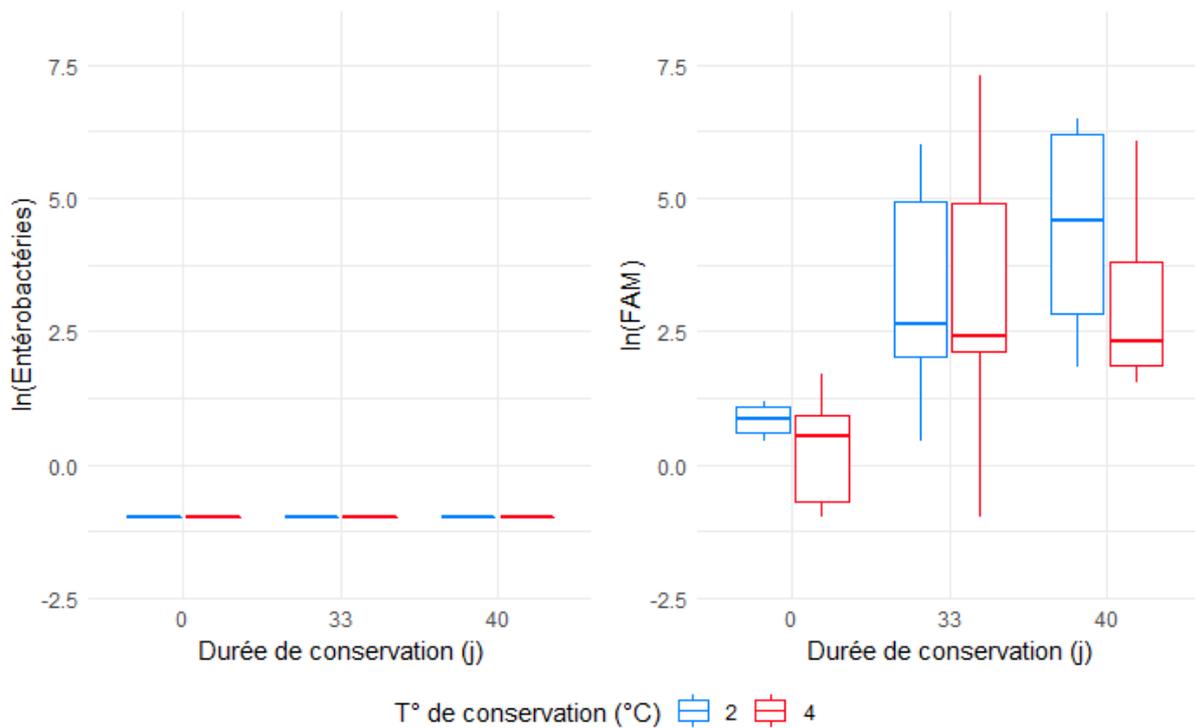


Figure 3 : Quantité d'Enterobacteriaceae et de flore aérobie mésophile (FAM) dénombrée en l'absence d'inoculation de *Hafnia alvei* en fonction du temps et de la température de conservation

Sur les géloses PCA et sans inoculation de *Hafnia alvei*, quelques colonies sont dénombrées (Figure 3). Ces micro-organismes n'ont pas été éliminés par une cautérisation de surface (présents à cœur de muscles ? contamination croisée lors de la manipulation ?) et sont retrouvés sur la quasi-totalité des échantillons. Immédiatement après la découpe des tranches et donc sans temps de conservation, la quantité de FAM s'élève environ à 12 UFC/cm<sup>2</sup>. Cette quantité augmente en l'absence d'inoculation de *Hafnia alvei*. La température de conservation n'impacte pas significativement cette évolution.

Parmi les colonies observées sur la gélose PCA en l'absence d'inoculation de *Hafnia alvei*, deux types de colonies présentes en surface et aux trois durées de conservation (0, 33 et 40 jours) ont été observées au microscope optique :

- Des colonies orange de grande taille, bombées à contours régulier et sans halo (Figure 4). Ces microorganismes correspondent à des levures. Elles apparaissent roses à la suite d'une coloration de Gram.



Figure 4 : Levures observées au microscope optique (grossissement x1000)

- Des colonies blanchâtres de grande taille, à contours irréguliers avec un halo (Figure 5). Il s'agit de longues chaînes de bacilles à Gram positif.

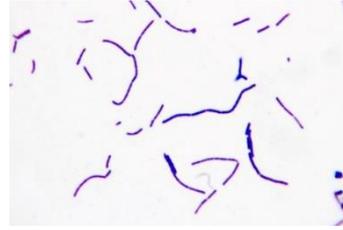


Figure 5 : Bacilles à Gram positif observés au microscope optique (grossissement x1000)

Les colonies de levures ont la particularité d'être observées uniquement en l'absence de *Hafnia alvei* sur la viande alors que les colonies de bacilles à Gram positif sont également présentes après inoculation de *Hafnia alvei* à  $10^1$  et  $10^3$  UCF/cm<sup>2</sup>. Une hypothèse pourrait être que la croissance des levures est inhibée en présence de la bactérie *Hafnia alvei* à une concentration supérieure ou égale à  $10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>. Il est également possible que les conditions nécessaires au développement de *Hafnia alvei* et à ces levures soient différentes au point que les deux types de microorganismes ne cohabitent pas.

#### 3.1.2.3. Effet de la souche bactérienne de *Hafnia alvei* inoculée

Les concentrations en *Enterobacteriaceae* et en FAM sont indépendantes de la souche de *Hafnia alvei* qui a été inoculée (Figure 6).

Après une durée de conservation de 33 ou de 40 jours, quelle que soit la température de conservation, les concentrations en *Enterobacteriaceae* et en FAM sont liées à la concentration initiale de *Hafnia alvei* inoculée. Globalement, plus la concentration en *Hafnia alvei* inoculée est importante, plus la quantité d'*Enterobacteriaceae* et de FAM observée est élevée. Etant donné que la cautérisation a totalement supprimé les *Enterobacteriaceae* des ronds de gîte, les bactéries de cette famille observées à 33 ou 40 jours sont uniquement des *Hafnia alvei*.

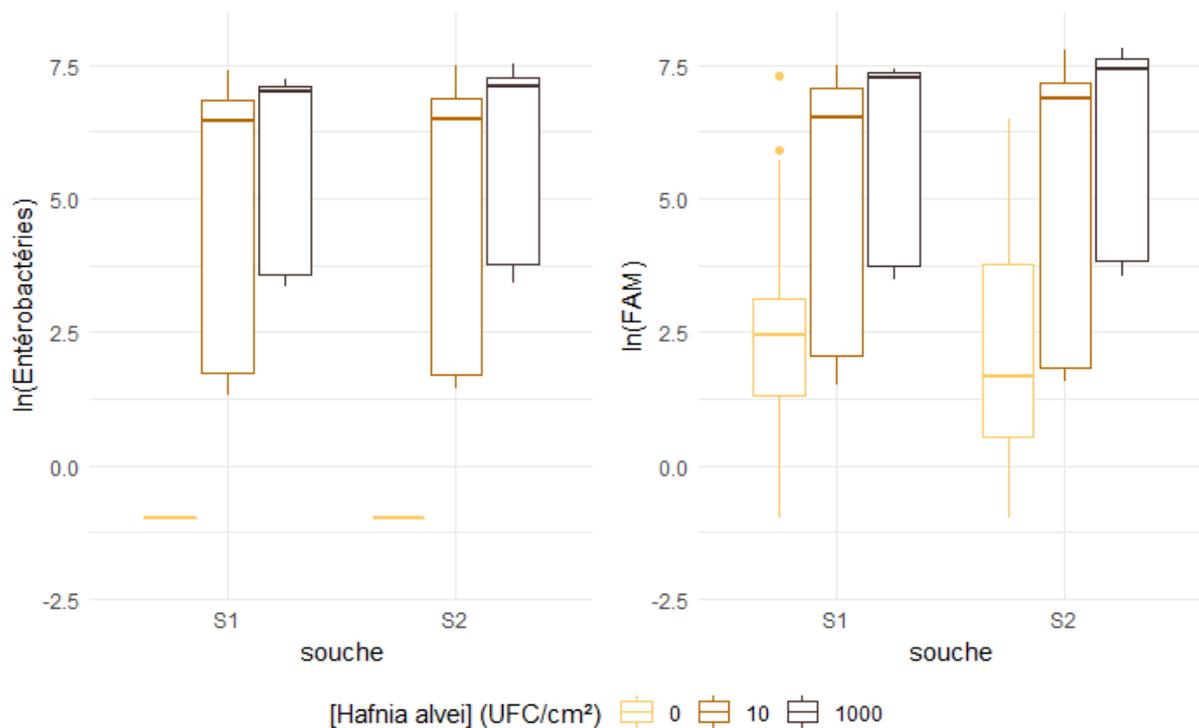


Figure 6 : Quantité d'Enterobacteriaceae et de flore aérobie mésophile (FAM) dénombrée suivant la concentration de *Hafnia alvei* inoculée (toutes conditions de conservation confondues)

#### 3.1.2.4. Effet de la durée de conservation

Après 33 jours de conservation sous vide, la quantité d'*Enterobacteriaceae* augmente significativement pour atteindre  $7,4 \cdot 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> en moyenne. Cette quantité reste stable entre 33 et 40 jours de conservation ( $8,8 \cdot 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> en moyenne à 40 jours) (Figure 7).

L'interaction entre la concentration de *Hafnia alvei* inoculée et la durée de conservation est significative (Figure 7). Lorsque *Hafnia* est inoculée à une concentration de 10 UCF/cm<sup>2</sup>, la concentration en *Enterobacteriaceae* augmente encore entre 30 et 40 jours de conservation. La croissance maximale de la population d'*Enterobacteriaceae* n'est donc pas atteinte dans les conditions de l'essai. En revanche, lorsque *Hafnia* est inoculée à une concentration de  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, aucune augmentation de la population n'est observée entre 30 et 40 jours de conservation ce qui laisse supposer que la croissance optimale de la population bactérienne a été atteinte. Plus la charge de départ est élevée, plus le maximum de population bactérienne est vite atteint.

Afin de voir les différents stades de la courbe de croissance de population, il serait intéressant de compléter l'étude par des points de prélèvement avant 33 jours de conservation pour la concentration en *Hafnia alvei* de  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>. Le maximum de population observé dans cette étude pourrait correspondre à un plateau de stabilisation ou de décélération de la croissance bactérienne.

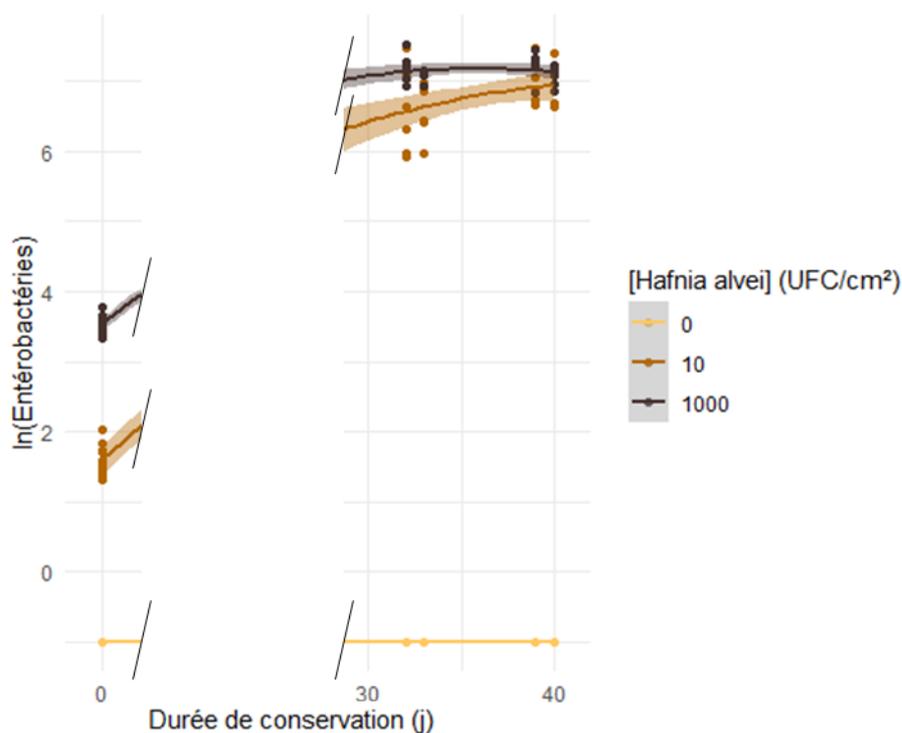


Figure 7 : Quantité d'Enterobacteriaceae dénombrée suivant la concentration de *Hafnia alvei* inoculée et la durée de conservation (toutes souches de *Hafnia alvei* et toutes températures de conservation confondues)

### 3.1.2.5. Interaction entre la concentration inoculée et la durée de conservation

De même que pour les *Enterobacteriaceae*, la quantité de FAM augmente significativement après 33 jours de conservation puis se stabilise (1,4.10<sup>7</sup> et 1,6.10<sup>7</sup> UFC/cm<sup>2</sup> en moyenne à 33 et 40 jours respectivement) (Figure 8).

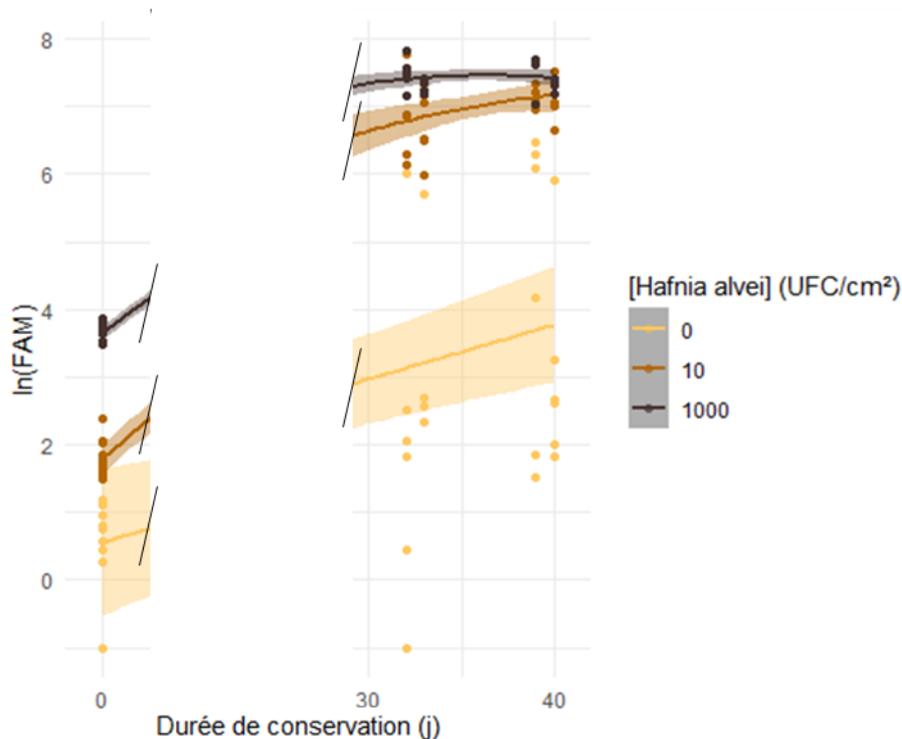


Figure 8 : Quantité de flore aérobie mésophile (FAM) dénombrée suivant la concentration de *Hafnia alvei* inoculée et la durée de conservation (toutes souches de *Hafnia alvei* et toutes températures de conservation confondues)

### 3.1.2.6. Effet de la température de conservation

La quantité d'*Enterobacteriaceae* et de FAM est identique quelle que soit la température de conservation retenue dans l'étude (2 et 4°C) (Figure 9). La température influe surtout sur le temps de latence et la vitesse de croissance des populations bactériennes, une fois atteint le maximum, comme cela semble le cas après 40 jours de conservation dans cette étude, la flore microbienne se stabilise.

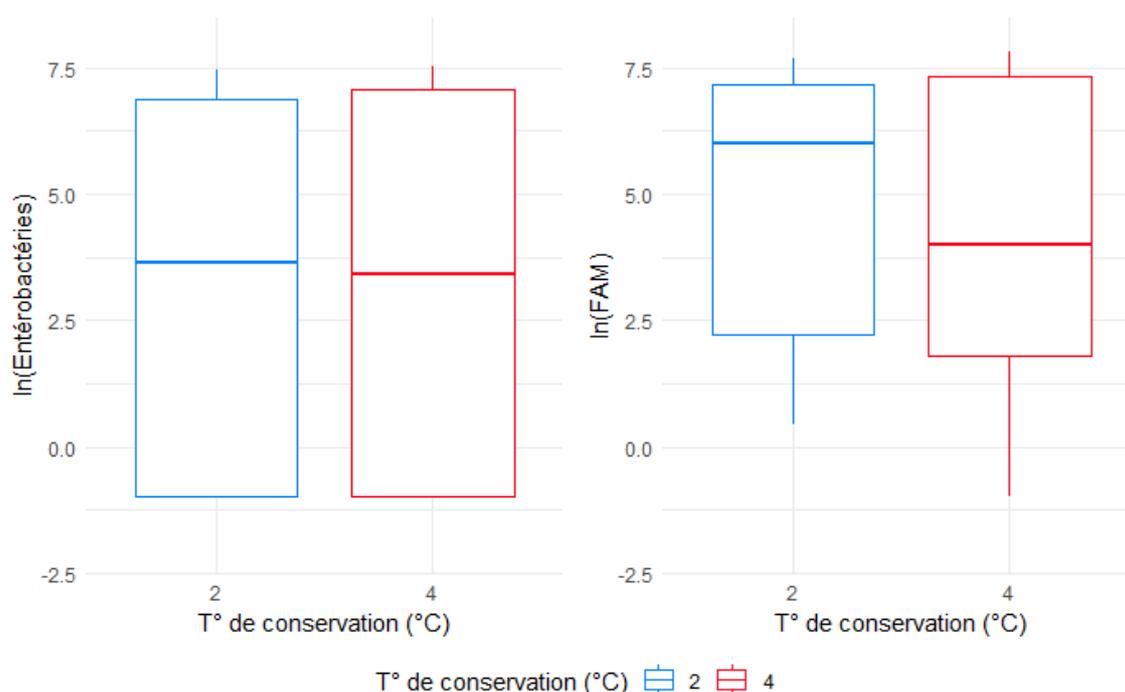


Figure 9 : Quantité d'*Enterobacteriaceae* et de flore aérobie mésophile (FAM) dénombrée suivant la température de conservation (toutes durées de conservations, toutes souches et concentrations en *Hafnia alvei* inoculées confondues)

### 3.1.3. Conclusion

Par inoculation sur de la viande de deux souches de *Hafnia alvei* ayant des caractéristiques différentes, cette étude a montré que cette bactérie n'entraînait pas d'altération de l'aspect visuel ou odorant de la viande lors d'une conservation sous vide à 2 ou 4°C pendant 40 jours.

Malgré la cautérisation préalable de la surface des muscles, plusieurs microorganismes se développent pendant les vieillissements, en l'absence d'inoculation bactérienne. L'étude a particulièrement identifié des levures et des bacilles Gram positif. Néanmoins, aucune levure n'a été observée en présence de *Hafnia alvei* à une concentration supérieure à 10 UFC/cm<sup>2</sup>.

Quelle que soit la souche de *Hafnia alvei* inoculée, la croissance des populations bactériennes a lieu principalement entre 0 et 30 jours de conservation puis se stabilise à environ 8.10<sup>6</sup> UFC/cm<sup>2</sup> pour *Hafnia alvei* et 1,5.10<sup>7</sup> UFC/cm<sup>2</sup> pour la FAM. Plus la concentration initiale en *Hafnia alvei* est élevée, plus le maximum de croissance bactérienne est vite atteint.

Dans cette étude, la température de conservation (2 ou 4°C) ne semble pas influencer les effectifs bactériens. La température pourrait peut-être influencer la vitesse de croissance mais les points de contrôle étaient trop peu nombreux dans cette étude pour pouvoir le démontrer.

### 3.2. Caractérisation d'isolats et mise au point d'une méthode qPCR pour la quantification de l'espèce *Hafnia alvei* dans les viandes bovines conditionnées sous vide

Cette partie de l'étude a été réalisée à l'Université de Caen par le laboratoire Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (EA 4651 ABTE).

Cette partie répond à deux objectifs :

- caractériser une collection de souches bactériennes proches de *Hafnia alvei* isolées lors d'un précédent projet (Bièche-Terrier et al., 2018) à partir de viande de bœuf conservée sous vide. Cette étape préalable est nécessaire pour créer des amorces spécifiques aux souches *Hafnia* sp. qui serviront à la quantification de ces bactéries par méthode moléculaire dans les matrices carnées. Elle a également permis de sélectionner les deux souches de *Hafnia alvei* utilisées en 3.1.
- développer une méthode de quantification spécifique des *Hafnia* sp. ou souches proches (*Obesumbacterium proteus*) par qPCR et l'évaluer dans des préparations issues de matrices carnées. Cette méthode de quantification spécifique permettra de répondre aux demandes de la filière de différencier les contaminations dues à *Hafnia* sp. et bactéries proches au sein des contaminations par les *Enterobacteriaceae*.

#### 3.2.1. Matériels et méthodes

Une présentation schématique de la méthodologie suivie est présentée en Figure 10.

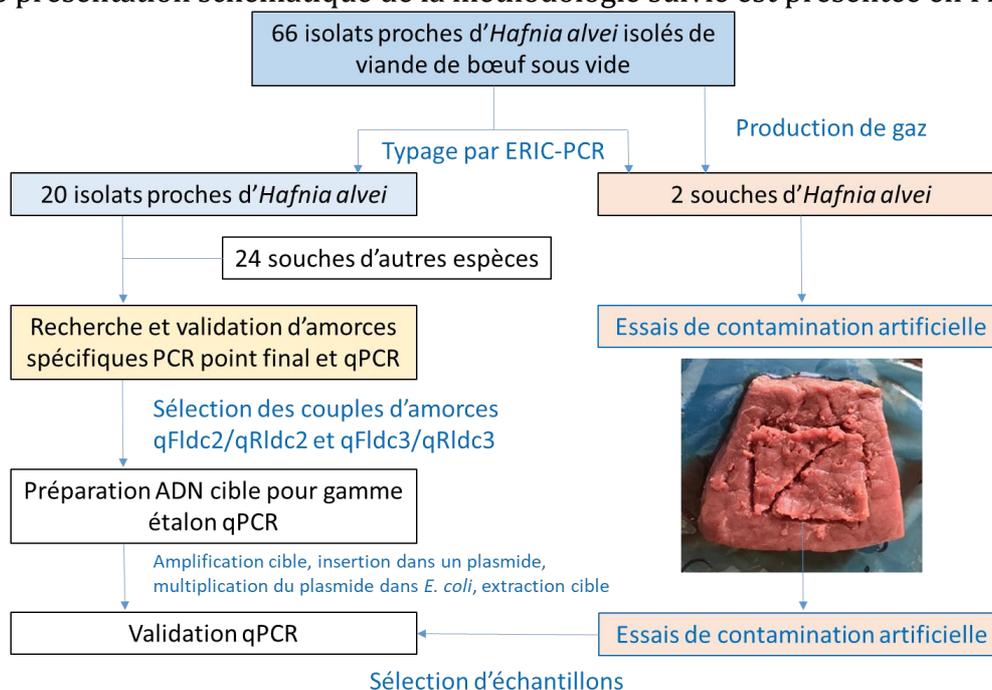


Figure 10 : Méthodologie suivie pour la mise au point du protocole de quantification de *Hafnia alvei* par qPCR

#### 3.2.1.1. Souches utilisées et conditions de culture

Les souches utilisées dans le cadre de ce projet comprenaient :

- 66 isolats proches de l'espèce *Hafnia alvei* provenant de viande de bœuf réfrigérée sous vide (Bièche-Terrier et al., 2018),
- 24 souches appartenant à d'autres espèces proches de *Hafnia alvei* d'un point de vue génétique (autres *Enterobacteriaceae*) ou d'un point de vue écologique (même type de substrat) (Annexe 6.1).

Selon leur milieu de provenance (PCA ou VRBG), les souches ont été stockées respectivement dans du bouillon PC (Tryptone 5,0 g/L, extrait autolytique de levure 2,5 g/L, glucose 1,0 g/L, pH 7,0 ± 0,2) ou du bouillon nutritif ordinaire ou du bouillon MRS, à -80°C et en présence d'une concentration finale de 15% de glycérol.

La souche *Shimwellia pseudoproteus* DSM 3038<sup>T</sup> a été cultivée dans un bouillon nutritif enrichi (Tryptone 5,0 g/L, extrait de levure 5,0 g/L, extrait de viande 3,0 g/L, pH 7,0 ± 0,2) ou sur gélose nutritive (de même composition + 15 g/L agar) à 30°C pendant 18 heures.

Toutes les autres souches ont été cultivées en bouillon Luria-Bertani (LB) (Tryptone 10,0 g/L, extrait de levure 5,0 g/L, extrait de viande 1,0 g/L, chlorure de sodium 5,0 g/L, pH 7,5 ± 0,2) à 7°C pendant 18 heures ou sur gélose ordinaire (1 L d'eau distillée, ,5 g de Viandox, 10 g de peptone, 20 g d'agar, pH ,5-7,6) à 30°C pendant 24 heures.

#### 3.2.1.2. Etude de la production de gaz

Les 66 isolats proches de l'espèce *Hafnia alvei* provenant de viande de bœuf réfrigérée sous vide ont été évalués quant à leur capacité de production de gaz, en bouillon glucosé contenant une cloche de Durham (Annexes 6.2, 6.3 et 6.4).

La mesure de la hauteur de gaz dans la cloche a été réalisée :

- après 24 et 72 h d'incubation en aérobiose à 30°C,
- après 1, 2, 3, 6, 7, 11, 12, 15, 17, 19 et 22 jours d'incubation en aérobiose à 5°C,
- après 22 et 72 h d'incubation en anaérobiose à 30°C.

#### 3.2.1.3. Extraction de l'ADN des isolats

Les ADN des isolats ont été extraits grâce au kit d'extraction NucleoSpin® Microbial DNA (Machere-Nagel). L'extraction a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (gel à 0,5%, en tampon TAE 1X) avec utilisation du phage lambda *HindIII* comme marqueur de poids moléculaire. La concentration des ADN extraits a été déterminée à l'aide d'un lecteur de Microplaques Multimode Spark® (TECAN). En fonction des besoins, les ADN ont été dilués de façon appropriée dans du tampon d'éluion (BE) afin de standardiser les concentrations.

#### 3.2.1.4. Typage moléculaire des isolats de *Hafnia* / proches *Hafnia* par ERIC-PCR

Afin d'évaluer la diversité génétique des isolats et de sélectionner vingt souches de *Hafnia alvei* ou proche de *Hafnia alvei* à tester en PCR, un typage moléculaire a été réalisé par ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR) pour les 66 isolats et les souches types. Cette méthode est une PCR de séquences répétées, adaptée pour les entérobactéries et permettant de réaliser un typage intraspécifique, et ainsi de rendre

compte de la variabilité au sein de génomes phylogénétiquement proches. Pour cette méthode, le couple d'amorces utilisé a été ERIC-1 et ERIC-2 (Versalovic et al., 1991). La composition du mélange réactionnel, les conditions d'amplification et de migration sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel et conditions d'amplification et d'électrophorèse pour l'ERIC-PCR

Amorces utilisées	ERIC-1 (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') ERIC-2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3')
Composition du mélange réactionnel	0,25 µM de chaque amorce Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green Master Mix 2X : 10 µL H2O : 4 µL 4 µL d'ADN à 20 ng/µL Volume total : 20 µL
Conditions d'amplification par PCR	95°C - 7 min 30 cycles de : 95°C - 30 s, 52°C - 1 min, 72°C - 1 min 72°C - 6 min
Conditions d'électrophorèse	Gel d'agarose 1,5% Tampon de migration : TAE 1X Migration 20 min à 100 V

### 3.2.1.5. Identification et validation en PCR point final de couples d'amorces sélectives de l'espèce *Hafnia alvei*

#### 3.2.1.5.1. Evaluation d'amorces disponibles dans la littérature et ciblant d'ADN ribosomique 16S

Des travaux antérieurs (Koivula et al., 2006) ont proposé un couple d'amorces pour amplifier à la fois l'ADN de *Obesumbacterium proteus* biotype 1 et de *Hafnia alvei* biotype 1, mais pas d'*Obesumbacterium proteus* biotype 2 (= *Shimwellia pseudoproteus*). Le couple d'amorces proposé est Obs137/Obs558. Ce couple a été testé sur une souche de *Hafnia alvei* et 16 souches de 16 espèces de bactéries à Gram négatif. La composition du mélange réactionnel, les conditions d'amplification et de migration sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel et conditions d'amplification et d'électrophorèse pour la PCR ciblant d'ADNr 16S selon Koivula et al. (2006)

Amorces utilisées	Obs137 (5'-TAATACCGCATGATGTCTTC-3') Obs558 (5'-TTTCACATCTGACTTAATCA-3')
Composition du mélange réactionnel	1 µM de chaque amorce Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green Master Mix 2X : 7,5 µL H2O : 0,5 µL 1 µL de culture en bouillon Volume total : 15 µL
Conditions d'amplification par PCR	95°C - 5 min 30 cycles de : 95°C - 1 min, 56°C - 30 s, 72°C - 30 s 72°C - 10 min
Conditions d'électrophorèse	Gel d'agarose à 2% Tampon de migration : TAE 1X Migration 25 min à 100 V

#### 3.2.1.5.2. Design d'amorces ciblant un fragment du gène de la lysine décarboxylase

Afin de développer des couples d'amorces adaptés à l'étude, le gène codant pour la lysine décarboxylase (*ldc*) a été ciblé car il n'est présent que chez quelques espèces d'entérobactéries dont *Hafnia alvei*. Des couples d'amorces spécifiques au gène *ldc* ont été dessinés à l'aide de Primerplus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primerplus.primerplus.cgi>), en ciblant une taille de la séquence amplifiée de 75 – 320 pb.

La sélectivité des séquences a d'abord été testée *in silico* contre les séquences d'ADN présentes dans les bases de données à l'aide de PrimerBlast ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=1235996&INPUT\\_SEQUENCE=JX869059.1&LINK\\_LOC=nucle](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=1235996&INPUT_SEQUENCE=JX869059.1&LINK_LOC=nucle)).

#### 3.2.1.5.3. Tests d'exclusivité et d'inclusivité

Une fois les couples d'amorces dessinés et validés *in silico*, ils ont été testés sur l'ADN des souches sélectionnées pour l'étude. Les tests d'exclusivité ont été réalisés sur 24 souches de 24 espèces proches génétiquement ou écologiquement de *Hafnia alvei* afin de vérifier qu'il n'y avait pas d'amplification avec des espèces autres que celle ciblée. Les tests d'inclusivité ont été réalisés sur 25 souches (dont 5 de collections internationales) représentant la diversité des souches de *Hafnia alvei* ou proches, afin de vérifier que les couples d'amorces amenaient bien une réponse pour toutes les souches de l'espèce. Pour quelques souches proches de *Hafnia*, les amorces ont été testées dans le but de clarifier leur identification.

Pour ces tests d'exclusivité et d'inclusivité, des réactions de PCR ont été réalisées en utilisant chaque couple d'amorces dessinées. De plus, des amorces universelles ciblant d'ADN ribosomique 23S (Cousin et al., 2019) ont été introduites dans le mélange réactionnel pour constituer un témoin positif interne. La composition du mélange réactionnel, les conditions d'amplification et d'électrophorèse sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel et conditions d'amplification et d'électrophorèse pour la PCR ciblant de gène *ldc*

Composition du mélange réactionnel	0,25 µM de chaque amorce qF1dc1/qR1dc1 ou qF1dc2/qR1dc2 ou qF1dc3/qR1dc3 ou qF1dc4/qR1dc4 ou qF1dc5/qR1dc5 ou qF1dc6/qR1dc6 0,125 µM de chaque amorce 23S_F et 23S_R Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green Master Mix 2X : 7,5 µL H2O : 4,25 µL 1 µL d'ADN à 5 ng/µL Volume total : 15 µL
Conditions d'amplification par PCR	95°C - 10 min 30 cycles de : 95°C – 15 s, 55°C – 15 s, 72°C – 15 s 72°C - 5 min
Conditions d'électrophorèse	Gel d'agarose à 2% Tampon de migration : TAE 1X Migration 20 min à 100 V

### 3.2.1.6. Développement et validation d'un protocole de qPCR pour la quantification de l'espèce *Hafnia alvei* en milieu de laboratoire

#### 3.2.1.6.1. Vérification de la spécificité analytique des couples d'amorces en qPCR

Pour les trois couples d'amorces (qF1dc2/qR1dc2, qF1dc3/qR1dc3 et qF1dc5/qR1dc5) retenus après les tests d'exclusivité et d'inclusivité, une validation a été réalisée par PCR quantitative (qPCR). Pour cela, une amplification par qPCR a été réalisée, selon les conditions indiquées dans le Tableau 6 à partir d'ADN de 25 souches. Cinq souches de référence : *Obesumbacterium proteus* DSM 2777<sup>T</sup>, *Hafnia alvei* DSM 30163<sup>T</sup>, *Serratia marcescens* CIP 103235<sup>T</sup>, *Hafnia paralvei* CIP 104950<sup>T</sup>, *Hafnia alvei* CIP 104949 et 20 souches sélectionnées de *Hafnia alvei* ou proches.

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel et conditions d'amplification par qPCR avec les couples d'amorces qFldc2/qRldc2, qFldc3/qRldc3 et qFldc5/qRldc5

Mélange réactionnel	Réactifs	Volumes
	Solution d'amorces à 5 $\mu$ M	1,25 $\mu$ L de chaque amorce
	Master Mix GoTaq® qPCR (2X)	12,5 $\mu$ L
	H <sub>2</sub> O ultra-pure	9 $\mu$ L
	Solution d'ADN cible à 5 ng. $\mu$ L <sup>-1</sup>	1 $\mu$ L
Conditions d'amplification	Dénaturation initiale	95°C, 3 min
	Amplification 40 cycles	95°C 15 s, 60°C 60 s

### 3.2.1.6.2. Mise en place du protocole de quantification

#### Préparation de l'ADN cible

Afin de réaliser une courbe standard permettant la quantification de *Hafnia alvei* par qPCR, une matrice d'ADN purifiée, linéaire, contenant les séquences ciblées par les couples d'amorces choisis a été préparée.

Pour cela, un couple d'amorces qFldc390/qRldc390 a été dessiné à l'aide de Primer3Plus afin d'amplifier la séquence d'ADN de plus grande taille et englobant à la fois la zone d'ADN cible des couples d'amorces qFldc2/qRldc2 et qFldc3/qRldc3, et les séquences complémentaires amorces qFldc2/qRldc2 et qFldc3/qRldc3 elles-mêmes (Figure 14).

L'amplification a été réalisée à l'aide d'une polymérase haute-fidélité (PhusionTaq®, selon les recommandations du fournisseur) à partir de l'ADN d'une souche de *Obesumbacterium proteus* et de 9 souches de *Hafnia alvei* : 4 souches de référence provenant de divers substrats (DSM 30101, DSM 30098, DSM 102038 et CIP 109494) et 5 souches provenant de viande de bœuf sous vide (UCMA 17629, 30163, 14136, 1416 et 14205). Les amplicons obtenus ont été soumis à un séquençage de type Sanger (réalisé par Eurofins Genomics, Allemagne).

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été assemblées à l'aide du logiciel SeqTrace® et alignées à l'aide du logiciel Mega7® pour les comparer et sélectionner les plus représentatives en vue d'essais de clonage.

#### Clonage des ADN cibles

Quatre ADN cibles provenant de quatre souches (*Hafnia alvei* UCMA 14136, UCMA 14205, UCMA 17629 et DSM 3016<sup>T</sup>) ont été clonés (introduits) dans un plasmide pGEM-T Easy (Promega). Pour cela, une PCR point final a d'abord été réalisée en utilisant la PhusionTaq® et le couple d'amorces qFldc390/qRldc390 pour les quatre souches. Les produits de ces réactions de PCR ont été purifiés à l'aide du kit Wizard® (Promega) puis incubés à 72°C avec un volume équivalent de DreamTaq Polymerase® (2X) pendant 30 minutes dans le but d'ajouter des séquences poly-Adénines aux extrémités 3' de ces produits de PCR. Afin d'introduire chacune des quatre séquences cibles dans le plasmide, une réaction de ligation (ratio cible : plasmide de :1) a été réalisée selon les conditions indiquées dans le Tableau 7, à température ambiante pendant une heure puis à °C durant une nuit.

Tableau 7 : Composition des mélanges réactionnels pour la ligation via le système pGEM-T (Promega)

Composants	Réaction standard	Contrôle positif	Contrôle négatif
2X Rapid Ligation Buffer, T DNA ligase	5 µL	5 µL	5 µL
Plasmide Vecteur pGEM®-T Easy (50 ng.µL <sup>-1</sup> )	1 µL	1 µL	1 µL
Produit de PCR	X µL (qsp ratio cible / plasmide de 3 :1)		
ADN de contrôle (plasmide avec un insert) (4 ng.µL <sup>-1</sup> )		2 µL	
T4DNA Ligase (3 u.µL <sup>-1</sup> )	1 µL	1 µL	1 µL
Eau pure (qsp)	10 µL	10 µL	10 µL

Après cette étape de ligation, qui a permis d'introduire individuellement les séquences cibles dans les plasmides, des cellules compétentes de *Escherichia coli* JM109 (fournie avec le kit) ont été transformées à l'aide des plasmides contenant les séquences cibles, selon le protocole du fournisseur, puis étalées sur des boîtes de milieu LB Agar à l'ampicilline (100 µg.mL<sup>-1</sup>), IPTG (0,5 mM) et XGAL (80 µg.mL<sup>-1</sup>).

Après incubation à 7°C pendant 16 heures, des colonies blanches (supposées transformées) ont été prélevées et soumises à une PCR sur colonies à l'aide des amorces M13 pour vérifier que la séquence cible avait bien été insérée. Elles ont été cultivées en parallèle dans 5 mL de bouillon LB incubé à 37°C durant une nuit pour amplifier la séquence par réplication du vecteur lors de la croissance cellulaire. Cette procédure a été réalisée quatre fois pour chacun des amplicons issus quatre souches de *Hafnia alvei* qui sont : UCMA 1416, UCMA 14205, UCMA 17629 et DSM 30163<sup>T</sup>.

### 3.2.1.6.3. Extraction et quantification des ADN cibles

Pour chacune des 16 cultures, le plasmide a été extrait, (purifié), linéarisé et sa concentration en ng/µL dans l'extrait a été déterminée à l'aide d'un lecteur multimodal SPARK (TECAN).

Le nombre de copies de plasmides par µL d'extrait a été déterminé selon la formule :

$$\text{Nombre de copies}/\mu\text{L} = \frac{6,022 \times 10^{23} \times [\text{plasmide (ng}/\mu\text{L})]}{\text{taille plasmide (pb)} \times 10^9 \times \text{masse molaire moy. d'une pb}}$$

$$\text{Nombre de copies}/\mu\text{L} = \frac{6,022 \times 10^{23} \times [\text{plasmide (ng}/\mu\text{L})]}{3405 \times 10^9 \times 660}$$

Des dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) ont ensuite été réalisées avec de l'eau ultra-pure. Chaque dilution a été soumise à une réaction de qPCR avec les couples d'amorces qFldc2/QRldc2 et qFldc3/QRldc3, et ce à 3 reprises, de façon à préparer une courbe étalon.

### 3.2.1.7. Développement et validation d'un protocole de qPCR pour la quantification de l'espèce *Hafnia alvei* sur des matrices carnées

#### 3.2.1.7.1. Evaluation de kits d'extraction d'ADN bactérien à partir de matrice viande

Trois kits d'extraction d'ADN ont été comparés : NucleoSpin Soil et NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) et DNeasy PowerSoil (Qiagen). Pour cela, des échantillons de viande de bœuf ont étéensemencés en surface à l'aide d'une culture de *Hafnia alvei* DSM 30163<sup>T</sup>, de façon à atteindre une concentration de l'ordre de  $10^6$  UFC/g. La procédure est décrite ci-dessous.

#### Culture de *Hafnia alvei* et ensemencement des viandes

Une pré-culture de la souche de *Hafnia alvei* DSM 30163<sup>T</sup> a été réalisée en transférant une colonie dans 5 mL de bouillon LB incubé ensuite à 30°C durant 18 heures. Une culture a été obtenue par transfert de 100 µL de la préculture dans 5 mL de bouillon LB et incubation pour une durée de 24 h à 30°C.

Un millilitre de la culture a été centrifugé à 11000 g durant une minute. Le culot a été lavé deux fois dans 1 mL de diluant Tryptone Sel puis dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans du Tryptone Sel (suspension mère pour la suite des manipulations). En parallèle, un dénombrement de la culture a été réalisé (sur milieu LB agar après incubation à 37°C).

Un centimètre de pourtour a été éliminé d'une pièce de viande de bœuf (jarret) à l'aide d'un scalpel stérile, six morceaux équivalents en dimension ont été découpés et déposés en boîtes de Petri afin d'en déterminer la masse (de 6 à 8 g). Un volume approprié de la suspension mère nécessaire à l'obtention d'une concentration en *Hafnia alvei* de  $10^6$  UFC/g de viande a été déposé sur chacun des six morceaux. Mes morceaux ont été séchés sous PSM avec le couvercle de la boîte de Petri retiré pour une durée de 15 minutes.

Les morceaux de viande de bœuf ont été mis en sacs stériles avec un volume (en mL) de Tryptone Sel équivalent à 9 fois la masse (en grammes) de chaque morceau de viande de bœuf. Un broyage au Smasher® a été réalisé pendant 1 minute.

#### Extraction de l'ADN total

Les protocoles d'extraction ont été réalisés en duplicata dans chacun des cas à partir de deux morceaux de viande de bœuf différents. L'échantillon initial à extraire dans chacun des cas était la suspension mère obtenue à la fin du traitement mécanique par le Smasher®. La concentration et la qualité de l'ADN ainsi extrait à travers chacun des kits ont été ensuite obtenues par analyse spectrophotométrique à l'aide d'un lecteur multimodal SPARK (TECAN).

#### 3.2.1.7.2. Evaluation du protocole de qPCR à l'aide de viandes ensemencées artificiellement par *Hafnia alvei*

Le protocole a été testé sur des suspensions-mères (25 cm<sup>2</sup>/25 mL) de viande conservées à -20°C à la suite des essais réalisés par l'Institut de l'élevage dans le cadre du projet (cf. partie 3.1) et dans lesquelles la concentration en *Hafnia alvei* avant congélation

avait été déterminée par approche culture-dépendante. Huit suspensions ont été testées et soumises au protocole de qPCR à l'aide des couples d'amorces qFldc2/qRldc2 et qFldc3/qRldc.

### 3.2.2. Résultats et discussion

#### 3.2.2.1. Caractérisation des isolats proches de *Hafnia alvei* et sélection d'isolats représentatifs

##### 3.2.2.1.1. Production de gaz *in vitro* à différentes températures

Dans le cadre de la partie 3.1 (Etude du pouvoir d'altération de *Hafnia* par contamination artificielle) la production de gaz a été évaluée dans différentes conditions pour les 66 isolats. Les résultats obtenus après incubation à 5°C (Figure 11) mettent en avant la production de gaz par toutes les souches. Il a également été possible d'identifier quelques souches fortement productrices (hauteur de gaz de 1 à 1,5 cm en cloche de Durham) et quelques souches plus faiblement productrices (hauteur de gaz de 0,4 cm). Ces informations ont été utilisées pour la sélection de deux souches pour les contaminations artificielles de viandes (cf. partie 3.1.1.2). Les résultats obtenus pour les diverses conditions sont présentés en Annexes 1, 2 et 3.

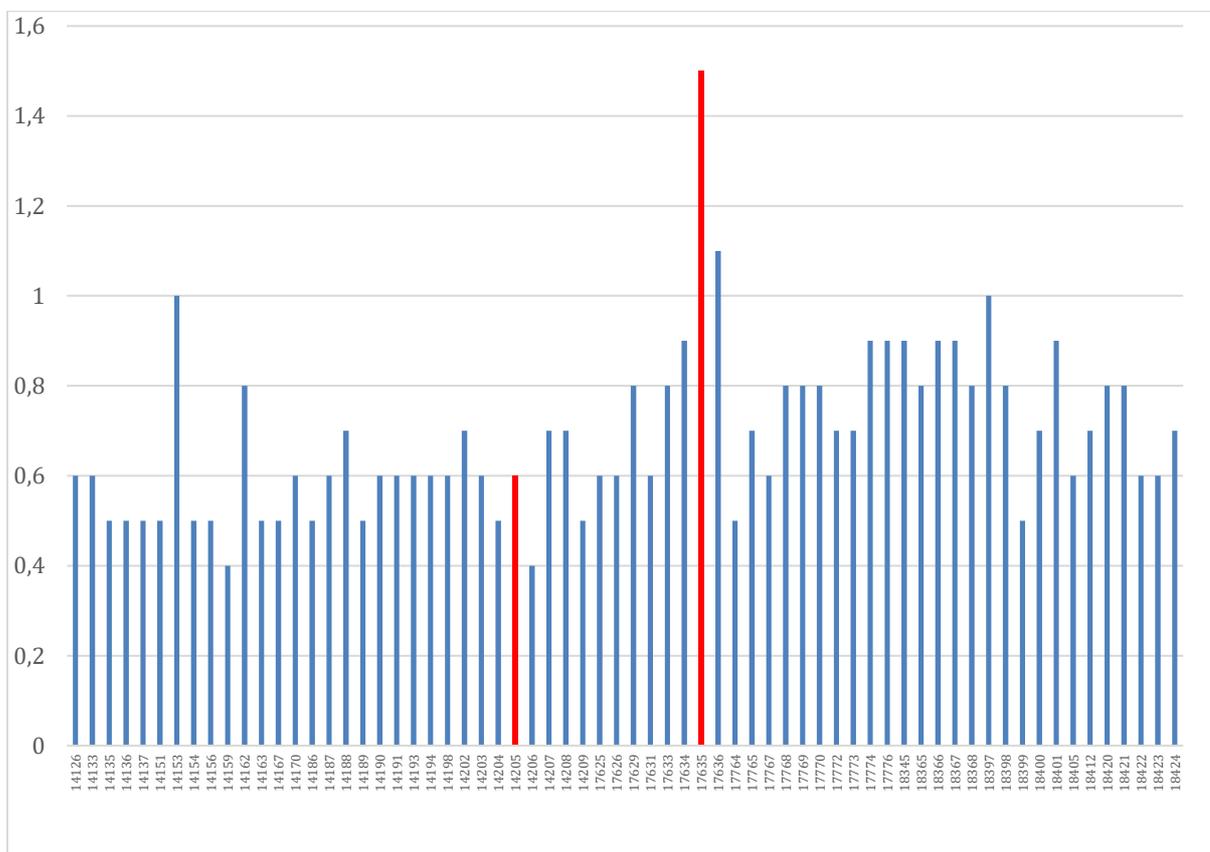


Figure 11 : Production de gaz par 66 souches proches de *Hafnia alvei* en milieu glucosé après 22 jours d'incubation à 5°C en aérobiose (les souches marquées en rouge sont celles retenues pour la contamination artificielle)

##### 3.2.2.2. Caractérisation moléculaire des isolats

Sur la base des séquences de l'ADNr 16S obtenues lors d'un précédent projet (Bièche-Terrier et al., 2018), les 66 isolats proches de *Hafnia alvei* et isolés de viande de bœuf conditionnée sous vide ont été classés (Figure 12) et positionnés en regard de souches de référence appartenant aux espèces *Hafnia alvei*, *Hafnia paralvei*, *Obesumbacterium proteus* et *Shimwellia pseudoproteus*.

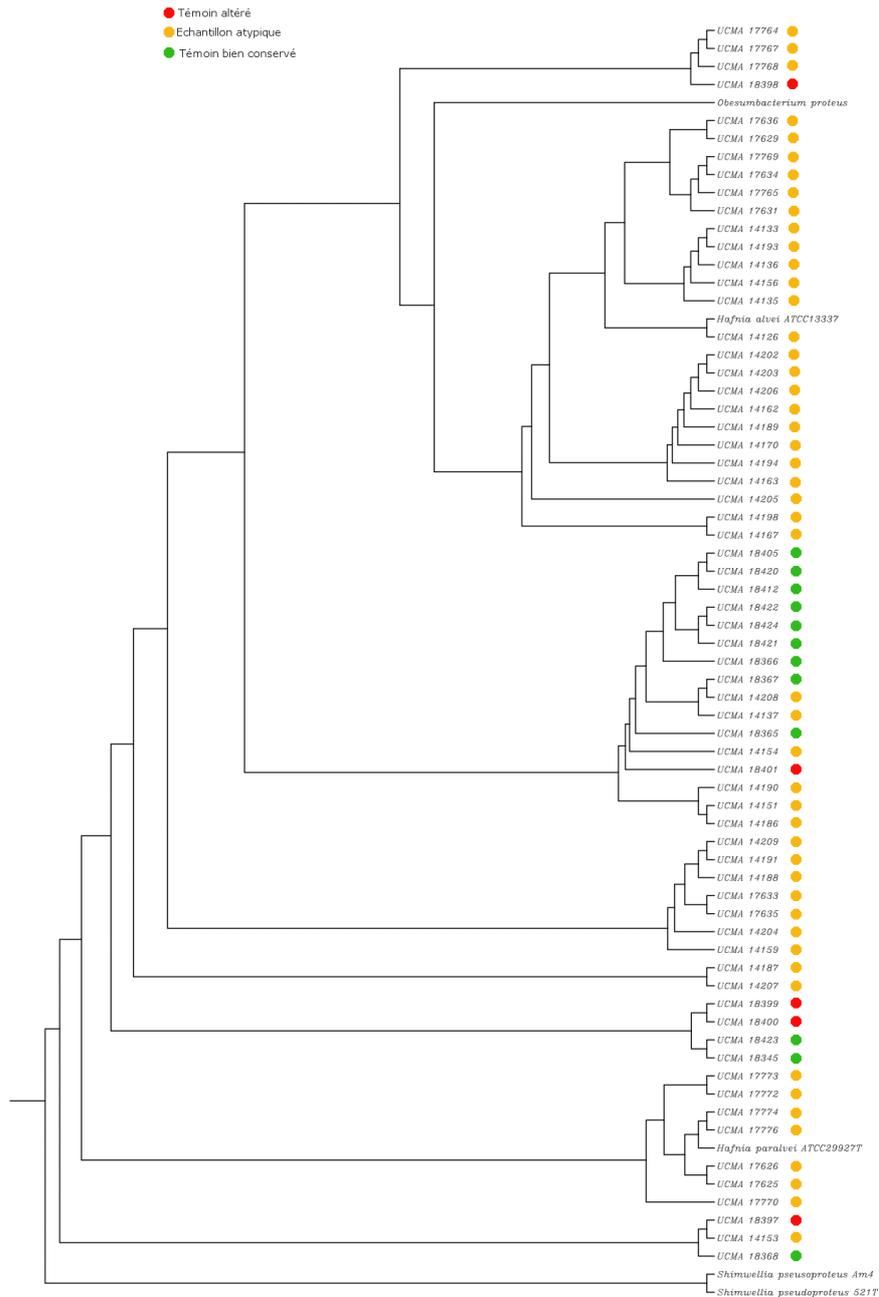


Figure 12 : Dendrogramme généré avec le logiciel CrustalW à partir des séquences ribosomiques 16S des 66 isolats proches de *Hafnia alvei*

Un typage moléculaire par ERIC-PCR (Figure 13) a été réalisé afin de caractériser les 66 isolats proches de *Hafnia alvei* et de distinguer les différentes souches, dans le but d'en sélectionner vingt pour la suite des tests de design d'amorces pour la qPCR. Les isolats ont ainsi été regroupés en 17 profils ERIC-PCR différents (Tableau 8). Vingt isolats (Tableau 11) ont été retenus pour représenter ces 17 profils pour la suite des expérimentations.

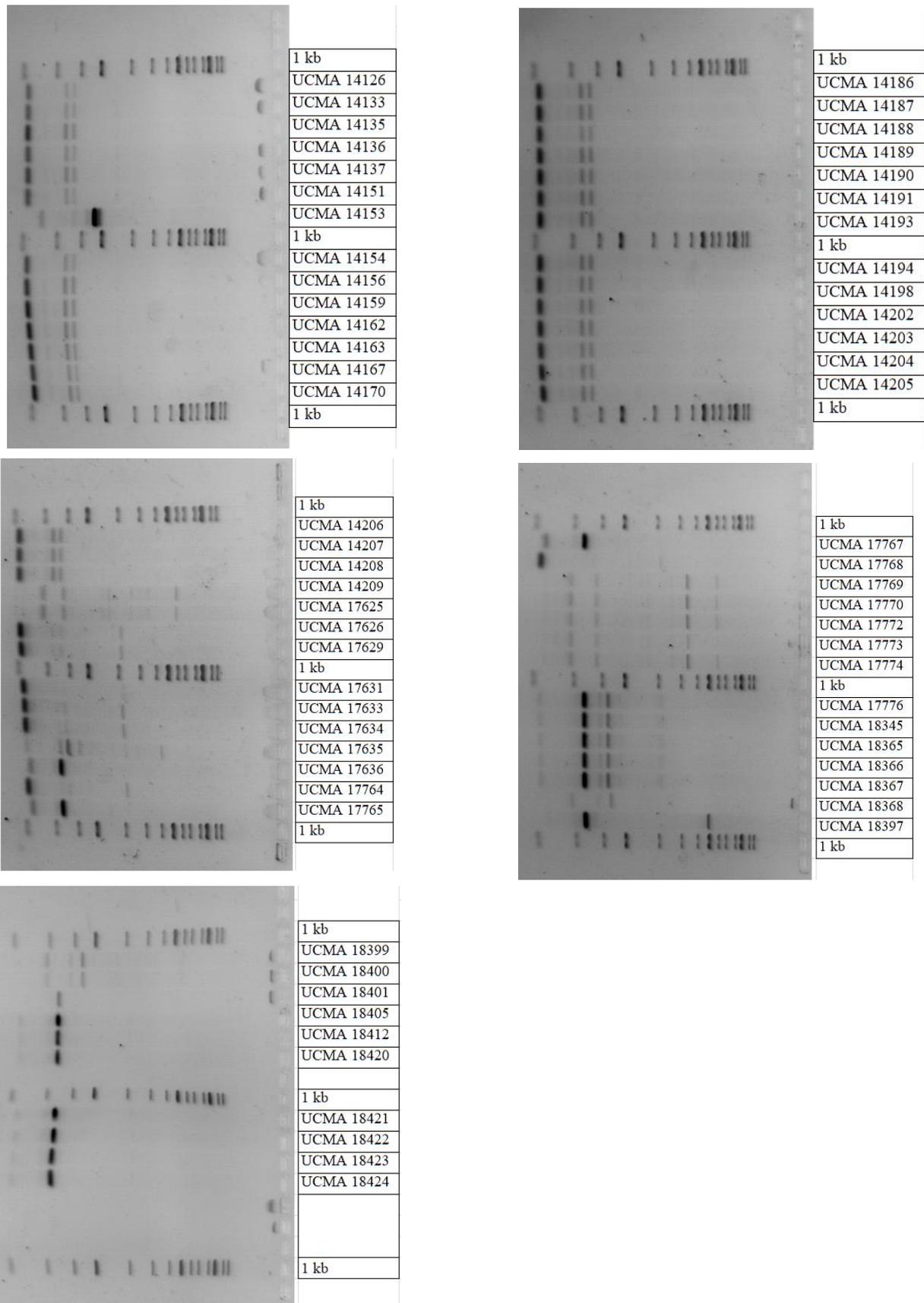


Figure 13 : Résultats des différents profils moléculaires obtenus par ERIC-PCR pour les 66 isolats proches de *Hafnia alvei*

Tableau 8 : Regroupement des 66 isolats proches de *Hafnia alvei* en fonction du profil obtenu par typage en ERIC-PCR

Profil ERIC-PCR	Nombre d'isolats arborant le profil	Abattoir / campagne	Muscle ou UVCI / stade de vieillissement	Identification sur la base du séquençage de l'ADNr 16S
1	1	B / 2	Araignée d100 (altérée)	ND <i>Hafnia</i> / <i>Obesumbacterium</i> / <i>Serratia</i>
2	2	B / 2	Araignée d100 (altérée)	
3	1	B / 2	Araignée d100 (altérée)	
4	1	B / 2	Araignée d100 (altérée)	NE <i>Hafnia</i> / <i>Obesumbacterium</i>
5	5	G / 2	Côte à l'os d100 (bien conservée)	4 <i>H. alvei</i> / 1 NE <i>Hafnia</i> / <i>Obesumbacterium</i>
6	1	C / 1	Araignée d66 (atypique)	<i>H. alvei</i> / <i>O. proteus</i>
7	5	D / 1	Araignée d100 (atypique)	1 <i>H. alvei</i> ( <i>O. proteus</i> ), 1 <i>H. alvei</i> ou <i>paralvei</i> / <i>O. proteus</i> , 1 <i>H. alvei</i> , 1. <i>H. alvei</i> ( <i>H. paralvei</i> ), 1 <i>H. alvei</i> ( <i>Obesumbacterium</i> sp.)
8	10	D / 1 D / 2	Araignée d66 (atypique) Araignée d100 (bien conservée)	2 <i>H. alvei</i> ( <i>O. proteus</i> ), 1 <i>H. alvei</i> , 7 <i>Hafnia</i> / <i>Obesumbacterium</i> / <i>Serratia</i>
9	1	F / 1	Entrecôte d66 (atypique)	<i>H. alvei</i> ( <i>O. proteus</i> )
10	3 + 1	F / 1 C / 1	Bavette d100 (atypique) Araignée d66 (atypique)	<i>H. alvei</i> ( <i>O. proteus</i> )
11	2	F / 1	Bavette d100 (atypique)	1 <i>H. alvei</i> , 1 <i>H. alvei</i> / <i>O. proteus</i>
12	2	F / 1	Onglet d100 (atypique)	<i>H. alvei</i>
1	1	D / 1	Hampe d66 (atypique)	NE ( <i>Obesumbacterium</i> )
14	14	D / 1	Hampe d100 / DDP d100 (atypiques)	<i>H. alvei</i> <i>H. alvei</i> 2 <i>H. alvei</i>
15	10	D / 1	Hampe d66 (atypique)	1 <i>H. alvei</i> ( <i>O. proteus</i> ) <i>H. alvei</i>
16	3	D / 1	Hampe d66 (atypique)	
17	3	D / 1	Dessus de palette d100 (atypique)	

### 3.2.2.3. Design et validation en PCR point final d'amorces pour cibler *Hafnia alvei* ou *Obesumbacterium proteus*

#### 3.2.2.3.1. Design des amorces

Les amorces ciblant l'ADN ribosomique 16S proposées par Koivula et al. (2006) n'ont pas permis d'obtenir des résultats probants, par manque de sélectivité.

Six couples d'amorces ont alors été dessinés : qFldc1/qRldc1, qFldc2/qRldc2, qFldc3/qRldc3, qFldc4/qRldc4, qFldc5/qRldc5, qFldc6/qRldc6. Les séquences sont présentées dans le Tableau 9 et leur position au sein du gène *ldc* en Figure 14.

Tableau 9 : Amorces utilisées dans cette étude ciblant le gène codant pour la lysine décarboxylase et amorces universelles ciblant l'ADNr 23S

Amorces	Séquences (5' > 3')	Taille d'amplicon (pb)
qFldc1/qRldc1	CGCCGGGGCATATGGG/GTGGCACCGGCAGGAG	265
qFldc2/qRldc2	CATTAGGCAGCGCGCAAG/TCAGCGGTGGCAGAATGG	81
qFldc3/qRldc3	ACAACTCCCGCCTGTGTG/CTTGCGCGCTGCCTAATG	192
qFldc4/qRldc4	GGATACCGGCGTCGATCG/GCCCCAACAAGCTCAAC	133
qFldc5/qRldc5	GATGACGCCGCATGATGC/CAGAACAGGGCGGCTCTC	169
qFldc6/qRldc6	ATTCTGCCACCGCTGACC/GAGCAGCGATCCGAGCTC	192
qFldc390/qRldc390	GCTTATCCCAAAGACCGCAA/GACAGGGCTTTTATCGAACG	390
23S_F/23S_R*	TTGTCGGGTAAGTTCGGAC/GTAGCTTTTATCCGTTGAGCGA	498

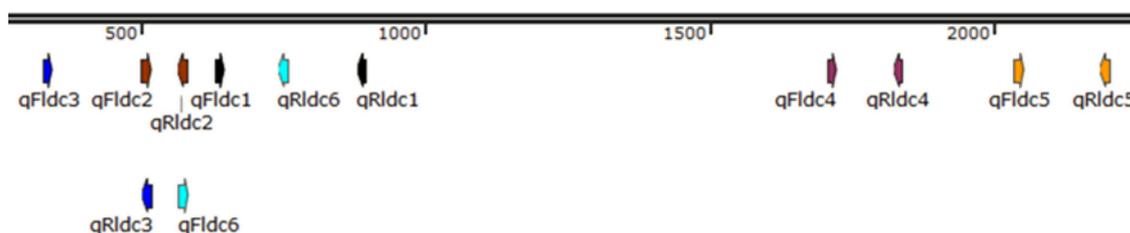


Figure 14 : Position des amorces dans le gène *ldc*

#### 3.2.2.3.2. Tests d'exclusivité

Les six couples d'amorces, évalués en PCR point final, n'ont généré d'amplification avec aucune des espèces de bactéries à Gram positif testées, ni avec les espèces de bactéries à Gram négatif n'appartenant pas à la famille des *Enterobacteriaceae* (Tableau 10).

Au sein de cette famille, une réponse positive avec les souches du genre *Serratia* a été obtenue pour le couple d'amorces qFldc6/qRldc6 qui a donc été exclu. Le couple d'amorces Fldc2/Rldc2 a permis de cibler uniquement d'espèce *Hafnia alvei* et a donc été validé pour la suite des expérimentations. Enfin, les couples d'amorces qFldc1/qRldc1, qFldc3/qRldc3, qFldc4/qRldc4 et qFldc5/qRldc5 ont permis d'obtenir une amplification à la fois avec *Hafnia alvei* et *Obesumbacterium proteus*, ce qui peut être d'intérêt tant que l'appartenance d'une part importante des isolats issus de viande de bœuf conservée sous vide à l'une ou l'autre de ces deux espèces n'est pas certaine.

Tableau 10 : Résultats de détection des tests d'exclusivité et d'inclusivité avec différentes souches bactériennes par PCR point final

Identité	N° souche	qF1dc1 / qR1dc1	qF1dc2 / qR1dc2	qF1dc3 / qR1dc3	qF1dc4 / qR1dc4	qF1dc5 / qR1dc5	qF1dc6 / qR1dc6
<i>Obesumbacterium proteus</i>	DSM 2777 <sup>T</sup>	+	-	+	+	+	-
<i>Hafnia paralvei</i>	CIP 104950 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	UCMA 3465	-	-	-	-	-	+
<i>Serratia grimesii</i>	UCMA 3895	-	-	-	-	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	CIP 103235 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
<i>Rahnella aquatilis</i>	UCMA 9040	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	UCMA 8550	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	UCMA 8432	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	UCMA 9022	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	UCMA 13491	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea ananatis</i>	UCMA 7517	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	UCMA 7218	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	UCMA 4217	-	-	-	-	-	-
<i>Raoultella planticola</i>	UCMA 3915	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	UCMA 6062 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	UCMA 3793	-	-	-	-	-	-
<i>Shimwellia pseudoproteus</i>	DSM 3038 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	UCMA 18319	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fragi</i>	UCMA 18323	-	-	-	-	-	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	UCMA 18331	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	UCMA 7405	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	UCMA 8186	-	-	-	-	-	-
<i>Carnobacterium divergens</i>	UCMA 14138	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus piscium</i>	UCMA 18097	-	-	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30163 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30101	-	-	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30098	+	+	+	-	-	-

<i>Hafnia alvei</i>	DSM 102038	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	CIP 104949	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 17629	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 18345	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14205	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14207	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14186	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14163	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 17625	-	-	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i> ( <i>Obesumbacterium proteus</i> )	UCMA 17764	+	+	+	-	+	+
<i>Hafnia alvei</i> ( <i>Obesumbacterium proteus</i> )	UCMA 17765	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i> ( <i>Obesumbacterium proteus</i> )	UCMA 17633	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i> ( <i>Obesumbacterium proteus</i> )	UCMA 17636	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i> ( <i>Obesumbacterium proteus</i> )	UCMA 14126	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i> ( <i>Obesumbacterium proteus</i> )	UCMA 17769	+	+	+	+	+	+
<i>H. alvei/paralvei/O. proteus</i>	UCMA 17772	-	-	-	-	-	-
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18398	+	+	+	-	+	+
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18399	-	-	-	-	+	-
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18401	+	+	+	-	+	+
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18412	+	+	+	-	+	+
NE ( <i>Hafnia/Obesumbacterium</i> )	UCMA 18397	-	-	-	-	-	-
NE ( <i>Obesumbacterium</i> )	UCMA 14153	-	-	-	-	-	-

### 3.2.2.3.3. Tests d'inclusivité

Pour les souches de référence de *Hafnia alvei* DSM 30136<sup>T</sup>, DSM 102038 et CIP 104949, une amplification a été obtenue avec l'ensemble des couples d'amorces testés (Tableau 10). En revanche, pour la souche de référence DSM 30098, une amplification n'a été obtenue qu'avec les couples d'amorces qF1dc1/qR1dc1, qF1dc2/qR1dc2 et qF1dc3/qR1dc3. La souche de référence DSM 30101 n'a répondu, de façon inattendue, à aucun des essais de PCR. Il pourrait être utile de confirmer son identité.

Pour les isolats issus de viande de bœuf sous vide et identifiés en tant que *Hafnia alvei*, tous les couples d'amorces ont généré un amplicon, sauf pour la souche UCMA 17625. Ceci pourrait s'expliquer car, d'après le dendrogramme basé sur les séquences d'ADNr 16S, cette souche semble plus proche de l'espèce *Hafnia paralvei* que de l'espèce *Hafnia alvei*, et pourrait donc avoir été mal identifiée. Le couple d'amorce qFldc4/qRldc4 ne génère pas d'amplicon pour certaines souches qui correspondent vraisemblablement à *Hafnia alvei* et a donc été écarté pour la suite des essais.

### 3.2.2.4. Validation en qPCR des amorces dessinées pour cibler *Hafnia alvei* ou *Obesumbacterium proteus*

#### 3.2.2.4.1. Sélectivité des couples d'amorces

Trois couples d'amorces (qFldc2/qRldc2, qFldc3/qRldc3 et qFldc5/qRldc5) ont été sélectionnés pour une validation de leur sélectivité en qPCR, technique plus sensible que la PCR point final. Les résultats obtenus avec les couples d'amorces sont présentés en Tableau 11.

Tableau 11 : Résultats de détection ( $C_T$ ) de différentes souches bactériennes par qPCR à l'aide des couples d'amorces qFldc2/qRldc2, qFldc3/qRldc3 et qFldc5/qRldc5

Identité	N° souche	qFldc2 / qRldc2	qFldc3 / qRldc3	qFldc5 / qRldc5
<i>Obesumbacterium proteus</i>	DSM 2777 <sup>T</sup>	34,31	<u>26,08</u>	<b>15,78</b>
<i>Hafnia paralvei</i>	CIP 104950 <sup>T</sup>	28,77	30,90	<u>24,42</u>
<i>Serratia liquefaciens</i>	UCMA 3465	28,33	33,16	35,79
<i>Serratia grimesii</i>	UCMA 3895	30,25	33,15	-
<i>Serratia marcescens</i>	CIP 103235 <sup>T</sup>	30,07	33,54	29,26
<i>Rahnella aquatilis</i>	UCMA 9040	29,09	33,95	30,24
<i>Yersinia enterocolitica</i>	UCMA 8550	29,35	32,75	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	UCMA 8432	29,03	33,49	37,70
<i>Roultella planticola</i>	UCMA 3915	29,10	29,38	32,71
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	UCMA 6062 <sup>T</sup>	31,69	33,15	35,22
<i>Shimwellia pseudoproteus</i>	DSM 3038 <sup>T</sup>	38,15	32,39	34,50
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30163 <sup>T</sup>	<b>12,16</b>	<b>11,06</b>	<b>11,36</b>
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14126	<b>17,24</b>	<b>16,44</b>	<b>17,37</b>

Avec les couples qFldc2/qRldc2, une fluorescence significative est détectée entre 12 et 17 cycles de PCR ( $C_T < 20$ ) pour les souches correspondant à *Hafnia alvei*. Pour les autres espèces, un signal tardif apparaît ( $C_T > 28$ ) pour un groupe correspondant à d'autres espèces que *Hafnia alvei*. Ce point pourrait être optimisé en jouant sur la température d'hybridation des amorces lors des cycles PCR. L'espèce *Obesumbacterium proteus* se confirme comme non ou peu réactive (valeurs proches de celles du témoin) avec ce couple d'amorces.

Avec le couple qFldc3/qRldc3 une fluorescence significative est détectée entre 11 et 16 cycles de PCR pour les souches correspondant à *Hafnia alvei*. Pour la plupart des autres espèces, un signal tardif apparaît ( $C_T > 29$  voire  $> 33$ ). En revanche, un léger signal ( $C_T =$

26) est généré par *Obesumbacterium proteus* dans ces conditions. Ici encore, une optimisation du protocole pourrait être envisagée en travaillant sur la température d'hybridation des amorces lors des cycles PCR.

Enfin, le couple qFldc5/qRldc5 s'est confirmé comme permettant une détection aussi efficace d'*Obesumbacterium proteus* que de *Hafnia alvei* ( $C_T$  entre 11 et 17). Pour la plupart des autres espèces, un signal tardif apparaît ( $C_T > 29$  voire  $> 33$ ). En revanche, un signal intermédiaire ( $C_T = 24$ ) est généré par *Hafnia paralvei* dans ces conditions. Ici encore, une optimisation du protocole pourrait être envisagée en travaillant sur la température d'hybridation des amorces lors des cycles PCR.

Sous réserve de résultats complémentaires, l'utilisation du couple qFldc2/qRldc2 pourrait être envisagée pour détecter spécifiquement *Hafnia alvei* dans le cadre d'un protocole se limitant à 28-30 cycles de PCR ou en optimisant les conditions de réaction. Le couple qFldc3/qRldc3, qui donne une réponse intermédiaire sur *Obesumbacterium proteus*, pourrait alors être écarté.

Un travail d'optimisation des conditions de PCR pour le couple d'amorces qFldc5/qRldc5 permettant d'écarter *Hafnia paralvei* pourrait permettre d'envisager son utilisation pour la quantification de *Hafnia alvei* et *Obesumbacterium proteus*.

#### 3.2.2.4.2. Préparation d'une courbe standard

La suite du travail a été réalisée en ciblant les amorces les plus appropriées à la quantification spécifique d'*Hafnia alvei*. A ce stade, le couple qFldc5/qRldc5 a donc été laissé de côté. L'amplification par PCR au sein du gène *ldc* d'un fragment de 390 pb comprenant les deux zones *ldc2* et *ldc3* a été réalisée à l'aide des amorces qFldc390/qRldc390 (Tableau 9 et Figure 15) sur 8 souches de *Hafnia alvei* et une souche de *Obesumbacterium proteus*.

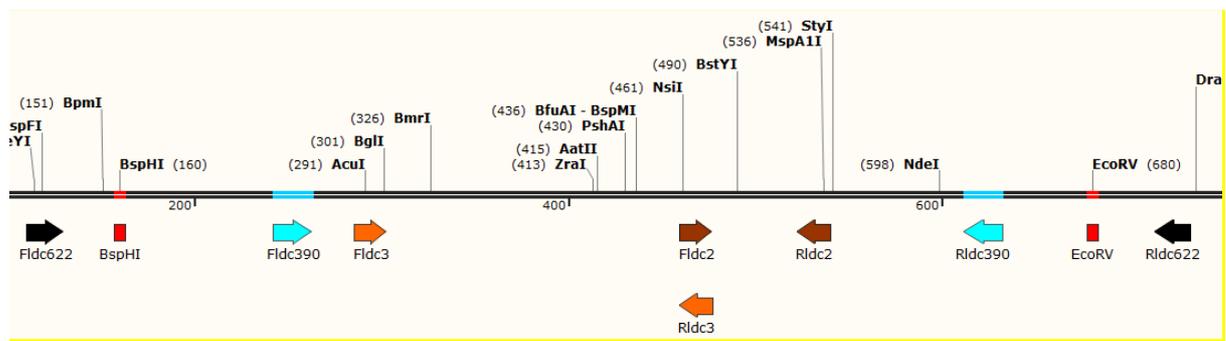


Figure 15 : Position des amorces qFldc390 et qRldc390 dans le gène *ldc*

L'alignement des séquences obtenues a permis de choisir quatre souches parmi les neuf sélectionnées initialement pour lesquelles il y avait la meilleure complémentarité pour les couples d'amorces étudiés. Le résultat de l'alignement pour l'amorce qFldc2 est présenté à titre d'exemple en Figure 16. *Obesumbacterium proteus* DSM 2777<sup>T</sup> présente trois substitutions, ce qui peut expliquer qu'elle réponde pas ou peu au couple d'amorce qFldc2/qRldc2. Les souches *Hafnia alvei* CIP 104949 et DSM 30098 présentent toutes les deux un seul polymorphisme (SNP, marqué par un cercle rouge en Figure 16) qui pourrait, selon les conditions utilisées, atténuer leur réponse en qPCR. En revanche, les séquences des souches *Hafnia alvei* UCMA 14136, UCMA 14205, UCMA 17629 et DSM 30163<sup>T</sup> présentent une parfaite complémentarité. Pour constituer l'ADN cible, notre choix s'est donc porté sur les séquences de 390 pb portées par ces souches de *Hafnia alvei*.

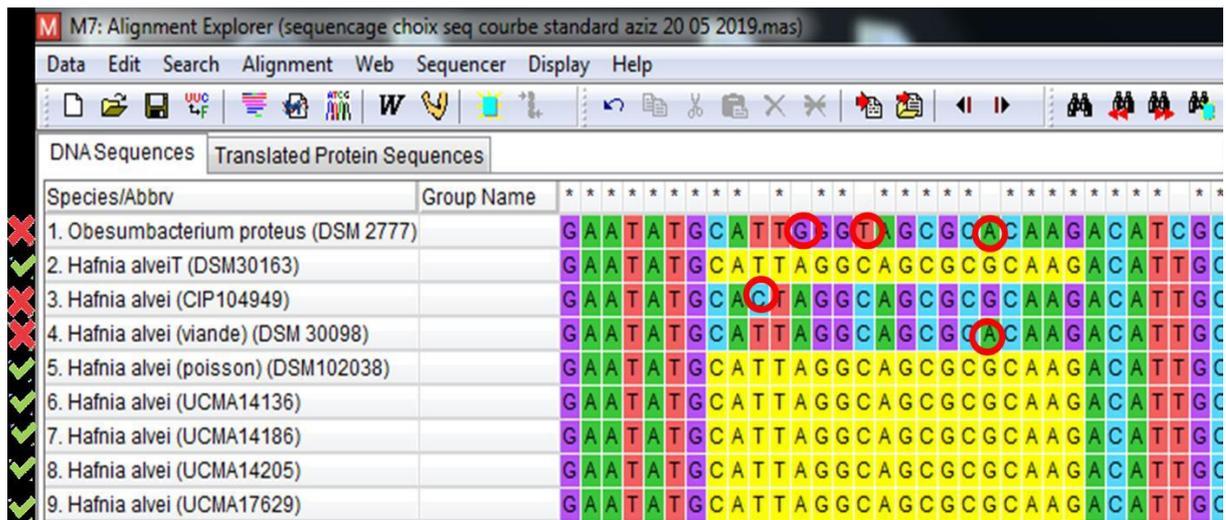


Figure 16 : Exemple d'alignement des séquences sur la zone correspond à la séquence complémentaire de l'amorce qFIdc

Les amplicons de ces quatre souches ont été employés pour les étapes de clonage et de transformation. Suite à la vérification (4 répétitions par souche) par PCR M13 de la présence d'un insert dans les plasmides extraits des cellules transformées, les amplicons issus des souches de *Hafnia alvei* UCMA 14205, UCMA 17629 et DSM 30163<sup>T</sup> ont été détectés. Des résultats variables ont été obtenus selon les répétitions pour l'amplicon de la souche *Hafnia alvei* UCMA 14136 qui a donc été écarté. Après linéarisation des plasmides et quantification du nombre de copies (Figure 18), les matrices ont pu être utilisées pour la réalisation d'une courbe standard sur la base de trois répétitions par concentration (Figure 18 et Figure 19). L'efficacité de l'amplification était de 95% pour qFIdc2/qRIdc2 et de 104% pour qFIdc3/qRIdc3 ce qui est dans l'intervalle acceptable [75-125%].

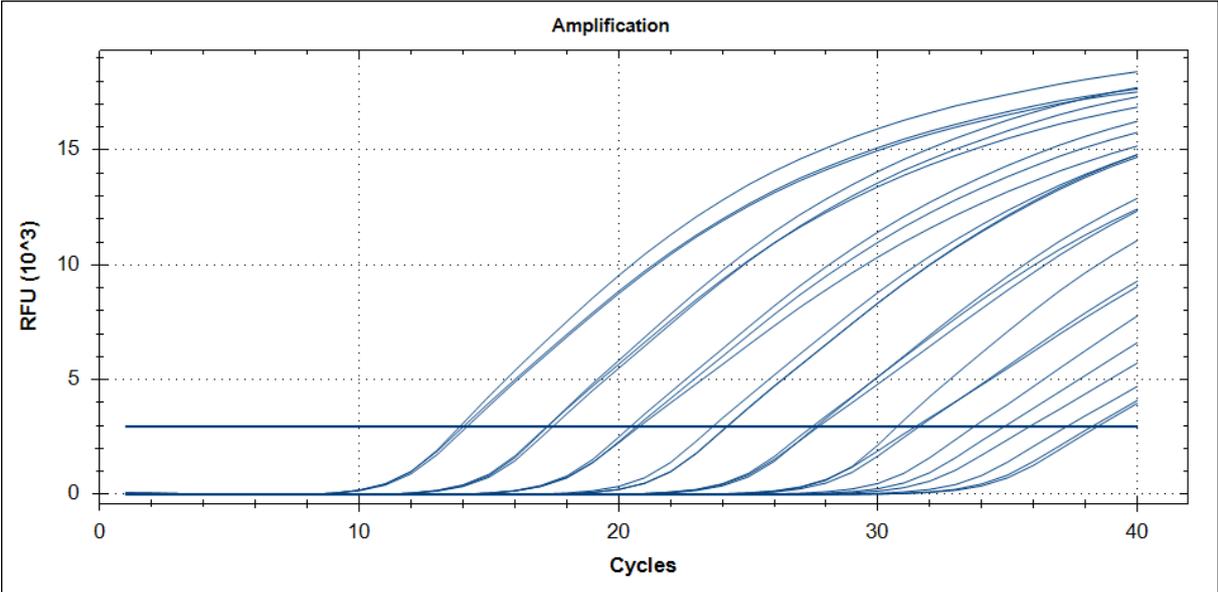


Figure 17 : Courbe d'amplification obtenue à partir de 8 dilutions décimales successives de l'ADN cible (n=3) avec le couple d'amorces qFIdc2/qRIdc2

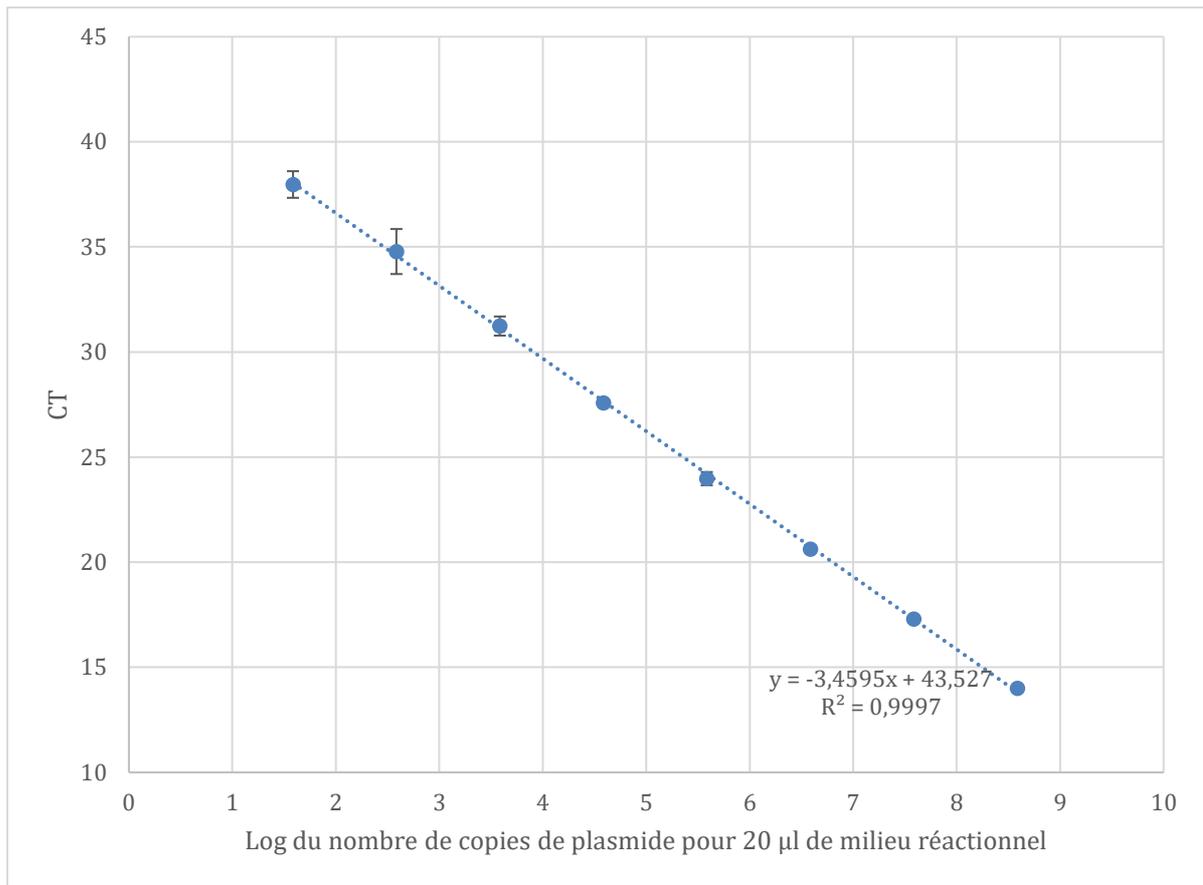


Figure 18 : Courbe standard obtenue avec le couple d'amorces qFIdc2/qRIdc2

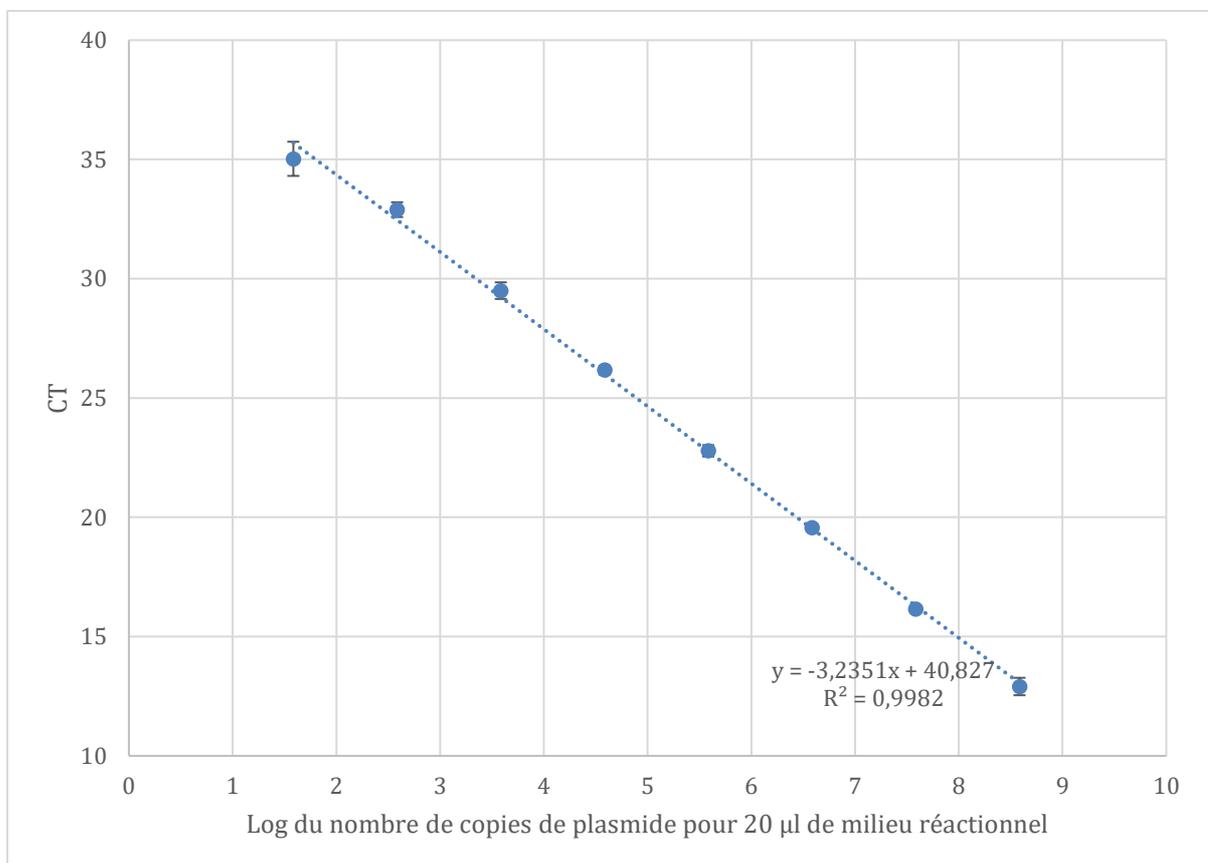


Figure 19 : Courbe standard obtenue avec le couple d'amorces qFIdc3/qRIdc3

### 3.2.2.5. Essai de transposition de la technique pour la quantification de *Hafnia alvei* à partir de matrice carnée

#### 3.2.2.5.1. Evaluation de kits d'extraction de l'ADN total à partir de viandesensemencées en surface par *Hafnia alvei*

Trois kits d'extraction ont tout d'abord été évalués à partir des morceaux de viande bœufensemencés par la souche type de *Hafnia alvei* à hauteur d'environ  $10^6$  UFC/g. L'extraction a été réalisée à partir d'une suspension-mère au 1/10<sup>ème</sup> préparée en diluant Tryptone-sel à partir d'environ 8 g de viandeensemencée.

La valeur du ratio A260/280 caractérisant le niveau de pureté de la solution d'ADN obtenue indique que le kit NucleoSpin Soil permet l'obtention d'ADN génomique de qualité acceptable avec une valeur très proche de 2 (Tableau 12). Suit le kit NucleoSpin Food avec une valeur de 2,19. Le ratio obtenu pour le kit DNeasyPower Soil indiquait une qualité d'ADN non acceptable avec une valeur de 0,63.

Tableau 12 : Evaluation de la qualité et de la concentration d'ADN obtenue à l'aide de trois kits commerciaux d'extraction

Kit d'extraction	Concentration d'ADN obtenue (ng.µL <sup>-1</sup> )	Qualité (A260/280)
NucleoSpin Soil	9,65	1,90
NucleoSpin Food	2,5	2,19
DNeasy Power Soil	1,8	0,63

Le kit NucleoSpin Soil a été présélectionné et soumis à un nouvel essai de façon à tester les quatre variantes du protocole d'extraction (SL1, SL2, SL1+SX et SL2+SX) proposées par le fournisseur. L'extraction a été réalisée à partir d'une suspension-mère préparée dans les mêmes conditions.

Les valeurs du ratio 260/280 supérieures ou égales à 1,8 (Tableau 13) indiquent que l'extrait de l'ADN obtenu présente un bon niveau de pureté vis-à-vis de la contamination possible par des protéines. En revanche, le ratio 260/230 est très bas (< 1,6) indiquant la présence de contaminants co-purifiés (sels, contaminants organiques). La concentration en ADN obtenue reste, elle aussi, relativement basse, en lien avec le niveau d'ensemencement choisi pour les viandes et le mode de préparation de la suspension-mère. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le protocole SL2 qui a été conservé pour la suite des essais. Divers essais d'optimisation ont été menés (augmentation du volume de pise d'essai, modification du temps de broyage de la suspension) sans conduire à l'amélioration des résultats.

Tableau 13 : Evaluation de la qualité et de la concentration d'ADN obtenue à l'aide de quatre variantes du protocole d'extraction proposées pour le kit NucleoSpin Soil

Protocole d'extraction	Essai	Concentration ADN (ng/ $\mu$ L)	Ratio 260/230	Ratio 260/280
SL1	1	2,55	0,21	1,96
	2	6,48	0,27	1,92
	3	2,82	0,11	2,3
	4	3,9	0,13	2,31
SL2	1	10,88	0,74	1,84
	2	11,6	0,60	1,97
	3	14,78	0,45	1,93
	4	9,95	0,63	1,97
SL1+SX	1	3,97	0,57	2,14
	2	3,91	0,57	2,21
	3	4,77	0,18	1,99
	4	3,77	0,19	2,27
SL2+SX	1	5,64	0,36	1,96
	2	7,06	0,37	2,03
	3	5,8	0,17	1,95
	4	7,01	0,21	1,97

#### 3.2.2.5.2. Validation de la méthode à l'aide de suspensions mères issues d'essais de vieillissement de viandesensemencées par deux souches de *Hafnia alvei*

Lors des analyses microbiologiques menées par l'IDELE au cours de ces essais, les échantillons de viande de bœuf choisis avaient été initialement contaminés par *Hafnia alvei* à hauteur de  $10^1$  ou  $10^3$  UFC/g avant conservation sous vide pendant 33 à 44 jours à 2 ou 4°C. L'ADN total a été extrait selon le protocole SL2 du kit NucleoSpin Soil à partir de suspensions-mères concentrées (25 cm<sup>2</sup>/25 mL). Les extraits d'ADN obtenus ont fait l'objet d'une quantification et d'une analyse de qualité (Tableau 14). Les mesures ont été réalisées deux fois à partir de chaque extrait (répétitions 1 et 2). Des rendements d'extraction variables selon les échantillons, et globalement satisfaisants ont été obtenus, à de rares exceptions près (marquées en gras dans le tableau). De nouveau, les valeurs du ratio 260/280 majoritairement supérieures à 1,8 indiquent que l'extrait d'ADN obtenu présente un bon niveau de pureté vis-à-vis de la contamination possible par des protéines. A de rares exceptions près, le ratio 260/230 est resté similaire à celui obtenu lors des essais de sélection des kits d'extraction (< 1,6), indiquant la présence de contaminants copurifiés (sels, contaminants organiques). Les valeurs obtenues pour les deux répétitions sont cohérentes avec des écarts plus marqués sur les valeurs correspondant à de très faibles concentrations d'ADN.

Tableau 14 : Evaluation de la qualité et de la concentration d'ADN obtenue à partir de suspensions-mères issues d'échantillons de rond de gîte ensemencés artificiellement par *H. alvei*

Echantillon	Niveau d'ensemencement en <i>H. alvei</i>	Température de conservation (°C)	Temps de conservation (jours)	Répétition	Concentration d'ADN (ng/μL)	Ratio 260 / 230	Ratio 260 / 280
Souche 1, rond de gîte 1	10 <sup>3</sup>	2	0	1	13,62	0,55	1,90
				2	12,11	0,43	1,98
			33	1	5,76	0,12	1,94
				2	5,41	0,12	1,96
Souche 1, rond de gîte 2	10 <sup>3</sup>	4	0	1	36,77	1,52	1,87
				2	35,8	1,34	1,89
			33	1	17,75	0,55	1,91
				2	15,99	0,76	1,90
			40	1	50,99	1,62	1,87
				2	48,88	1,51	1,87
Souche 1, rond de gîte 4	10 <sup>3</sup>	4	0	1	20,14	0,18	1,88
				2	18,32	0,16	1,87
			33	1	10,52	0,14	1,84
				2	10,8	0,14	1,89
			40	1	84,69	1,24	1,89
				2	75,65	1,27	1,87
Souche 2, rond de gîte 2	10 <sup>3</sup>	4	0	1	5,71	0,11	1,82
				2	<b>2,32</b>	0,07	2,42
			33	1	<b>0,97</b>	0,33	3,46
				2	<b>1,75</b>	0,23	2,41
	10 <sup>1</sup>	4	40	1	10,07	1,21	1,92
				2	11,02	0,81	1,95
			33	1	5,11	0,2	1,77
				2	4,46	0,18	1,91
Souche 2, rond de gîte 5	10 <sup>3</sup>	2	0	1	7,32	0,14	1,8
				2	7,15	0,13	1,85
			33	1	<b>1,51</b>	0,02	2,18
				2	<b>3,66</b>	0,04	1,89
40	1	11,43	0,39	1,77			
	2	12,53	0,36	1,84			

Les extraits d'ADN (un par échantillon et par temps de conservation) ont été soumis au protocole de qPCR à l'aide des couples d'amorces qFldc2/qRldc2 (pour la totalité des échantillons) et qFldc3/qRldc3 (pour les huit premiers échantillons).

Des exemples de courbes d'amplification sont présentés en Figure 20 (qFldc2/qRldc2) et Figure 22 (qFldc3/qRldc3). Elles correspondent à 8 des échantillons analysés et à un témoin sans ADN. A l'issue des 40 cycles de PCR, le témoin négatif est bien resté sous le seuil de détection de fluorescence pour qFldc2/qRldc2 (ce qui permet de valider l'expérimentation) alors qu'il génère un faible signal de fluorescence après 30 cycles pour qFldc3/qRldc3, ce qui ne permet pas de différencier le signal du témoin de celui des plus faibles concentrations et renforce l'intérêt de travailler sur des valeurs de  $C_T \leq 30$ . Les pics de fusion sont bien positionnés à la même température (autour de 81,5°C) pour qFldc2/qRldc2 (Figure 21), indiquant que la réaction d'amplification est bien spécifique. En revanche, un décalage est observé avec qFldc3/qRldc3 (Figure 23).

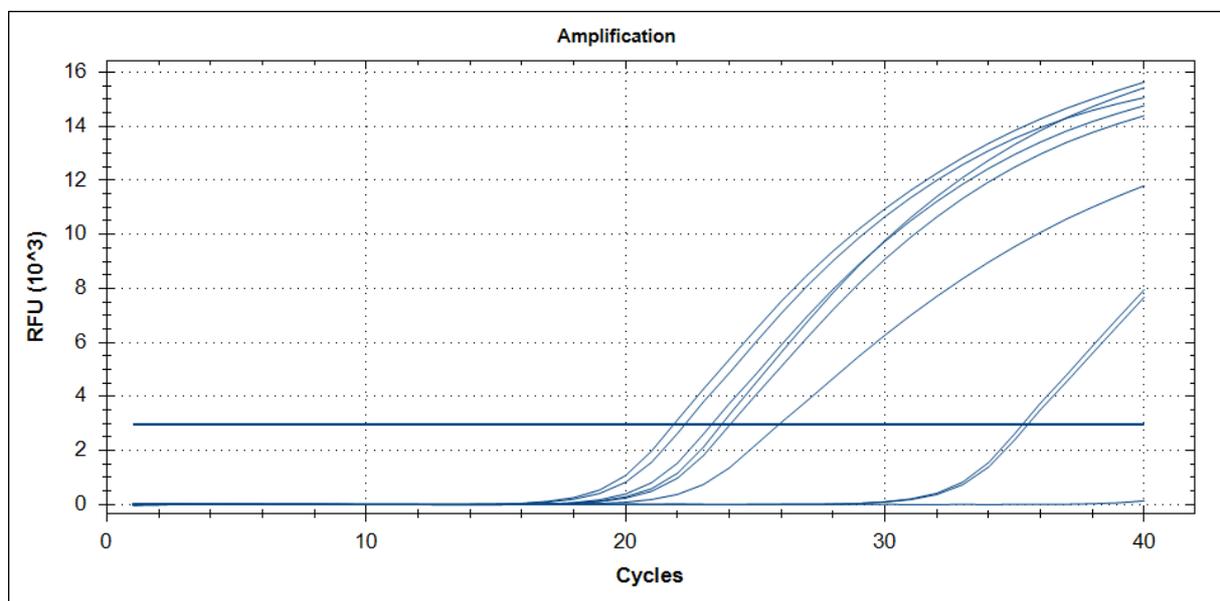


Figure 20 : Courbes d'amplification obtenues à l'aide du couple d'amorces qFldc2/qRldc2 pour la quantification de *Hafnia alvei* dans des échantillons de viande

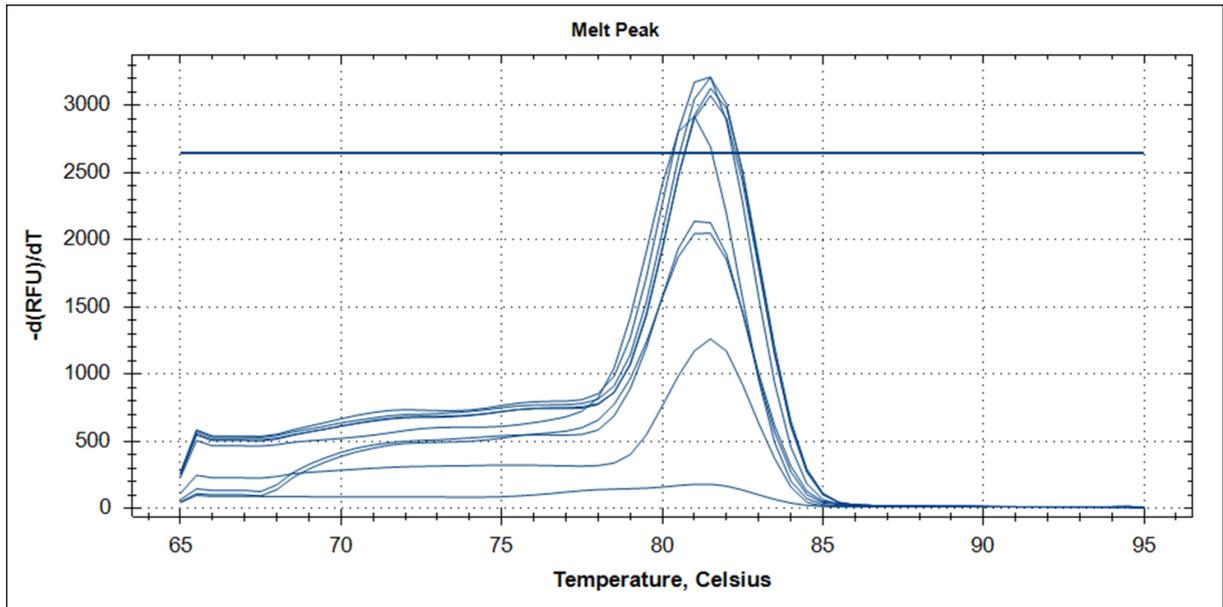


Figure 21 : Pics de fusion obtenus à l'aide du couple d'amorces qFldc2/qRldc2 lors de la quantification de *Hafnia alvei* dans des échantillons de viande

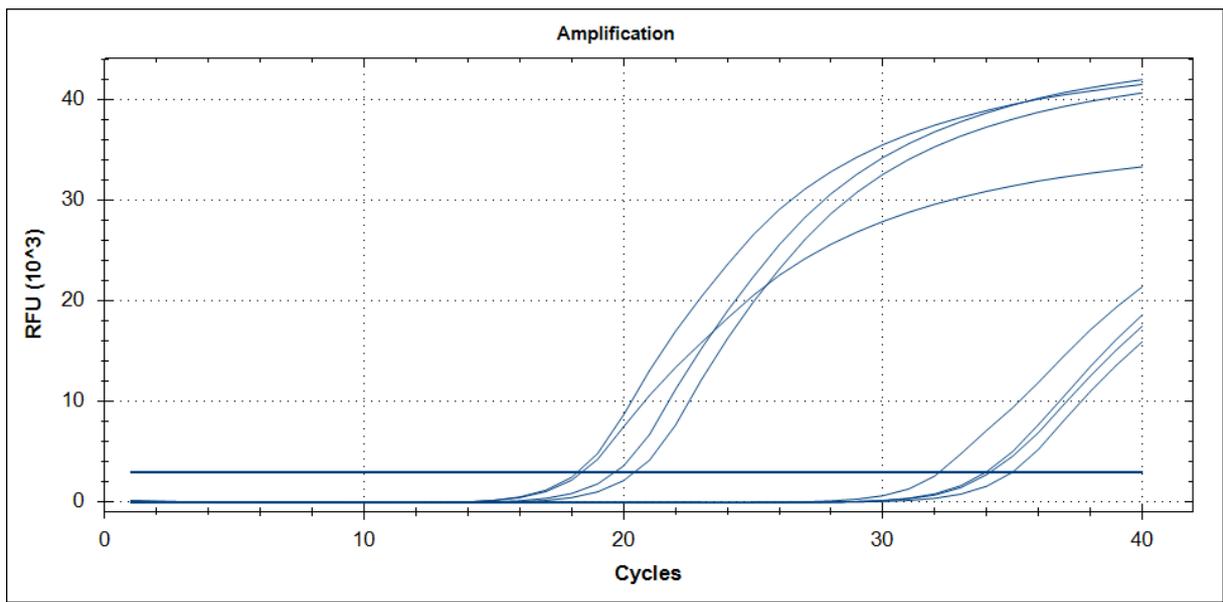


Figure 22 : Courbes d'amplification obtenues à l'aide du couple d'amorces qFldc3/qRldc3 pour la quantification de *Hafnia alvei* dans des échantillons de viande

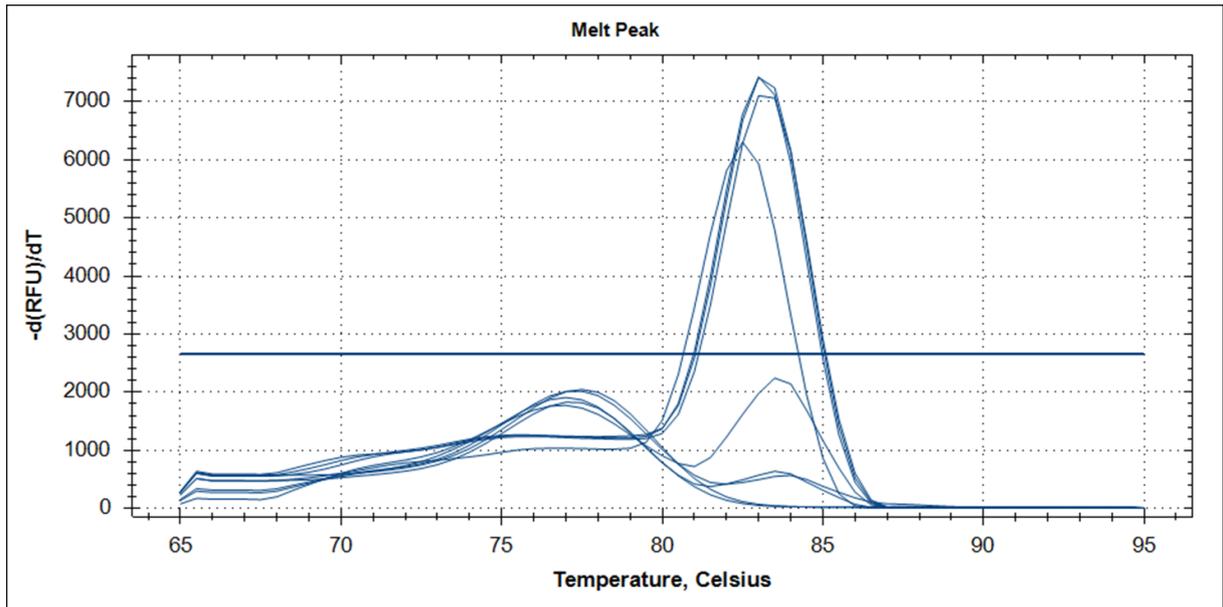


Figure 23 : Pics de fusion obtenus à l'aide du couple d'amorces qF1dc3/qR1dc3 lors de la quantification de *Hafnia alvei* dans des échantillons de viande

Tableau 15 : Quantification de *Hafnia alvei* dans des échantillons artificiellement contaminés

Echantillon	Niveau initial d'ensemencement en <i>H. alvei</i>	Température de conservation (°C)	Temps de conservation (jours)	Ct		Concentration calculée (nombre de copies/cm <sup>2</sup> ) à partir de la courbe standard)	
				qFldc2 / qRldc2	qFldc3 / qRldc3	qFldc2 / qRldc2	qFldc3 / qRldc3
Souche 1, rond de gîte 1	10 <sup>3</sup>	2	0	33,95	33,64	1,7.10 <sup>5</sup>	6,6.10 <sup>4</sup>
			33	20,29	33,84	1,9.10 <sup>9</sup>	5,9.10 <sup>4</sup>
Souche 1, rond de gîte 2	10 <sup>3</sup>	4	0	32,92	31,95	3,5.10 <sup>5</sup>	2,3.10 <sup>5</sup>
			33	20,06	19,41	2,2.10 <sup>9</sup>	8,0.10 <sup>8</sup>
			40	20,69	20,20	1,4.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>
Souche 1, rond de gîte 4	10 <sup>3</sup>	4	0	35,28		< SD*	
			33	22,26		1,3.10 <sup>8</sup>	
			40	23,29		3,5.10 <sup>8</sup>	
Souche 2, rond de gîte 2	10 <sup>3</sup>	4	0	37,02	34,68	2,2.10 <sup>4</sup>	3,2.10 <sup>4</sup>
			33	18,59	18,17	5,8.10 <sup>9</sup>	4,4.10 <sup>9</sup>
			40	18,44	18,02	6,6.10 <sup>9</sup>	4,9.10 <sup>9</sup>
	10 <sup>1</sup>	4	33	24,01		1,1.10 <sup>7</sup>	
40	23,68			2,9.10 <sup>7</sup>			
Souche 2, rond de gîte 5	10 <sup>3</sup>	2	0	35,48		< SD	
			33	25,88		2,0.10 <sup>6</sup>	
			40	21,83		8,3.10 <sup>7</sup>	

\*< SD = valeur inférieure au seuil de détection

Compte-tenu des réserves émises sur la spécificité de la qPCR pour les valeurs de  $C_T$  supérieures à 30 (cf. partie 3.2.2.4.1), celles-ci ont été écartées et ne permettent donc pas de quantifier la concentration initiale en *Hafnia alvei* dans les échantillons de viande, compte-tenu des faibles niveaux d'ensemencement choisis ( $10^1$  ou  $10^3$  ufc/cm<sup>2</sup>). Les résultats obtenus avec les deux couples d'amorces qFldc2/qRldc2 et qFldc3/qRldc3 sont du même ordre de grandeur pour les valeurs de  $C_T$  supérieures au seuil de détection.

La comparaison est à faire pour calibration avec les résultats obtenus par dénombrement sur ces mêmes échantillons lors des essais menés par l'IDELE.

Tableau 16 : Comparaison entre concentrations en *Hafnia alvei* obtenues par qPCR à l'aide des amorces qFldc2/qRldc2 et concentrations déterminées sur milieu VRBG

Echantillon	Niveau initial d'ensemencement en <i>H. alvei</i>	Température de conservation (°C)	Temps de conservation (jours)	Concentration calculée (nombre de copies/cm <sup>2</sup> ) à partir de la courbe standard)	Concentration (nombre d'ufc/cm <sup>2</sup> ) obtenue par dénombrement sur VRBG
Souche 1, rond de gîte 1	$10^3$	2	0	$2,9.10^{4*}$	$4,3.10^3$
			33	$1,1.10^8$	$8,6.10^6$
Souche 1, rond de gîte 2	$10^3$	4	0	$2,4.10^{5*}$	$2,4.10^3$
			33	$6,7.10^8$	$1,2.10^7$
			40	$1,3.10^9$	$9,3.10^6$
Souche 1, rond de gîte 4	$10^3$	4	0	$1,6.10^{4*}$	$2,2.10^3$
			33	$1,3.10^8$	$1,4.10^7$
			40	$3,5.10^8$	$1,7.10^7$
Souche 2, rond de gîte 2	$10^3$	4	0	$2,0.10^{3*}$	$4,5.10^3$
			33	$2,0.10^8$	$8,6.10^6$
			40	$1,0.10^9$	$6,9.10^6$
	$10^1$	4	33	$1,1.10^7$	$8,6.10^6$
			40	$2,9.10^7$	$4,7.10^6$
Souche 2, rond de gîte 5	$10^3$	2	0	$3,7.10^{3*}$	$3,4.10^3$
			33	$2,0.10^6$	$1,4.10^7$
			40	$8,3.10^7$	$1,8.10^7$

\*données estimées sur des valeurs de  $C_T > 30$

Les concentrations obtenues par qPCR à l'aide du couple qFldc2/qRldc2 ont été comparées à celles obtenues par dénombrement à l'aide du milieu VRBG. Les valeurs issues de la qPCR sont presque toujours supérieures d'un à deux logarithmes, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que cette méthode de qPCR tient compte de l'ADN des cellules vivantes comme mortes, ce qui peut conduire à des valeurs supérieures. La corrélation entre les concentrations obtenues par qPCR et celles obtenues par dénombrement ne peut pas être établie faute de données dans les basses concentrations. Pour réaliser une première estimation, les valeurs de concentrations estimées obtenues sur les basses concentrations (échantillons de viande à T0) ont été incluses. Un coefficient de corrélation  $r = 0,90$  a été obtenu.

### 3.2.3. Conclusion

Ce travail a permis de souligner la diversité des souches de *Hafnia* isolées de viande de bœuf conditionnée sous vide avec 17 génotypes mis en évidence et une capacité variable à produire du gaz. La définition d'amorces spécifiques de l'espèce *Hafnia alvei* s'est révélée relativement complexe, notamment en lien avec sa proximité avec *Obesumbacterium proteus*. Les essais réalisés en qPCR mettent en avant l'intérêt du couple qFldc2/qRldc2 qui présente les meilleures performances, en particulier en termes de sélectivité vis-à-vis de l'espèce *Hafnia alvei*.

Dans le cas de viandes sous vide présentant une non-conformité en entérobactéries en fin de vie (concentration > M, soit > 10<sup>5</sup> ufc/g), la méthode proposée ici pourrait permettre d'identifier rapidement une non-conformité associée à une concentration élevée en *Hafnia alvei*, de façon spécifique. Afin d'abaisser le seuil de quantification, la méthode peut encore être optimisée, notamment en modifiant la température d'hybridation des amorces. Une validation sur des échantillons de viande avec des concentrations intermédiaires en *Hafnia alvei* et sur des témoins négatifs devrait également être mise en œuvre.

S'il s'avère utile à l'avenir de disposer d'une méthode de qPCR pour quantifier simultanément *Hafnia alvei* et *Obesumbacterium proteus*, le couple qFldc5/qRldc5 reste d'intérêt, avec une optimisation des conditions d'amplification. Enfin, le protocole d'extraction de l'ADN total à partir des suspensions de viande pourrait être encore optimisé voire remplacé par d'autres protocoles utilisés dans la filière et ayant fait leurs preuves.

## 4. Conclusions et perspectives

Cette étude a permis de mieux comprendre les caractéristiques de *Hafnia alvei* et notamment ses capacités de développement sur des viandes de bœuf conservées sous vide. L'étude bibliographique a confirmé le classement de *Hafnia alvei* parmi les *Enterobacteriaceae*. Cette bactérie est retrouvée dans de nombreuses études sur des substrats très variés et notamment des substrats alimentaires. En particulier, elle peut être présente sur des viandes de bœufs conditionnées sous vide ayant ou non des défauts de conservation. Cependant, la littérature ne permettait pas de confirmer ou infirmer le pouvoir altérant de *Hafnia alvei*. Ceci a donc été testé dans cette étude expérimentale.

Deux souches de *Hafnia alvei* présentant des capacités différentes en termes de production gazeuse ont été inoculées sur de la viande. Dans cette étude de vieillissement sous vide à 2 ou 4°C, la bactérie n'a pas entraîné d'altération de l'aspect visuel ou odorant de la viande après 40 jours de conservation.

Une cautérisation de la surface des muscles a permis d'éliminer toutes les *Enterobacteriaceae* mais une flore résiduelle, constituée de levures et de bacilles Gram positif, a persisté. Indépendamment de la souche de *Hafnia alvei* et de la concentration inoculée, la concentration finale de *Hafnia* observée sur les produits préalablement cautérisés semble se stabiliser à environ  $8.10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> après 40 jours de conservation sous vide. La flore aérobie mésophile se stabilise autour de  $1,5.10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>. Plus la concentration initiale en *Hafnia alvei* est élevée, plus le maximum de croissance bactérienne est vite atteint, quelle que soit la température de conservation.

L'étude bibliographique a également mis en évidence l'absence de méthode fiable pour identifier et quantifier spécifiquement *Hafnia alvei*. Cette bactérie présente en effet des caractéristiques très similaires avec d'autres *Enterobacteriaceae* telles que *Obesumbacterium proteus*. La deuxième partie de ce projet a permis de mettre au point une méthode de quantification de *Hafnia alvei* sur matrice carnée par qPCR à l'aide d'amorces qF1dc2/qR1dc2.

Dans le cadre de viandes de bœuf présentant une non-conformité en *Enterobacteriaceae*, la méthode mise au point dans cette étude permet actuellement d'identifier les échantillons pour lesquels cette non-conformité est liée à un nombre élevé de *Hafnia alvei*. Bien que la méthode semble pouvoir être optimisée et sous réserve d'une validation sur des échantillons à concentrations variable en *Hafnia alvei*, il est déjà envisageable d'utiliser la méthode qPCR pour affiner la détection de viandes à retirer de la consommation ou non sur un critère *Hafnia alvei*.

### 4.1. Perspectives

L'étude du développement de *Hafnia alvei* a été réalisée dans des conditions de température mimant un environnement professionnel. Il pourrait être intéressant de compléter l'étude par une température de conservation proche de 8°C, correspondant à des conditions de conservation chez un particulier. De plus, dans cette étude, la température de conservation (2 ou 4°C) ne semble pas influencer les effectifs bactériens. La température pourrait peut-être influencer la vitesse de croissance mais les points de contrôle étaient trop peu nombreux dans cette étude pour pouvoir le démontrer.

Dans le cadre de ce projet, le développement de *Hafnia alvei* a été étudié dans des conditions de départ stériles. En conditions réelles, une flore complexe est déjà en place lors du conditionnement. Le projet pourrait donc se poursuivre par une analyse du

développement de *Hafnia alvei* et de l'ensemble de la population microbienne dans des conditions non stériles : équilibre de populations, compétition/inhibition...

La bibliographie a montré la présence de *Hafnia alvei* en conditions aérobies ou sous atmosphère. Cependant le développement de la bactérie dans ces conditions n'est pas encore connu et aucune donnée n'est rapportée sur les conséquences de ce développement sur la qualité sensorielle des produits.

Cette étude a démontré que *Hafnia alvei* pouvait se développer jusqu'à atteindre une concentration élevée, dépassant les seuils de conformité en Entérobactéries actuellement en place dans la filière. Cependant, aucune altération de la viande n'a été observée et la bibliographie réalisée ne semble pas montrer de risques pour la santé humaine liés en particulier à cette bactérie. Les résultats de ce projet apportent donc des éléments dans la discussion qui peut être faite sur les critères microbiologiques à appliquer aux viandes conditionnées sous vide.

Bien que les développements méthodologiques réalisés au cours de ce projet permettent d'identifier et quantifier *Hafnia alvei* en particulier, la méthode de qPCR pourrait encore être optimisée au niveau de l'extraction d'ADN et des conditions de température de PCR. A terme, ces optimisations pourraient permettre l'utilisation de cette méthode en routine dans des laboratoires prestataires. Le développement d'un kit spécifique utilisable dans les laboratoires industriels pourrait également être envisagé suivant les besoins de la filière.

Même si *Hafnia alvei* est une *Enterobacteriaceae*, l'étude a montré que malgré de fortes concentrations, il n'y avait pas d'altération de la viande de bœuf lors d'une conservation sous vide. A l'aide de la méthode qPCR de quantification et de différenciation de *Hafnia* au sein des *Enterobacteriaceae* développée dans ce projet, le critère de conformité basé sur le taux d'*Enterobacteriaceae* pourrait être complété par un critère spécifique à *Hafnia alvei*.

## 5. Références bibliographiques

Adeolu, M., S. Alnajar, S. Naushad, and R. S Gupta. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the "Enterobacteriales": proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66:5575–5599. doi:10.1099/ijsem.0.001485.

AFNOR. 2004. NF ISO 21528-2 Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des Enterobacteriaceae - Partie 2 : méthode par comptage des colonies.

Bahr, L. 1919. Paratyfus hos Honningbien samt nogle undersøgelser vedrørende Forekomsten af Bakterier henhørende til Coli-tyfus gruppen. i. Honningbiens tarm. Scand Vet Tidsskr. 9:25-40,45-60.

Bascomb, S., S. P. Lapage, W. R. Willcox, and M. A. Curtis. 1971. Numerical classification of the tribe Klebsiellae. J. Gen. Microbiol. 66:279–295. doi:10.1099/00221287-66-3-279.

Bièche-Terrier, C., M. Fleury, and N. Desmasures. 2018. Vers une meilleure caractérisation des flores bactériennes présentes dans les muscles et portions unitaires de viandes bovines conditionnées sous vide. Institut de l’Elevage, Interbev, Université de Caen.

Borch, E., M. L. Kant-Muermans, and Y. Blixt. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33:103–120. doi:10.1016/0168-1605(96)01135-x.

Brightwell, G., R. Clemens, S. Urlich, and J. Boerema. 2007. Possible involvement of psychrotolerant Enterobacteriaceae in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. *Int. J. Food Microbiol.* 119:334–339. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.024.

Bruhn, J. B., A. B. Christensen, L. R. Flodgaard, K. F. Nielsen, T. O. Larsen, M. Givskov, and L. Gram. 2004. Presence of acylated homoserine lactones (AHLs) and AHL-producing bacteria in meat and potential role of AHL in spoilage of meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4293–4302. doi:10.1128/AEM.70.7.4293-4302.2004.

Capita, R., A. Castaño-Arriba, C. Rodríguez-Melcón, G. Igrejas, P. Poeta, and C. Alonso-Calleja. 2020. Diversity, antibiotic resistance, and biofilm-forming ability of enterobacteria isolated from red meat and poultry preparations. *Microorganisms*. 8:1226. doi:10.3390/microorganisms8081226.

Charnpi, C., E. Van Reckem, N. Sameli, D. Van der Veken, L. De Vuyst, and F. Leroy. 2020. The use of less conventional meats or meat with high pH can lead to the growth of undesirable microorganisms during natural meat fermentation. *Foods*. 2020:1386. doi:10.390/foods9101386.

Cousin, F. J., R. Le Guellec, V. Chuat, M. Dalmaso, J.-M. Laplace, and M. Cretenet. 2019. Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* 291:17–24. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.004.

Doulgeraki, A. I., D. Ercolini, F. Villani, and G.-J. E. Nychas. 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 157:130–141. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020.

Doulgeraki, A. I., S. Paramithiotis, and G.-J. E. Nychas. 2011. Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 145:77–83. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.030.

Ercolini, D., I. Ferrocino, A. Nasi, M. Ndagijimana, P. Vernocchi, A. L. Stora, L. Laghi, G. Mauriello, M. E. Guerzoni, and F. Villani. 2011. Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7372–7381. doi:10.1128/AEM.05521-11.

Fougy, L. 2016. Les impacts de la réduction de la teneur en sel sur la conservation et les écosystèmes bactériens des chipolatas [Thèse de doctorat]. Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas.

Greipsson, S., and F. G. Priest. 1983. Numerical taxonomy of *Hafnia alvei*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 33:470–475. doi:10.1099/00207713-33-3-470.

- Gu, Z., Y. Liu, L. Shen, X. Liu, N. Xiao, N. Jiao, H. Liu, Y. Zhou, and S. Zhang. 2015. *Hafnia psychrotolerans* sp. nov., isolated from lake water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65:971–974. doi:10.1099/ijs.0.000049.
- Gunthard, H., and A. Pennekamp. 1996. Clinical significance of extraintestinal *Hafnia alvei* isolates from 61 patients and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 22:1040–1045. doi:10.1093/clinids/22.6.1040.
- Hanna, M. O., G. C. Smith, L. C. Hall, and C. Vanderzant. 1979. Role of *Hafnia alvei* and a *Lactobacillus* species in the spoilage of vacuum-packaged strip loin steaks. *J. Food Prot.* 42:569–571. doi:10.4315/0362-028X-42.7.569.
- Hernández-Macedo, M. L., G. V. Barancelli, and C. J. Contreras-Castillo. 2011. Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: a review. *Braz. J. Microbiol.* 42:1–11. doi:10.1590/S1517-83822011000100001.
- Hernández-Macedo, M. L., C. J. Contreras-Castillo, S. M. Tsai, S. H. D. Cruz, C. I. G. L. Sarantopoulos, M. Padula, and C. T. S. Dias. 2012. Gases and volatile compounds associated with micro-organisms in blown pack spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *Lett. Appl. Microbiol.* 55:467–475. doi:https://doi.org/10.1111/lam.12004.
- Huys, G., M. Cnockaert, S. L. Abbott, J. M. Janda, and P. Vandamme. 2010. *Hafnia paralvei* sp. nov., formerly known as *Hafnia alvei* hybridization group 2. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:1725–1728. doi:10.1099/ijs.0.018606-0.
- Irlinger, F., S. A. Y. In Yung, A.-S. Sarthou, C. Delbès-Paus, M.-C. Montel, E. Coton, M. Coton, and S. Helinck. 2012. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 153:332–338. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.022.
- Janda, J. M., and S. L. Abbott. 2006. The genus *Hafnia*: from soup to nuts. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:12–28. doi:10.1128/CMR.19.1.12-28.2006.
- Joly, B., and A. Reynaud. 2003. Entéroactéries - Systématique et méthodes de diagnostic. TEC&DOC / EM INTER.
- Kang, D.-H., T. M. Arthur, and G. R. Siragusa. 2002. Gas formation in ground beef chubs due to *Hafnia alvei* is reduced by multiple applications of antimicrobial interventions to artificially inoculated beef trim stock. *J. Food Prot.* 65:1651–1655. doi:10.4315/0362-028x-65.10.1651.
- Koivula, T. T., R. Juvonen, A. Haikara, and M.-L. Suihko. 2006. Characterization of the brewery spoilage bacterium *Obesumbacterium proteus* by automated ribotyping and development of PCR methods for its biotype 1. *J. Appl. Microbiol.* 100:398–406. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02794.x.
- Le Minor, L., and C. Richard. 1993. Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur. Paris.

Litrenta, J., and M. Oetgen. 2017. *Hafnia alvei*: A new pathogen in open fractures. *Trauma Case Rep.* 8:41–45. doi:10.1016/j.tcr.2017.01.019.

Lucas, N., S. Azhar, C. Deroissart, M.-A. Le Sollic, M. Dominique, J. Rondeaux, S. Nobis, C. Guérin, F. Léon, J.-C. do Rego, P. Déchelotte, S. Fetissoff, G. Lambert, and R. Legrand. 2019. Un nouveau probiotique, *Hafnia alvei*, réduit le gain de poids dans deux modèles murins d'obésité en agissant sur les voies centrales et périphériques de l'homéostasie énergétique. *Nutr. Clin. Métabolisme.* 33:22–23. doi:10.1016/j.nupar.2019.01.257.

Mansur, A. R., E.-J. Song, Y.-S. Cho, Y.-D. Nam, Y.-S. Choi, D.-O. Kim, D.-H. Seo, and T. G. Nam. 2019. Comparative evaluation of spoilage-related bacterial diversity and metabolite profiles in chilled beef stored under air and vacuum packaging. *Food Microbiol.* 77:166–172. doi:10.1016/j.fm.2018.09.006.

McSharry, S., L. Koolman, P. Whyte, and D. Bolton. 2021. The microbiology of beef from carcass chilling through primal storage to retail steaks. *Curr. Res. Food Sci.* 4:150–162. doi:10.1016/j.crfs.2021.03.002.

Padilla, D., F. Acosta, J. Ramos-Vivas, V. Grasso, J. Bravo, F. E. Aamri, and F. Real. 2015. The pathogen *Hafnia alvei* in veterinary medicine: a review. *J. Appl. Anim. Res.* 43:231–235. doi:10.1080/09712119.2014.963086.

Prest, A. G., J. R. M. Hammond, and G. S. A. B. Stewart. 1994. Biochemical and molecular characterization of *Obesumbacterium proteus*, a common contaminant of brewing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1635–1640. doi:10.1128/AEM.60.5.1635-1640.1994.

Reid, R., S. Fanning, P. Whyte, J. Kerry, R. Lindqvist, Z. Yu, and D. Bolton. 2017. The microbiology of beef carcasses and primals during chilling and commercial storage. *Food Microbiol.* 61:50–57. doi:10.1016/j.fm.2016.08.003.

Richter, S. S., L. Sercia, J. A. Branda, C.-A. D. Burnham, M. Bythrow, M. J. Ferraro, O. B. Garner, C. C. Ginocchio, R. Jennemann, M. A. Lewinski, R. Manji, A. B. Mochon, J. A. Rychert, L. F. Westblade, and G. W. Procop. 2013. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32:1571–1578. doi:10.1007/s10096-013-1912-y.

Ridell, J. 1999. *Hafnia alvei*. In: R. K. Robinson, editor. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, Oxford. p. 973–976. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270703007601>

Rossi Junior, O. D., L. M. Felipe, T. M. Martineli, and A. J. Mesquita. 2011. Study of the microbiota causing “blown pack” spoilage of vacuum-packed beef. *ARS Vet. Jaboticabal.* 27:94–101.

Säde, E., A. Murros, and J. Björkroth. 2013. Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food Microbiol.* 34:252–258. doi:10.1016/j.fm.2012.10.007.

Stanbridge, L. H., and A. R. Davies. 1998. Microbiology of chill-stored meat. *Microbiol. Meat Poult.* Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302885258>

Sutherland, J. P., J. T. Patterson, and J. G. Murray. 1975. Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* 39:227–237. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1975.tb00568.x>.

Tan, J.-Y., W.-F. Yin, and K.-G. Chan. 2014. Quorum sensing activity of *Hafnia alvei* isolated from packed food. *Sensors.* 14:6788–6796. doi:10.3390/s140406788.

Université Paris Descartes. *Hafnia alvei*. Available from: <http://www.microbes-edu.org/mecanisme/Pheno1/hafnia.html>

Versalovic, J., T. Koeuth, and R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19:6823–6831. doi:10.1093/nar/19.24.6823.

Vivas, J., D. Padilla, F. Real, J. Bravo, V. Grasso, and F. Acosta. 2008. Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Vet. Microbiol.* 129:150–155. doi:10.1016/j.vetmic.2007.11.007.

Zhu, L., R. Liao, N. Wu, G. Zhu, and C. Yang. 2019. Heat stress mediates changes in fecal microbiome and functional pathways of laying hens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:461–472. doi:10.1007/s00253-018-9465-8.

## 6. Annexes

### 6.1. Souches utilisées dans cette étude

Identité	N°	Caractéristiques	Substrat
<b>Espèces proches génétiquement de <i>Hafnia alvei</i></b>			
<i>Citrobacter freundii</i>	UCMA 4217		Livarot
<i>Enterobacter cloacae</i>	UCMA 8432		Lait cru
<i>Enterobacter ludwigii</i>	UCMA 9022		Lait cru
<i>Escherichia coli</i>	UCMA 7218	0157:H7 stx-	Fèces de génisse
<i>Hafnia paralvei</i>	CIP 104950 <sup>T</sup>		Prélèvement humain
<i>Obesumbacterium proteus</i>	DSM 2777 <sup>T</sup>		Levure de brasserie
<i>Pantoea agglomerans</i>	UCMA 13491		Trèfle
<i>Pantoea ananatis</i>	UCMA 7517		Lait cru
<i>Proteus vulgaris</i>	UCMA 3793		Livarot
<i>Rahnella aquatilis</i>	UCMA 9040		Lait cru
<i>Roultella planticola</i>	UCMA 3915		Livarot
<i>Salmonella enterica</i>	LMG 7233 <sup>T</sup>	Sérovar Typhimurium	
<i>Serratia liquefaciens</i>	UCMA 3465		Caillé de Livarot
<i>Serratia grimesii</i>	UCMA 3895		Livarot
<i>Serratia marcescens</i>	CIP 103235 <sup>T</sup>		Eau de bassin
<i>Shimwellia pseudoproteus</i>	DSM 3038 <sup>T</sup>		Levure de brasserie
<i>Yersinia enterocolitica</i>	UCMA 550		Lait cru
<b>Espèces présentes dans le même habitat</b>			
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	UCMA 18331		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Carnobacterium divergens</i>	UCMA 14138		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Lactococcus piscium</i>	UCMA 18097		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Pseudomonas fragi</i>	UCMA 18323		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	UCMA 7405		Lait cru
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	UCMA 18319		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	UCMA 8186		Lait cru
<b>Souches de référence représentant la diversité génétique de l'espèce</b>			
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30163 <sup>T</sup>		Inconnu
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30101		Viande hachée
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30098		Lait cru
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 102038		Boulettes de poisson conditionnées
<i>Hafnia alvei</i>	CIP 104949		Humain
<b>Isolats provenant de l'habitat ciblé (projet Interbev)</b>			
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 17768		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 17773		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 17629		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 18345		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 18365		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 18366		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14205		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14206		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14207		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14208		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14209		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14198		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14202		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14203		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14204		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14186		Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14187		Bœuf réfrigéré sous vide

<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14188	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14189	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14190	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14191	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14193	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14194	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14151	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14154	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14156	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14159	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14162	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14163	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14167	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14170	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14133	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14135	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14136	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 14137	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 17625	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 17626	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei</i>	UCMA 18367	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei/paralvei</i>	UCMA 17774	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)*</i>	UCMA 17764	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)</i>	UCMA 17765	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)</i>	UCMA 17767	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)</i>	UCMA 17770	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)</i>	UCMA 17633	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)</i>	UCMA 17634	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)</i>	UCMA 17635	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)</i>	UCMA 17636	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)</i>	UCMA 14126	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei (Obesumbacterium sp.)</i>	UCMA 17776	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei / Obesumbacterium proteus**</i>	UCMA 17769	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei / Obesumbacterium proteus</i>	UCMA 17631	Bœuf réfrigéré sous vide
<i>Hafnia alvei/paralvei/Obesumbacterium proteus</i>	UCMA 17772	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium</i> )***	UCMA 18421	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18398	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18399	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18400	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18401	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18405	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18412	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18420	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18422	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18423	Bœuf réfrigéré sous vide
ND ( <i>Hafnia/Obesumbacterium/Serratia</i> )	UCMA 18424	Bœuf réfrigéré sous vide
NE ( <i>Hafnia/Obesumbacterium</i> )	UCMA 18397	Bœuf réfrigéré sous vide
NE ( <i>Hafnia/Obesumbacterium</i> )	UCMA 18368	Bœuf réfrigéré sous vide
NE ( <i>Obesumbacterium</i> )****	UCMA 14153	Bœuf réfrigéré sous vide

\**Hafnia alvei (Obesumbacterium proteus)* = identification la plus probable en tant que *Hafnia alvei*, mais possibilité de *Obesumbacterium*

\*\* *Hafnia alvei / Obesumbacterium proteus* = séquence aboutissant à l'identification de l'une ou l'autre de ces espèces

\*\*\* ND (*Hafnia/Obesumbacterium*) = séquence ne permettant pas d'aboutir à une identification, Genres les plus probables : *Hafnia* et *Obesumbacterium*

\*\*\*\* NE (*Obesumbacterium*) = séquence de qualité non exploitable, le genre *Obesumbacterium* apparait comme première possibilité mais ceci n'exclut pas d'autres genres.

6.2. Hauteur de gaz (mm) dans la cloche Durham à 30°C en aérobiose par 66 isolats bactériens proches de *Hafnia* provenant de viande de bœuf sous vide

N° isolat (UCMA)	24 heures	72 heures
14126	0,3	1,8
14133	0,5	1,7
14135	0,3	1,1
14136	0,3	1,2
14137	0,6	1,8
14151	0,5	1,8
14153	0,2	1,0
14154	0,4	1,3
14156	0,4	1,7
14159	0,3	0,9
14162	0,3	1,4
14163	0,5	1,7
14167	0,6	1,8
14170	0,5	1,7
14186	0,2	1,4
14187	0,3	0,9
14188	0,3	1,3
14189	0,4	1,3
14190	0,3	1,0
14191	0,2	1,4
14193	0,5	1,8
14194	0,3	1,1
14198	0,3	1,4
14202	0,6	1,8
14203	0,4	1,1
14204	0,3	1,6
14205	0,4	1,4
14206	0,3	1,4
14207	0,4	0,9
14208	0,4	1,4
14209	0,4	1,1
17625	0,5	3,5
17626	0,1	1,7

17629	0,0	1,0
17631	0,0	1,2
17633	0,1	1,2
17634	0,0	1,3
17635	0,1	1,7
17636	0,4	1,8
17764	0,0	3,5
17765	0,2	1,1
17767	0,0	0,6
17768	0,4	1,2
17769	0,5	1,4
17770	0,8	3,5
17772	0,3	1,6
17773	0,2	1,1
17774	0,2	1,0
17776	0,3	1,2
18345	0,3	1,1
18365	0,3	1,3
18366	0,4	1,4
18367	0,3	1,0
18368	0,4	1,2
18397	0,3	3,5
18398	0,2	0,9
18399	0,4	1,6
18400	0,2	1,9
18401	0,3	1,5
18405	0,8	1,6
18412	0,5	1,7
18420	0,3	1,1
18421	0,5	1,2
18422	0,4	1,6
18423	0,6	1,8
18424	0,4	1,0
Témoin	0,0	0,0

6.3. Hauteur de gaz (mm) dans la cloche Durham à 5°C en aérobiose par 66 isolats bactériens proches de *Hafnia* provenant de viande de bœuf sous vide

N° isolat (UCMA)	1 j	2 j	3 j	6 j	7 j	11 j	12 j	15 j	17 j	19 j	22 j
14126	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,6
14133	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6
14135	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
14136	0	0	0	0	0,1	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5
14137	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5
14151	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5
14153	0	0	0	0	0	0,5	0,6	0,8	0,9	1,0	1,0
14154	0	0	0	0	0	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
14156	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,2	0,4	0,5	0,5
14159	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4
14162	0	0	0	0	0	0,2	0,3	0,3	0,5	0,7	0,8
14163	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5
14167	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5
14170	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,5	0,6	0,6	0,6
14186	0	0	0	0	0	0,2	0,25	0,3	0,3	0,5	0,5
14187	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6
14188	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,5	0,6	0,7
14189	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5
14190	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,6
14191	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6
14193	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6
14194	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6
14198	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6
14202	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,5	0,6	0,7
14203	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6
14204	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5
14205	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6
14206	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
14207	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,7
14208	0	0	0	0	0	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
14209	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
17625	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,6
17626	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,5	0,5	0,6	0,6
17629	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0,6	0,7	0,8
17631	0	0	0	0	0,1	0,4	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
17633	0	0	0	0	0,1	0,4	0,5	0,5	0,5	0,7	0,8
17634	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,7	0,7	0,8	0,9
17635	0	0	0	0	0,2	1,2	1,2	1,2	1,3	1,5	1,5
17636	0	0	0	0	0,2	0,5	0,6	0,9	1,0	1,0	1,1
17764	0	0	0	0	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5

6.4. Hauteur de gaz (mm) dans la cloche Durham à 30°C en anaérobiose par 66 isolats bactériens proches de *Hafnia* provenant de viande de bœuf sous vide

N° isolat (UCMA)	24 heures	72 heures
14126	0,5	1,4
14133	0,5	1,5
14135	0,7	1,9
14136	0,4	1,4
14137	0,4	1,0
14151	0,4	1,0
14153	0,3	1,4
14154	0,4	1,3
14156	0,6	1,9
14159	0,3	1,0
14162	0,9	3,5
14163	0,5	1,4
14167	0,7	1,7
14170	0,5	1,4
14186	0,4	1,0
14187	0,3	0,9
14188	0,35	1,2
14189	0,3	1,5
14190	0,7	1,6
14191	0,3	1,4
14193	0,3	0,8
14194	0,4	1,5
14198	0,35	1,3
14202	0,35	1,0
14203	0,3	1,4
14204	0,7	1,8
14205	1,2	3,5
14206	0,5	1,7
14207	0,3	0,9
14208	0,4	1,0
14209	0,35	1,2
17625	0,0	1,8
17626	0,1	1,6
17629	0,0	0,8
17631	0,2	0,9
17633	0,0	0,5
17634	0,1	0,9
17635	0,0	0,9
17636	0,4	1,4
17764	0,1	0,8