

Etude de l'impact de la congélation/décongélation sur
l'évolution de la microflore endogène de la viande
hachée conditionnée sous atmosphère modifiée

Study of the impact of freezing/thawing on the evolution of
the endogenous microflora of minced meat packed in a
modified atmosphere

Mathilde Vertcour-Monami

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecin Vétérinaire

Année académique 2022/2023

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

Etude de l'impact de la congélation/décongélation sur
l'évolution de la microflore endogène de la viande
hachée conditionnée sous atmosphère modifiée

Study of the impact of freezing/thawing on the evolution of
the endogenous microflora of minced meat packed in a
modified atmosphere

Mathilde Vertcour-Monami

Tuteur : Pr. Georges Daube

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecin Vétérinaire

Année académique 2022/2023

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

Etude de l'impact de la congélation/décongélation sur l'évolution de la microflore endogène de la viande hachée conditionnée sous atmosphère modifiée

OBJECTIF DU TRAVAIL : Cette étude a pour but d'évaluer dans quelles proportions les différentes méthodes de décongélation peuvent impacter la croissance ultérieure de la microflore endogène de la viande hachée de porc et bœuf.

RESUME :

La viande hachée est un type de denrées alimentaires de plus en plus consommé. Comme pour tout aliment cru d'origine animale, une contamination microbienne y est associée. Par le processus de fabrication de la viande hachée ou des préparations à base de viande, les bactéries présentes en surface sont amenées en profondeur dans l'entièreté du produit.

La congélation est une technique de conservation de plus en plus utilisée par les consommateurs afin d'augmenter la durée de vie de leurs denrées alimentaires périssables. Mais il est important d'assurer un bon processus de décongélation à ces denrées, non seulement pour éviter une perte de qualité organoleptique, mais également afin de limiter la multiplication d'éventuelles bactéries pathogènes.

Afin de déterminer leurs influences, différentes méthodes de décongélation ont été testées sur 3 lots de viande hachée conditionnée sous atmosphère modifiée (70% O₂/30% CO₂) provenant de trois magasins différents. Les viandes décongelées ont été conservées pendant 5 jours sous réfrigération (7°C). Ensuite, un dénombrement microbien et un analyse métagénétique ont été réalisées afin de mettre en évidence d'éventuelles différences qualitatives ou quantitatives.

Ces expériences ont montré que les trois viandes sont très différentes en termes de contamination bactérienne initiale. Il est donc impossible de regrouper les résultats, mais des tendances similaires sont visibles. La congélation a permis une réduction des entérobactéries dans tous les cas, plus importante lors d'une congélation longue (de 1 mois dans cette expérience). La congélation longue, a contrario d'une congélation de 7 jours, a aussi permis une réduction de la flore totale pour toutes les viandes. Les résultats concernant *Pseudomonas* sont plus aléatoires et, en ce qui concerne les bactéries lactiques, une

différence significative a été observée après 28 jours de congélation avec un impact de la méthode de décongélation. On constate également une modification des genres bactériens majoritaires après congélation, surtout la plus longue, mais sans impact significatif marqué entre les différentes méthodes de décongélation.

Study of the impact of freezing/thawing on the evolution of the endogenous microflora of minced meat packed in a modified atmosphere

AIM OF THE WORK: The purpose of this study is to evaluate the extent to which different thawing methods can impact the growth of endogenous microflora in ground pork and beef.

SUMMARY:

Minced meat is an increasingly popular type of food. As with any raw food of animal origin, microbial contamination is associated with it. During the manufacturing process for minced meat and meat preparations, bacteria present on the surface are carried deep into the product.

Freezing is a preservation technique increasingly used by consumers to extend the shelf life of their food purchases. But it's important to ensure a proper thawing process for these foods, not only to avoid loss of organoleptic quality, but also to limit the multiplication of any pathogenic bacteria.

To determine their influence, different thawing methods were tested on 3 batches of minced meat packaged under modified atmosphere (70% O₂/30% CO₂) from three different stores. The thawed meats were stored under refrigeration at 7°C for 5 days, then analyzed by microbial enumeration and metagenetics to highlight any qualitative or quantitative differences.

Following these experiments, it was found that the three meats were very different in terms of initial bacterial contamination. It is therefore impossible to group the results, but similar trends are visible. Freezing led to a reduction in Enterobacteriaceae in all cases, more so with long freezing. Long freezing, in contrast to 7-day freezing, also led to a reduction in total flora for all meats. Results for Pseudomonas were more variable, and for lactic acid bacteria, a significant difference was observed only after 28 days of freezing, with an impact of the thawing method. There was also a change in the majority bacterial genera after freezing, especially the longest, but without any marked differential impact of the different thawing methods.

Remerciements

Au Professeur Georges Daube, pour m'avoir permis de réaliser un travail de recherche sur un sujet intéressant, pour m'avoir poussé à la découverte, pour son aide, sa bienveillance et sa disponibilité, mais également pour m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la recherche et des denrées alimentaires

A Sébastien Crévecoeur, pour son aide, sa confiance, sa bienveillance et sa disponibilité tout au long de ce projet

Au Docteur Bernard Taminiau, pour son implication, ses conseils et son temps

A Sophie Fourny, pour m'avoir accompagnée, aidée, soutenue et motivée durant cette année

A Coralie, Raphaëlle et Irma, pour vos conseils, votre aide, votre accueil et votre gentillesse sans faille

Au département des Sciences des denrées alimentaires, pour votre accueil durant cette année

A mes parents, pour m'avoir permis d'entamer ces études et de m'avoir soutenue dans tous mes choix

Table des matières

1. INTRODUCTION	9
1.1. Evolution de la consommation de viande	9
1.2. Viande hachée	9
1.3. Flore altérante et pathogène	10
1.4. Conservation : principes de congélation, surgélation et décongélation	14
1.5. Méthodes d'analyses microbiologiques : dénombrement par culture	15
1.6. Méthodes d'analyses génétiques : métagénomique ciblée	16
2. OBJECTIFS	16
3. MATERIEL ET METHODE	16
3.1. Design expérimental	16
3.1.1. Protocole 1	17
3.1.2. Protocole 2	19
3.2. Analyses microbiologiques	22
3.2.1. Ensemencements	22
3.2.2. Dénombrements	24
3.3. Analyses génétiques	24
4. RESULTATS	25
4.1. Protocole 1	28
4.2. Protocole 2	31
4.2.1. Analyses immédiates	31
4.2.2. Analyses après conservation à 7°C pendant 5 jours	36
5. DISCUSSION	43
6. CONCLUSION	50
7. BIBLIOGRAPHIE	50
8. ANNEXES	56
8.1. Annexe 1 : plan de congélation et d'analyses protocole 1	56

8.2.	Annexe 2 : plan de congélation et d'analyse protocole 2	57
8.3.	Annexe 3 : ensemencements réalisés lors du protocole 1 et du protocole 2	58
8.4.	Annexe 4 : résultats généraux des dénombrements microbiologiques (en log UFC/g)	60
8.5.	Annexe 5 : résultats généraux de métagénomique - Delhaize	61
8.6.	Annexe 6 : résultats généraux métagénomique – Carrefour (D) et Colruyt (C)	62

1. Introduction

1.1. Evolution de la consommation de viande

En 2014, la dernière enquête nationale de consommation alimentaire rapporte une diminution de 6% en ce qui concerne la consommation de viande et de produits à base de viande en Belgique par rapport aux données récoltées en 2004. En parallèle à cette diminution globale de la consommation de viande, la consommation de viande hachée a augmenté au détriment des viandes nobles (Quelle est la consommation de viande et de poisson en Belgique ?, 2022).

En 2021, la consommation apparente de viande, qui correspond à la quantité totale de viande mise sur le marché national, exprimée en poids de carcasse s'élevait à 81,7 kg (poids équivalent carcasse). Cette valeur ne correspond donc pas à la valeur de consommation réelle et ne peut donc pas être comparée aux valeurs mentionnées directement puisque qu'une carcasse ne contient pas que le muscle, mais également des os, des tendons, la peau et d tissus fibreux qui ne sont pas consommables. D'autre part, la valeur moyenne de viande commercialisable s'élevait à 64,4 kg par habitant par an, dont, 32,8 kg sont issus de porc, 13,8 kg de la viande de volaille et 10,8 kg de la viande de bœuf/veau. Cependant, ces valeurs restent surestimées puisqu'elles ne tiennent ni compte du gaspillage alimentaire ni de la fraction de viande utilisée dans l'alimentation animale (Quelle est la consommation de viande et de poisson en Belgique ?, 2022).

1.2. Viande hachée

Selon le règlement (CE) n° 853/2004, la viande hachée et les préparations de viandes sont considérées comme des viandes fraîches. Ce règlement définit

- Les viandes fraîches : «les viandes n'ayant subi aucun traitement de conservation autre que la réfrigération, la congélation ou la surgélation, y compris les viandes conditionnées sous vide ou sous atmosphère contrôlée »
- Les viandes hachées : « les viandes désossées qui ont été soumises à une opération de hachage en fragment et contenant moins de 1 % de sel »
- Les préparations de viandes : «les viandes fraîches, y compris les viandes qui ont été réduites en fragments, auxquelles ont été ajoutés des denrées alimentaires, des condiments ou des additifs ou qui ont subi une transformation insuffisante

pour modifier à cœur la structure fibreuse des muscles et ainsi faire disparaître les caractéristiques de la viande fraîche ».

L'arrêté royal du 13 juillet 2014 fixe un délai de maximum 48 h après préparation pour la vente de produits à base de viande hachée. Toutefois, le Comité scientifique responsable de l'évaluation du projet d'arrêté royal relatif à l'hygiène des denrées alimentaires approuve (Avis 24-2013) un délai de vente au-delà de 48 h à condition que l'opérateur réalise une évaluation des risques démontrant que le produit peut être vendu durant une plus longue période.

Afin d'être transformée en produit final, la viande doit être hachée. Le hachage favorise la dissémination des micro-organismes et peut donc induire leur développement au cœur du produit. Ce procédé nécessite aussi plus de manipulations, ce qui est susceptible d'apporter de nouvelles contaminations. Puisqu'aucun traitement d'inactivation ne sera appliqué à la préparation par la suite, les viandes hachées présentent un risque microbiologique plus élevé. C'est pourquoi l'AFSCA recommande de conserver la viande hachée à maximum 4 °C afin de limiter le développement des micro-organismes.

On considère que, malgré sa transformation, la viande hachée conserve les caractéristiques physico-chimiques de la viande fraîche. L' a_w de la viande fraîche est de $\pm 0,98$, elle sera cependant légèrement diminuée par l'ajout de sel dans les préparations de viande. Le pH quant à lui se situe entre 5,3 et 5,8 (Lenges et Demeyer, 1999; Cauchie et al., 2020).

1.3. Flore altérante et pathogène

En ce qui concerne les bactéries retrouvées dans la viande hachée, elles peuvent être classées en microflore pathogène et microflore altérante.

La flore altérante est responsable de la putréfaction et du verdissement de la denrée alimentaire provoquées, entre autres, par *Pseudomonas* spp, *Brochothrix thermosphacta*, les entérobactéries et certaines bactéries lactiques (Koutsoumanis et al., 2006; Nychas et al., 2008; Delhalle et al., 2016; Jiang et al., 2022).

La flore pathogène, quant à elle, induit, entre autres, des troubles digestifs plus ou moins graves. Les pathogènes les plus significatifs sont *Salmonella* spp., *Escherichia coli* entérohémorragiques, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*

jejuni/coli, mais également *Staphylococcus aureus* (Choi et al., 2013; De Filippis et al., 2013; Wang et al., 2015; Weinroth et al., 2019).

Le tableau I présente les caractéristiques des principales bactéries retrouvées dans de la viande hachée.

Tableau I : Caractéristiques et origine des différentes bactéries pouvant être retrouvées dans la viande hachée de porc et bœuf

	Bactérie	Caractéristiques	Conditions de croissance			Source de la contamination	Références
			Température (°C)	pH	a _w		
F L O R E A L T E R A N T E	<i>Pseudomonas</i> spp	Bacille Gram – Aérobie	4-42	4,5- 9,5	>0,97	Environnement	Klein et al., 2009 Limsong et Frazier, 1966 Meng et al., 2017
	<i>Brochotrix thermosphacta</i>	Bacille Gram + Anaérobie facultatif	-3,4-30	5-8	>0,94	Environnement	Fall, 2011 Blickstad, 1984 Freiner, 2006
	<i>Clostridium perfringens</i>	Bacille Gram + Sporulant Anaérobie	10-52	5-8,3	>0,95	Tractus digestif des mammifères	Anses, 2019a
	<i>Photobacterium</i> spp	Gram - Coccobacille Aéro-anaérobie facultatif	4-45	4-11		Eau	Moi et al., 2017
	<i>Leuconostoc</i> spp	Bactérie lactique Coque Gram + Anaérobie facultatif	20-30 (optimum)			Viande fraîche Environnement Plantes	Salvetti et al., 2021 Devoyod et Poullain, 1988 Nychas et al., 2008
	<i>Lactococcus</i> spp	Bactérie lactique Coque Gram +	-4,8-27	>4,8	<~2,3 g de NaCl/100 mL	Environnement	Fall, 2011 Nychas et al., 2008

F L O R E	<i>Salmonella</i> spp	Entérobactérie Bacille Gram – Aéro-anaérobie	5-50	3,8- 9,5	>0,94	Tractus digestif porc, bovin et volailles	Anses, 2021c
	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques	Entérobactérie Bacille Gram – Aéro-anaérobie	6-45,5	4,4-9	>0,95	Tractus digestif ruminants et homme	Anses, 2019c
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Entérobactérie Bacille Gram – Aéro-anaérobie	-2-42	4-10	0,945	Viande de porc et de bovins	Anses, 2019b
P A T H O G E N E	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacille Gram + Ubiquitaire et tellurique Anaérobie facultative et microaérophile	-2-45	4-9,6	>0,92	Viandes cuites et produits à base de viande	Anses, 2021b
	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	Bacille Gram – Microaérophile	30-45	4,9-9	0,98	Viande de porc, de bœuf et de volailles	Anses, 2021a
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coque Gram + Toxinogène Aéro-anaérobie facultative	6-48	4-10	0,83 pour la bactérie 0,86 pour la production de toxine	Peau et muqueuses Environnement Sphère respiratoire des animaux à sang chaud	Anses, 2022

Légende : a_w = activité de l'eau

Concernant les limites légales de sécurité, le règlement (CE) n° 2073/2005 impose l'absence de *Salmonella* dans un échantillon de 25 g de viande hachée et de préparation de viande destinées à être cuites ou mangées crues. En termes d'hygiène, ce même règlement impose des limites comprises entre 500.000 et 5.000.000 UFC/g de colonies aérobies mésophiles dans la viande hachée en fin de fabrication et, pour *Escherichia coli*, des limites comprises entre 50 et 500 UFC/g dans la viande hachée en fin de fabrication et des limites comprises entre 500 et 5.000 UFC/g dans les préparations de viande en fin de fabrication.

1.4. Conservation : principes de congélation, surgélation et décongélation

La congélation des viandes fraîches est la méthode la plus commune de conservation pratiquée par les consommateurs (Lianou et Koutsoumanis, 2009). Il est dès lors nécessaire de différencier congélation et surgélation. Pour ces deux méthodes de conservation, la température est abaissée et maintenue basse, en dessous du point de congélation du produit. La distinction se fait sur base de la température de conservation. En effet, entre -12 °C et -18°C, il est nécessaire de parler de congélation, celle-ci empêchant le développement de toute bactérie. En dessous de -18 °C, on parle alors de surgélation, ce qui induit un arrêt du développement de tout micro-organisme (Clinquart, 2005).

La congélation est une méthode intéressante pour diminuer légèrement la contamination bactérienne des denrées alimentaires et assurer une bonne conservation sur le long terme. Il semble cependant que l'effet de la congélation sera différent en fonction de la nature de la denrée alimentaire et de la bactérie incriminée. En effet, il est remarqué qu'une congélation de 9 jours à -20°C permet une diminution de l'ordre de 1 log de *Campylobacter* (Georgsson et al., 2006) dans la viande de volaille. Néanmoins, l'impact de ce procédé ne donne pas les mêmes résultats en ce qui concerne *Listeria monocytogenes* dans la viande de bœuf, pour laquelle la congélation ne permet pas de diminuer la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon (Lianou et Koutsoumanis, 2009). En ce qui concerne *E. coli* et *Salmonella*, les résultats sont variables en fonction des études. Il est possible de noter une diminution de 0,7 log de ces bactéries dans des burgers de bœuf (Manios et Skandamis, 2015), une invariabilité de la quantité de ces bactéries pour la viande de bœuf (Dykes 2006), voire une augmentation de ces bactéries sur du bœuf haché (Lianou et Koutsoumanis, 2009) après une période de congélation.

La décongélation d'un aliment peut être réalisée en suivant différentes méthodes. Les méthodes préconisées sont la décongélation lente au réfrigérateur ou la décongélation rapide au micro-onde (Lianou et Koutsoumanis, 2009). La décongélation à température ambiante est déconseillée d'un point de vue sanitaire. Il est conseillé par l'AFSCA de n'exposer les denrées périssables à des températures comprises entre 5°C et 65°C que durant un maximum de deux heures. Des études comparent l'impact de ces différentes méthodes de décongélation sur des viandes différentes et pour des bactéries différentes. En 2009, Lianou et collaborateurs ont comparé différentes méthodes de décongélation sur du bœuf haché inoculé par une solution contenant *Listeria monocytogenes* et *Salmonella Enteritidis*. Cette étude n'a pas montré de différence significative entre les différentes méthodes de décongélation testées. Cependant, Stavros et collaborateurs (2015) ont démontré une augmentation de la population de *Salmonella spp* et d'*Escherichia coli O157:H7* dans la viande de bœuf haché lors d'une décongélation à 20 °C pendant 12 h, en comparaison aux méthodes de décongélation prescrites. Toujours en 2015, Roccato et collaborateurs, ont montré une augmentation significative du nombre de *Salmonella Typhimurium* détectées dans des kebabs de volaille décongelés pendant une nuit à 23 °C comparativement à une décongélation pendant une nuit à 8 °C.

1.5. Méthodes d'analyses microbiologiques : dénombrement par culture

Le dénombrement de colonies bactériennes en surface et en profondeur donne une indication sur le niveau de contamination de l'aliment et plus précisément permet de dénombrer les micro-organismes cultivables.

En fonction de leurs caractéristiques de croissance, les bactéries poussent sur des milieux plus ou moins sélectifs. Certains milieux sont non sélectifs et permettent la croissance d'une large gamme de bactéries, comme c'est le cas pour le Plate Count Agar (PCA) qui permet notamment la croissance des bactéries mésophiles aérobies. D'autres milieux sont par contre sélectifs et permettent uniquement la croissance de certaines bactéries, comme par exemple le « Violet Red Bile Glucose » (VRBG) qui permet la croissance des entérobactéries. Associés au milieu choisi, les paramètres d'incubation permettront également la croissance de certaines bactéries préférentiellement à d'autres.

1.6. Méthodes d'analyses génétiques : métagénomique ciblée

En complément aux analyses microbiologiques, il est intéressant de réaliser une analyse de métagénomique ciblée. La métagénomique consiste à séquencer l'ADN présent dans un échantillon pour déterminer avec précision l'ensemble des micro-organismes présents dans celui-ci. Pour réaliser cette analyse, il sera nécessaire d'amplifier les fragments ADN extraits de l'échantillon et les séquencer (Figure 1). Cette méthode a pour avantage de permettre la détection d'espèces minoritaires, mais également la mise en évidence de bactéries non cultivables. La limite de cette méthode est qu'elle ne permet pas de déterminer si la bactérie identifiée est vivante, quiescente ou morte (Martin et al., 2018).

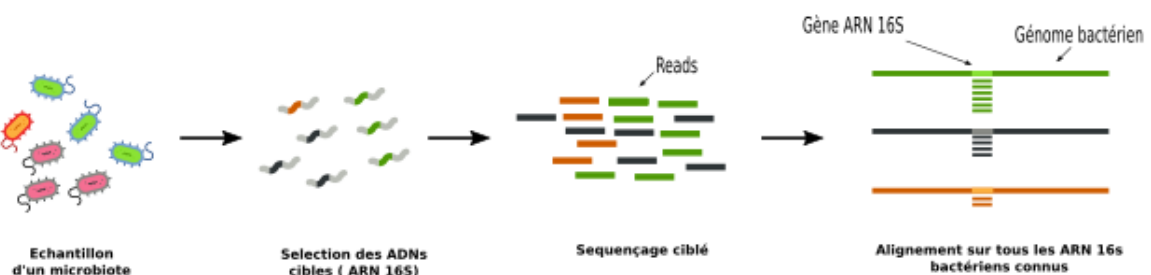


Figure 1 : Schéma du principe de métagénomique ciblée.

Source : <https://dridk.me/metagenomique.html>

2. Objectifs

Cette étude a pour but d'évaluer dans quelles mesures les différentes méthodes de décongélation peuvent impacter la croissance ultérieure de la microflore endogène de la viande hachée de porc et bœuf.

3. Matériel et méthode

3.1. Design expérimental

Les deux protocoles d'essai suivants ont été mis en place sur un mélange de viande hachée de porc et bœuf. Ces deux protocoles ont été pensés afin de déterminer si la congélation et le mode de décongélation permettent de diminuer la contamination de viande hachée ou de préparation de viande hachée, mais également d'observer une potentielle différence dans la nature et les proportions des bactéries présentes.

3.1.1. Protocole 1

La viande hachée a été achetée au Delhaize d'Ans le 8 novembre 202 dans le comptoir boucherie. Le lendemain (J_0 du protocole 1) la viande a été répartie dans 12 barquettes de 200 g (± 1 g) à une température ambiante de 10,4 °C au sein de l'Unité Pilote expérimentale de transformation des denrées alimentaires. L'ensemble des barquettes a été mis sous atmosphère protectrice composée de 70 % d'O₂ et 30 % de CO₂ (machine Tecnovac – Italie). La composition du mélange a été préalablement vérifiée à l'aide d'un analyseur de gaz (machine PBI Dansensor Checkmate 3 – Allemagne). Les barquettes ont ensuite été étiquetées et placées aux températures adéquates (figure 2 et annexe 1).

Les échantillons ont été analysés sans congélation, respectivement le jour de mise en conditionnement (J_0) et après une conservation de 5 jours à 7 °C (J_5).

Les échantillons A et C ont été congelés pendant 7 jours à -20 °C, mais ont subi des méthodes de décongélation différentes. Les échantillons A ont été décongelés à 7 °C pendant 18 h afin de mimer une décongélation au réfrigérateur (méthode 1). Les échantillons C ont été décongelés à 20 °C pendant 8h afin de mimer une décongélation à température ambiante durant une journée de travail (méthode 2). Une fois le processus de décongélation terminé, ces 4 échantillons ont été conservés 5 jours à 7 °C.

Les échantillons D et F ont été congelés pendant 28 jours à -20 °C et ont ensuite subi, les mêmes traitements de décongélation et conservation avant analyses que les échantillons A et C respectivement.

Lors du protocole 1, toutes les analyses microbiologiques ont été réalisées sur 2 barquettes indépendantes pour chaque condition et seule la moyenne des deux résultats sera utilisée pour présenter les résultats.

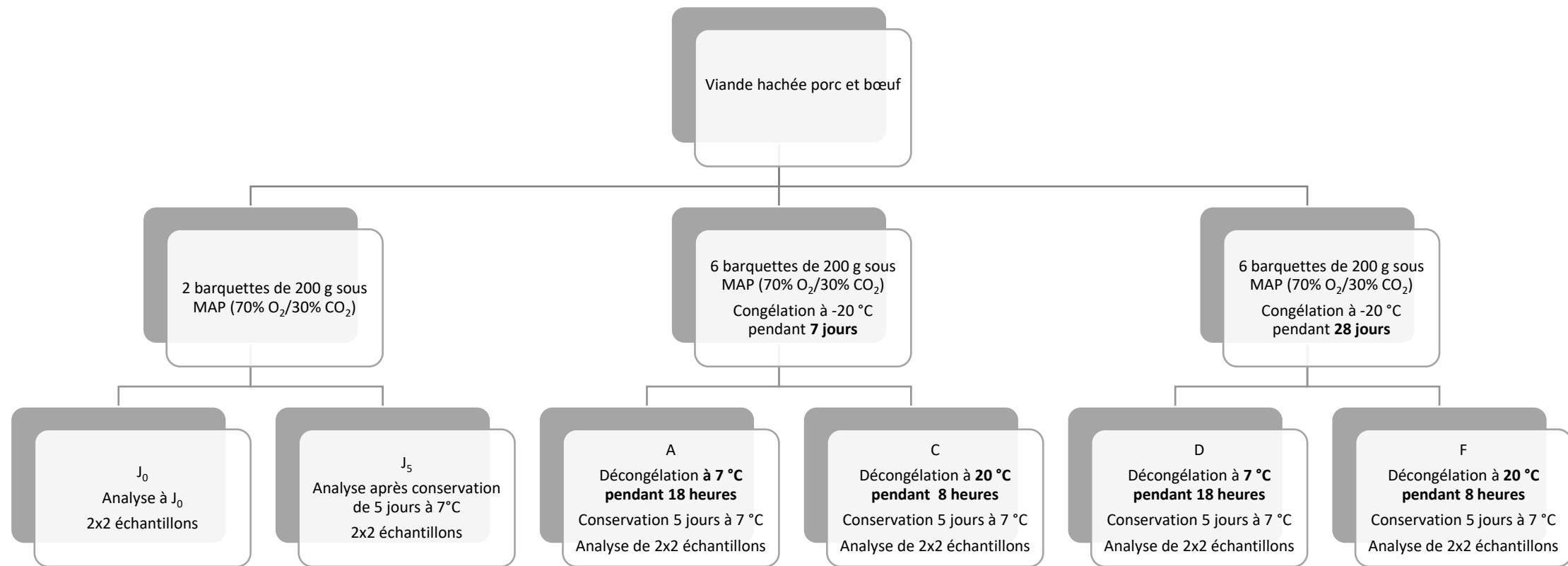


Figure 2 : Modalités du protocole 1.

Légende : MAP = atmosphère modifiée

3.1.2. Protocole 2

Lors de ce deuxième protocole deux préparations de viande d'origine différentes ont été analysées. Le premier échantillon de viande a été acheté au Carrefour de Bonnelles et le deuxième au Colruyt de Bonnelles (8 mars 2023).

Le premier est une préparation de viande composée de 77 % de porc et 13 % de bœuf, conservée sous atmosphère protectrice (composition inconnue) et la DLC prévue pour ce lot est le 13 mars 2023 (Figure 3). Le deuxième est composé de 52 % de bœuf et 42 % de porc, conservé dans un emballage alimentaire composé d'une barquette en frigolite et d'un film plastique entourant le tout. La DLC prévue pour ce lot est le 11 mars 2023 (Figure 3). Cette deuxième viande a été achetée le jour de mise en rayon.

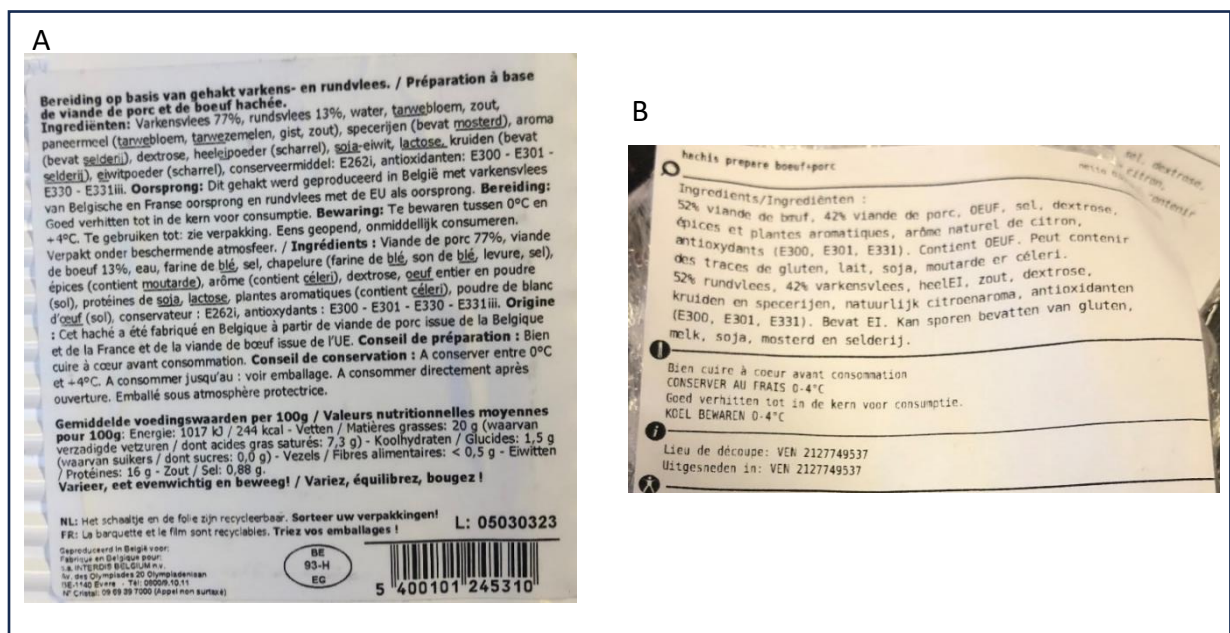


Figure 3 : Etiquette des différentes viandes.

Légende : A = viande provenant du Carrefour et B = viande provenant du Colruyt

Le jour de l'achat (J_0 du protocole 2) 10 barquettes de 200 g (± 1 g) de viande en provenance du Colruyt et 10 barquettes de 200 g (± 1 g) de viande en provenance du Carrefour ont été préparées dans l'Unité Pilote expérimentale de transformation des denrées alimentaires à une température ambiante de 10,6 °C. Toutes les barquettes ont été mises sous atmosphère protectrice (70 % CO₂ et 30 % O₂) (machine Tecnovac – Italie) préalablement vérifiée par un analyseur de gaz (machine PBI Dansensor Checkmate 3 – Allemagne). Les barquettes ont été identifiées et placées aux températures de conservation prévues (figure 4 et annexe 2).

Les échantillons J₀ et J₅ ont été analysés sans congélation, respectivement au jour de mise en conditionnement et après une conservation de 5 jours à une température de 7 °C.

Les échantillons Aa, Ab, Ba et Bb ont été congelés à -20 °C pendant 7 jours et ont subi des méthodes de décongélation différentes. Les échantillons A ont subi une décongélation de 8 h à 20°C et les échantillons B ont subi une décongélation de 18 h à 7°C. Une première partie de ces 4 échantillons a été analysée immédiatement après décongélation (a) et l'autre partie a été analysée après une conservation de 7 jours à 5 °C (b).

Les échantillons Ca, Cb, Da et Db ont été congelés à -20 °C pendant 28 jours et ont respectivement subi une décongélation de 8 h à 20°C et de 18 h à 7°C. Similairement aux échantillons A et B, une première partie des échantillons C et D a été analysée immédiatement après décongélation (a) et la seconde partie après une conservation de 7 jours à 5 °C (b).

Comme les résultats étaient très répétables lors des essais du protocole 1, les essais du protocole 2 ont été réalisés en simple sur une barquette.

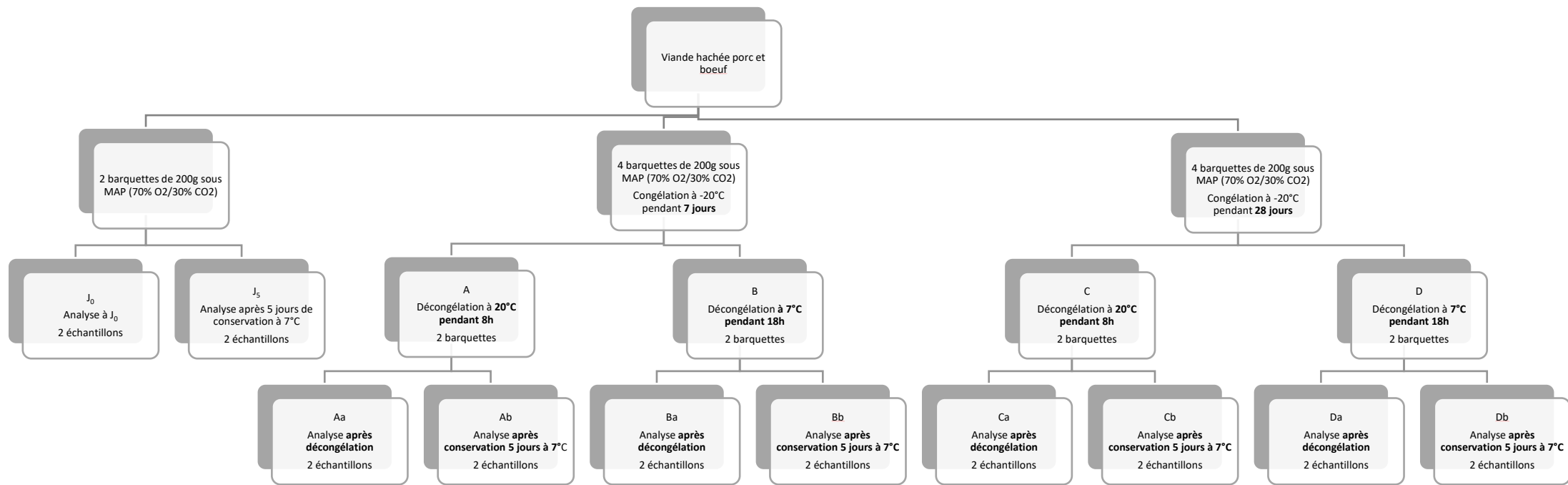


Figure 4 : Modalités du protocole 2.

Légende : MAP = atmosphère modifiée

3.2. Analyses microbiologiques

Préalablement aux ensemencements, il est nécessaire de réaliser une suspension à partir de la viande hachée. Pour se faire, une dilution de 1/10 a été réalisée (machine Diluflow Interscience – France). En pratique, 25 g (\pm 0,5 g) de viande hachée ont été déposés stérilement dans un sac Stomacher stérile et 225 g (\pm 5 g) d'eau physiologique ont été ajoutés pour réaliser la dilution. La solution a ensuite été homogénéisée (machine Stomacher Interscience – France) pendant 120 secondes. Une fois la suspension-mère obtenue, 15 mL de celle-ci ont été transvasés dans un Eppendorf afin de réaliser les différentes analyses.

En fonction de la contamination de la viande, il est parfois nécessaire de réaliser des dilutions de cette suspension mère pour permettre le dénombrement sur boîte. Des dilutions 1/10 seront réalisées successivement (Figure 5).

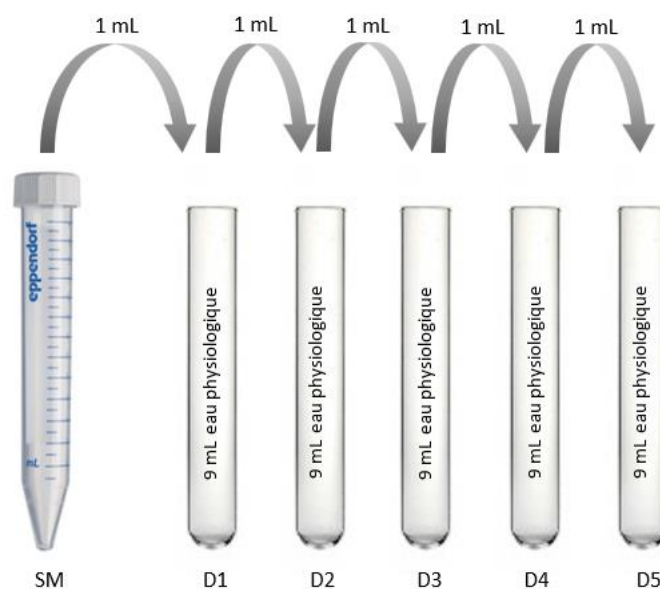


Figure 5 : Schéma expliquant le principe de dilution 1/10 utilisé.

Légende : SM = suspension mère, D = dilution

3.2.1. Ensemencements

Afin d'avoir une idée de la contamination globale de la viande hachée, 5 milieux différents ont été ensemencés dans le cadre de cette expérience (Tableau II).

Tableau II : Résumé des différents milieux utilisés et de leurs conditions d'utilisation

Milieu	Flore dénombrée	Conditions de croissance protocole 1	Conditions de croissance protocole 2
PCA – Plate Count Agar Bio-Rad	Flore aérobie psychrotrophe	22 °C pendant 72 h basé sur la norme ISO 4833	
VRBG – Violet Red Bite Glucose Bio-Rad	Entérobactéries	30 °C pendant 24 h selon la norme ISO 21528:2004	
TBX – Tryptone Bite Glucuronate Bio-Rad	<i>Escherichia coli</i>	37 °C pendant 24 h basé sur la norme ISO 16649	44 °C pendant 24 h selon la norme ISO 16649
CFC – Céphalotine/Fumicide/Cetrimide Thermo Scientific	<i>Pseudomonas</i> spp	22 °C pendant 72 h basé sur la norme ISO 13720	
MRS – Man, Rogosa, Sharpe Bio-Rad	Bactéries lactiques	22 °C pendant 72 h basé sur la norme ISO 15214	

Utiliser le milieu PCA permet de faire pousser la flore aérobie psychrotrophe, c'est-à-dire la flore qui est capable de croître en aérobie à 22 °C. Le dénombrement de cette flore donne une estimation de la flore totale de l'échantillon, mais ne permet pas une identification des bactéries dénombrées.

Les entérobactéries sont un ensemble de bactéries que l'on retrouve dans le tube digestif des animaux ou de l'homme et dans l'environnement en général. Certaines de ces bactéries peuvent être responsables de pathologies plus ou moins graves chez l'homme une fois ingérées. La gélose VRBG permet de faire pousser de manière sélective ces bactéries. En ce qui concerne *Escherichia coli*, qui est un indicateur de contamination fécale, le milieu TBX permet de la faire pousser de manière sélective après incubation à 44°C.

Les *Pseudomonas* sont les bactéries majoritairement responsables de l'altération de la viande conditionnée sous air atmosphérique. En les dénombrant sur le milieu sélectif CFC, il est possible d'avoir une idée générale du risque d'altération de la viande.

En ce qui concerne les bactéries lactiques, elles sont utiles dans la conservation de la viande, car elles permettent d'en diminuer le pH et ainsi inhiber le développement d'autres bactéries altérantes ou pathogènes.

Les ensemencements et dilutions réalisés lors des deux protocoles sont repris en annexe 3.

3.2.2. Dénombrements

Toutes les boîtes ont été dénombrées après 24 h ou 72 h d'incubation. Le dénombrement a été réalisé selon les recommandations des différentes normes.

Pour l'analyse des résultats, dans cette étude, lorsque le dénombrement des boîtes était supérieur à 300 colonies, il a été arbitrairement décidé de prendre comme seuil 2 fois la valeur réelle de contamination et lorsque qu'aucune colonie ne s'est développée, il a été arbitrairement décidé de prendre comme seuil la moitié de la limite de dénombrement.

3.3. Analyses génétiques

L'étape inhérente aux analyses génétiques est l'extraction d'ADN. Cette première étape, permettant d'extraire l'ADN total de l'échantillon, a été réalisée avec le kit DNeasy Blood and Tissue en suivant les instructions du fabricant (QIAGEN Benelux BV, Anvers, Belgique).

Une extraction d'ADN comporte 3 étapes successives :

- Une lyse chimique et mécanique
Celle-ci se réalise à l'aide d'enzyme, par exemple la protéinase k, de chaleur et de billes.
- La liaison de l'ADN
L'ADN se liera à la colonne, et plus précisément au filtre de silice, après avoir subi de multiples lavages et centrifugations.
- L'élution
L'élution consiste en une centrifugation finale après ajout d'un buffer qui retiendra l'ADN.

À la suite de son extraction, la concentration d'ADN a été évaluée grâce un spectrophotomètre ND-1000 (NanoDrop ND-1000, Isogen, De Meern, Pays-Bas).

Ensuite, une PCR ciblant un fragment du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a été effectuée pour identifier les différentes bactéries présentes dans l'échantillon. Pour réaliser cette PCR deux amorces différentes ont été utilisées, l'une directe (5'-GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') et l'autre indirecte (5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), qui permettent de cibler des régions hypervariables V1-V3 de l'ADNr 16S. A la fin de ce processus, des amplicons sont obtenus, ceux-ci sont purifiés, quantifiés et soumis à un deuxième tour de PCR. Après cette seconde PCR, une qPCR est réalisée pour permettre la quantification de tous les échantillons et un regroupement des amplicons pour former une librairie. La librairie a ensuite été séquencée à l'aide d'un séquenceur MiSeq Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA) en utilisant les réactifs V3.

Pour des raisons économiques, tous les échantillons obtenus n'ont pas été analysés en métagénomique. Les échantillons analysés sont les échantillons J₀ et J₅ non congelés et les échantillons J₅ après congélation.

4. Résultats

Pour les 2 protocoles, la croissance des bactéries cultivables a été testée pour tous les échantillons sur PCA, VRBG, TBX, CFC et MRS. Les résultats sont repris dans les graphiques ci-dessous. Les résultats généraux sont repris dans l'annexe 4, 5 et 6.

Avant de discuter de l'impact des différentes méthodes de décongélation, il est important de comparer les échantillons à J₀ et après 5 jours à 7°C (J₅).

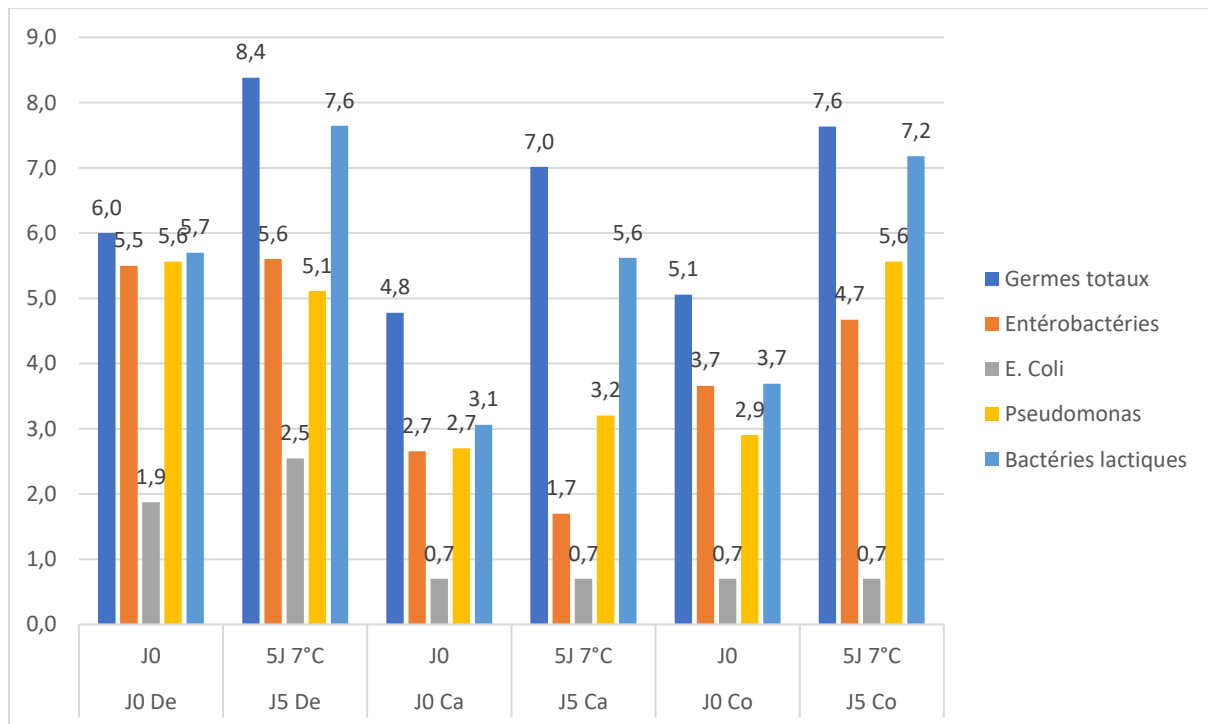


Figure 6 : Dénombrements microbiens des différents échantillons à J0 et après une conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) sans congélation préalable - Delhaize, Carrefour et Colruyt (log UFC/g).

Légende : De = Delhaize, Ca = Carrefour, Co = Colruyt, 5J 7°C = conservation de 5 jours à 7°C

A J0, la viande provenant du Delhaize est celle avec le taux de contamination le plus élevé, suivi de celle venant du Colruyt et finalement celle du Carrefour. La viande provenant du Delhaize présente un taux anormalement élevé d'entérobactéries, de *Pseudomonas* et de bactéries lactiques. On note également la présence d'*E. coli*. La viande provenant du Carrefour est moins contaminée que celle du Delhaize et aucune *E. coli* n'a été mise en évidence. La viande du Colruyt est similaire à celle du Carrefour, mais est légèrement plus contaminée et aucune *E. coli* n'a été mise en évidence. A J5, pour toutes les viandes, on remarque une augmentation importante des germes totaux et des bactéries lactiques. En plus de ces augmentations, pour la viande du Delhaize, on voit une très légère augmentation d'*E. coli* et, pour la viande du Colruyt, une augmentation des entérobactéries et de *Pseudomonas* (Figure 6).

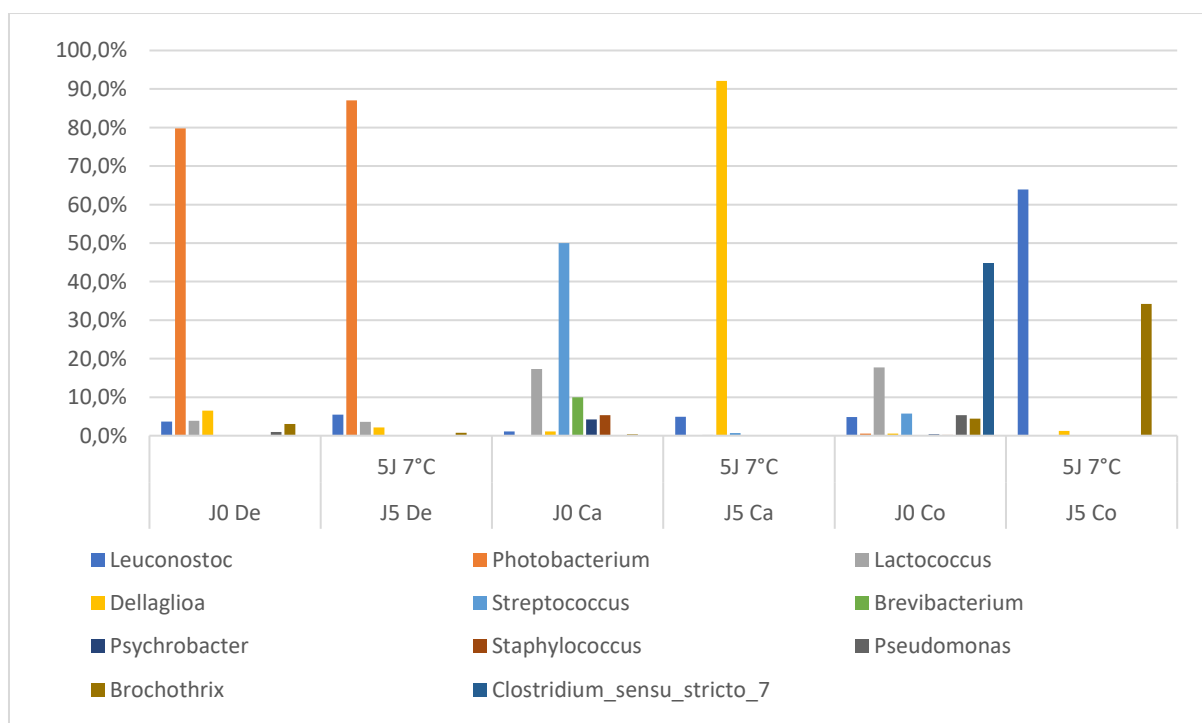


Figure 7 : Comparaison des proportions des différents genres bactériens majoritaires à J0 et après conservation de 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) sans congélation préalable - Delhaize, Carrefour et Colruyt. Légende : De = Delhaize, Ca =Carrefour, Co = Colruyt, 5J 7°C = conservation de 5 jours à 7°C

A J₀, la viande du Delhaize est essentiellement contaminée par *Photobacterium* et le reste à J₅. Pour la viande du Carrefour et du Colruyt, la dynamique est toute autre, on voit que les genres bactériens sont modifiés après le changement de conditionnement et conservation durant 5 jours à 7°C. A J₀, la viande du Carrefour est étonnement essentiellement contaminée par *Streptococcus* et *Lactococcus* avec également un peu de *Brevibacterium*. A J₅, on ne retrouve presque plus que *Dellaglioia*. A J₀, la viande du Colruyt est aussi surprenante en termes de contamination bactérienne, étant contaminée par *Clostridium_sensu_stricto_7*, ainsi que *Lactococcus*. A J₅, on ne retrouve plus du tout de *Clostridium*. On observe, par contre, une augmentation de *Leuconostoc* et de *Brochothrix*. Les contaminations initiales des échantillons des deux dernières préparations de viande ont peut-être pour origine les autres ingrédients que la viande alors que les flores habituelles de ces dernières deviennent dominantes à J₅ (Figure 7).

4.1. Protocole 1

Pour ce protocole, l'ensemble des comparaisons se trouvant dans l'analyse des résultats se fait avec les échantillons J₅.

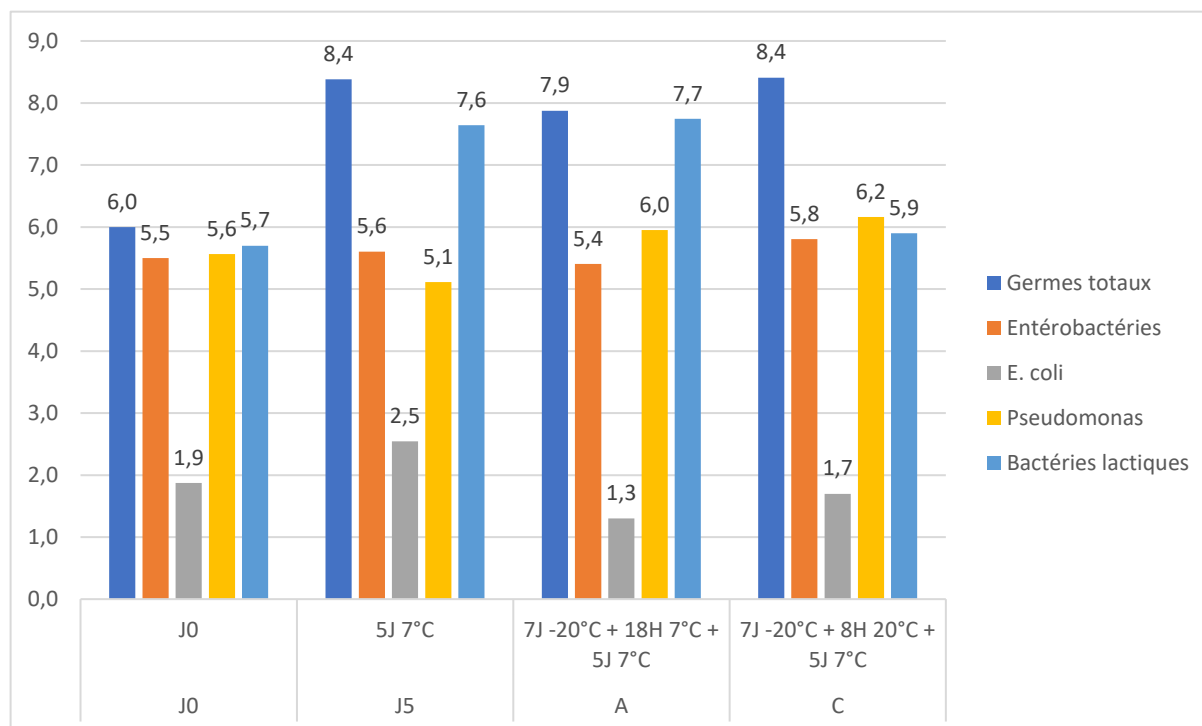


Figure 8 : Dénombrements microbiens à J0, J5 sans congélation et après 7 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O₂ et 30% CO₂) - Delhaize (log UFC/g).

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

Selon la figure 8, on remarque, pour les échantillons A qui ont été décongelés à 7° C, une diminution des germes totaux et *E. coli*, et une augmentation des *Pseudomonas* et des bactéries lactiques. En ce qui concerne les échantillons C, qui ont été décongelés à 20° C, la flore totale et les entérobactéries restent stables, on constate une diminution des bactéries lactiques et d' *E. coli*, et une augmentation des *Pseudomonas*.

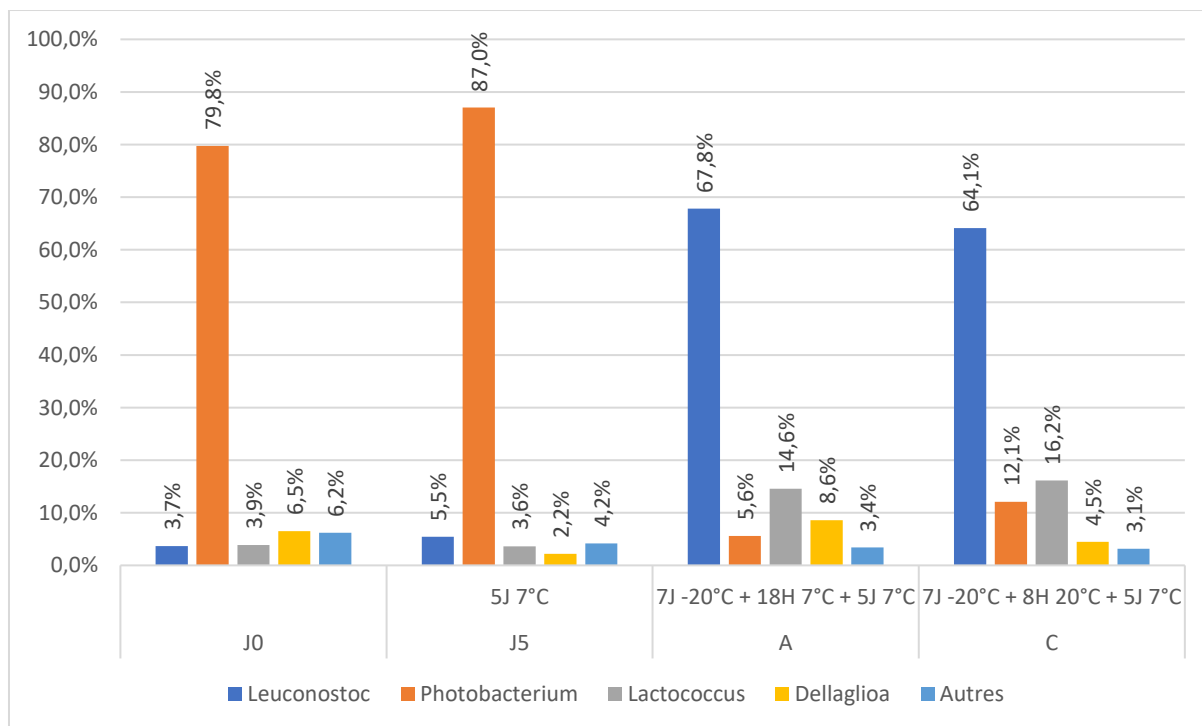


Figure 9 : Proportions des différents genres bactériens majoritaires à J0, J5 sans congélation et après 7 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) - Delhaize.

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

On remarque la même dynamique pour les deux protocoles de décongélation, à savoir : une augmentation de *Leuconostoc* et de *Lactococcus*, mais une diminution de *Photobacterium*. Les bactéries du genre *Dellaglioia* restent stables, même si une légère augmentation est visible (Figure 9).

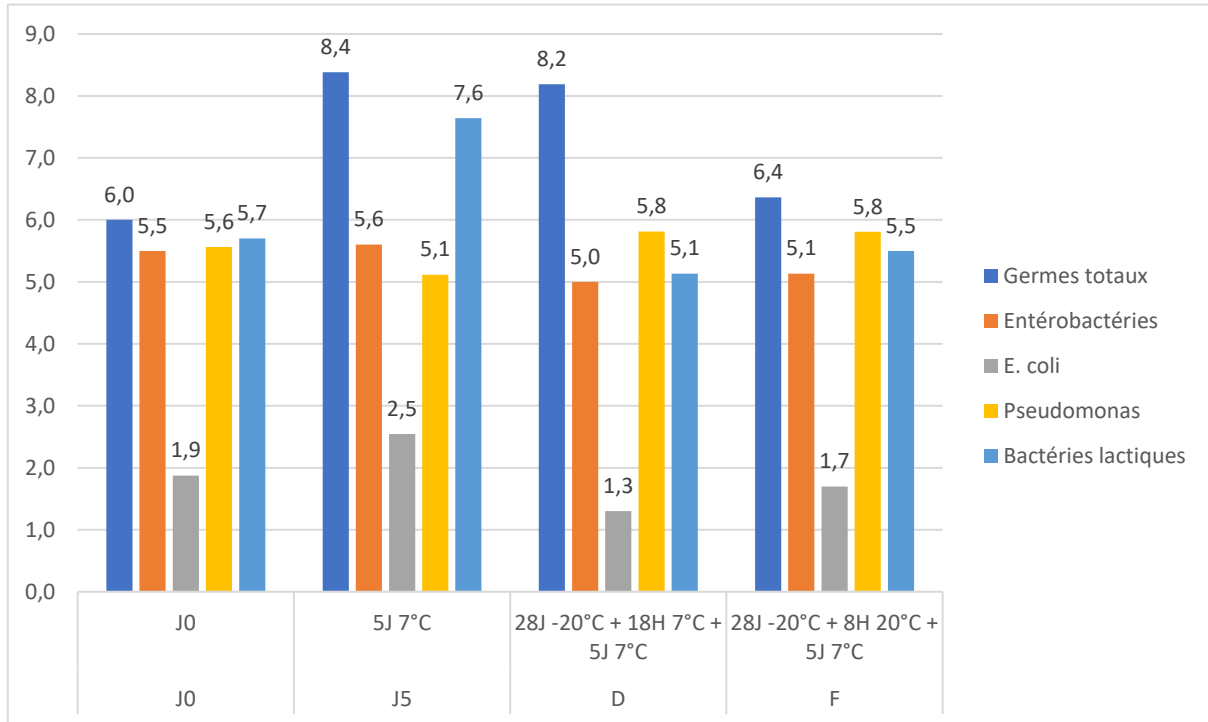


Figure 10 : Dénombrements microbiens à J0, J5 sans congélation et après 28 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O₂ et 30% CO₂) – Delhaize (log UFC/g).

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

Selon la figure 10, on constate une diminution de la flore totale, pour les échantillons F. Cette dernière valeur, concernant la flore totale de l'échantillon F, doit être considérée comme aberrante. On peut également observer une diminution importante de bactéries lactiques, plus réduite pour les *E. coli* et les entérobactéries après décongélation. On remarque également une augmentation des *Pseudomonas*.

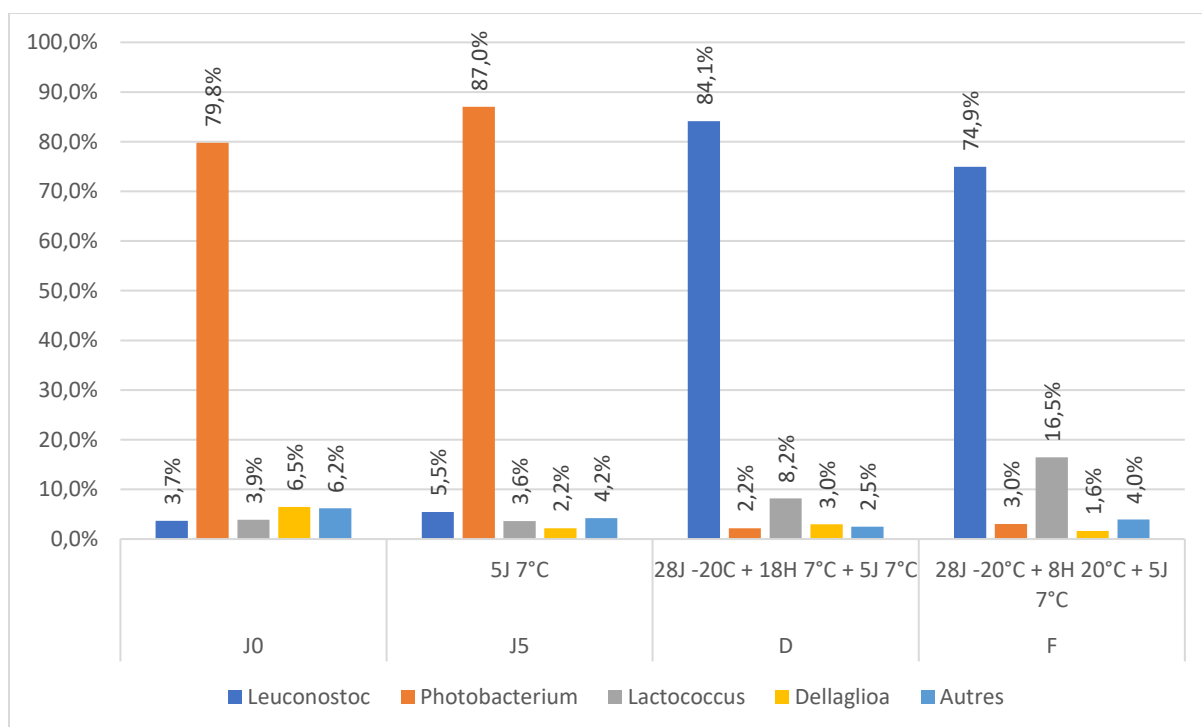


Figure 11 : Proportions des différents genres bactériens majoritaires à J0, J5 sans congélation et après 28 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) - Delhaize.

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

On remarque une tendance similaire à la congélation pendant 7 jours sans impact des différentes méthodes de décongélation pour la majorité des genres bactériens. On constate une augmentation de *Leuconostoc*, de *Lactococcus*, mais une diminution de *Photobacterium*. Le pourcentage de *Dellaglioia* dans les échantillons restent stables après décongélation par rapport à avant la congélation (Figure 11).

4.2. Protocole 2

4.2.1. Analyses immédiates

Pour cette partie de protocole 2, les comparaisons faites pour l'analyses des résultats le sont avec J₀.

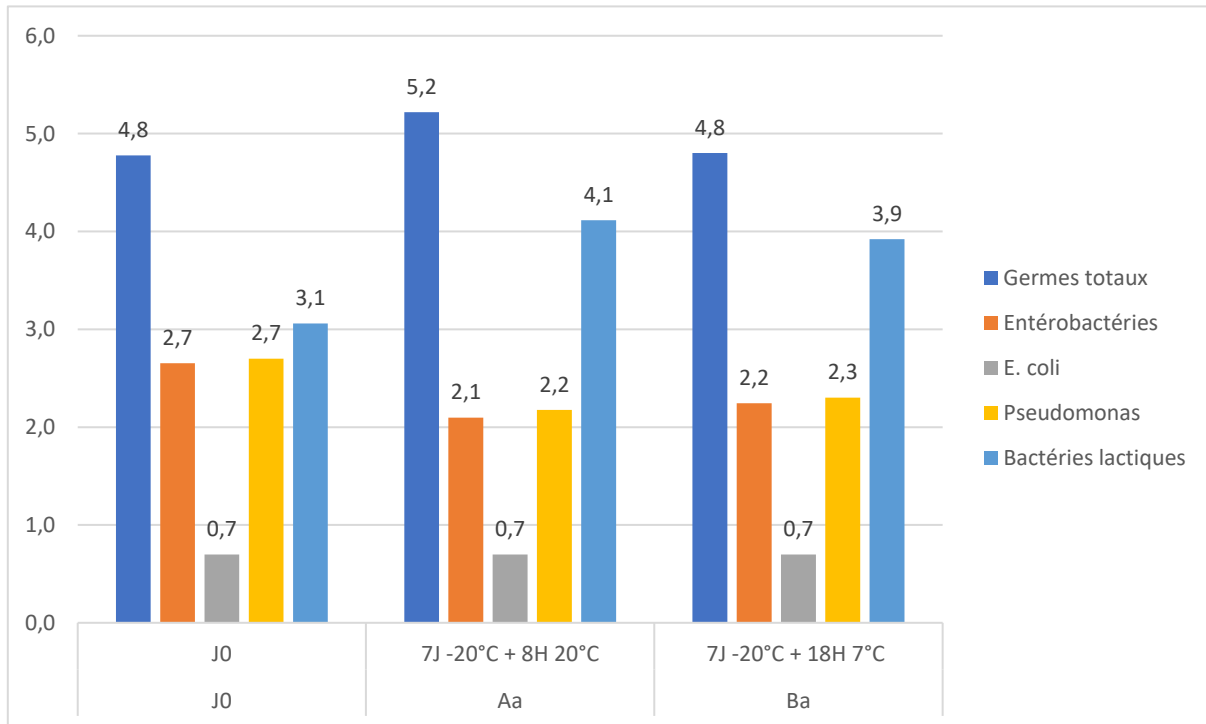


Figure 12 : Dénombrements microbiens à J0 sans congélation et directement après 7 jours de congélation sous MAP (70% O2 et 30% CO2) – Carrefour (log UFC/g).

Légende : 7J -20°C + 18H 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C

En ce qui concerne les échantillons ayant subi une décongélation à 20° C pendant 8 heures (Aa), une augmentation est remarquée pour les germes totaux et les bactéries lactiques en comparaison aux résultats obtenus avant congélation (J0). Il est également possible de constater une légère diminution des entérobactéries et des *Pseudomonas* après la congélation.

Les dénombrements d'*E. coli* étant toujours sous la limite de dénombrement (10 UFC/g) lors du protocole 2, aucune conclusion ne peut être tirée sur cette flore lors des essais du protocole 2.

Pour les échantillons ayant subi une décongélation à 7° C pendant 18 heures (Ba), une augmentation des bactéries lactiques et une légère diminution des entérobactéries et des *Pseudomonas* sont visibles. La population totale de bactéries reste quant à elle stable (Figure 12).

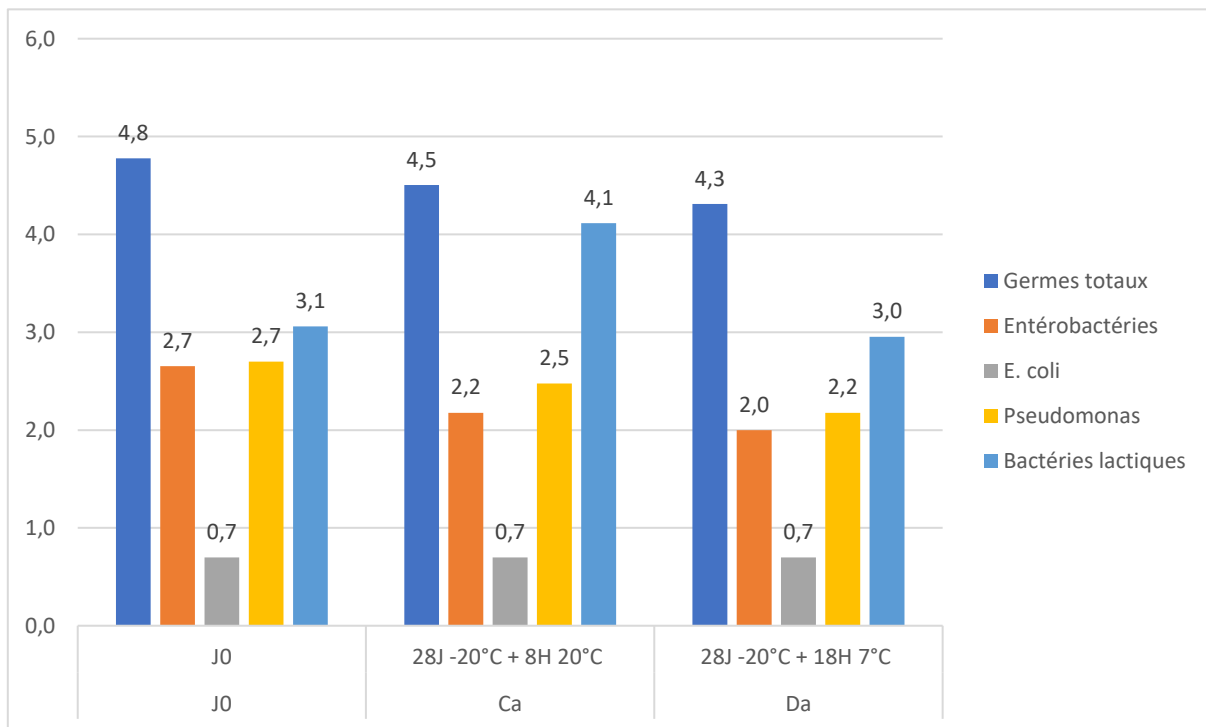


Figure 13 : Dénombrements microbiens à J0 sans congélation et directement après 28 jour de congélation sous MAP (70% O2 et 30% CO2) – Carrefour (log UFC/g).

Légende : 28J -20°C + 18H 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C

De manière générale, la congélation de 28 jours à -20° C permet une réduction de la flore totale des échantillons, et ce indépendamment de la méthode de décongélation.

Pour les échantillons ayant été décongelés à 20° C pendant 8 heures (Ca), on constate une augmentation d'un log des bactéries lactiques. Outre cette modification, les autres valeurs restent similaires à celles obtenues à J₀, ce compris pour les échantillons Da (Figure 13).

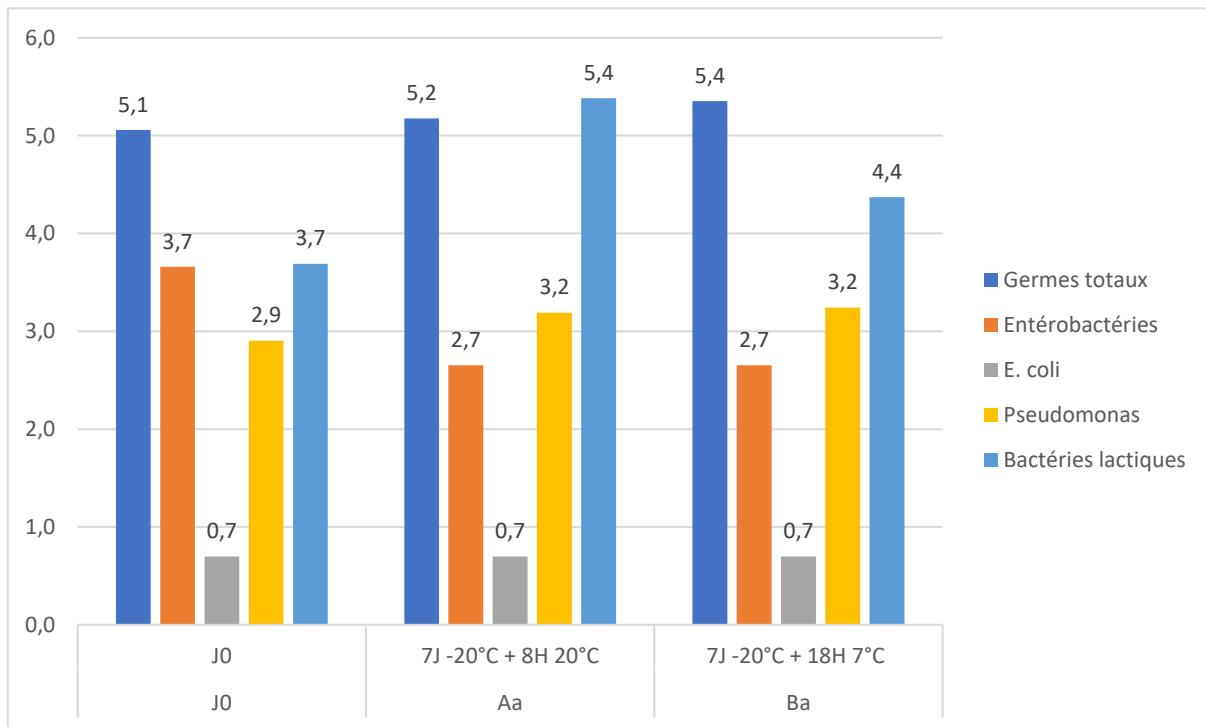


Figure 14 : Dénombrements microbiens à J0 sans congélation et directement après 7 jours de congélation sous MAP (70% O2 et 30% CO2) – Colruyt (log UFC/g).

Légende : 7J -20°C + 18H 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C

Pour les échantillons décongelés à 20° C pendant 8 heures (Aa), on constate une augmentation de deux log pour la population de bactéries lactiques, une légère augmentation de la population de *Pseudomonas* et une diminution d'un log des entérobactéries. La flore totale reste stable.

Pour les échantillons décongelés à 7° C pendant 18 heures (Ba), on constate une augmentation d'un log des bactéries lactiques, une légère augmentation de la flore totale et des *Pseudomonas*, et une diminution d'un log des entérobactéries (Figure 14).

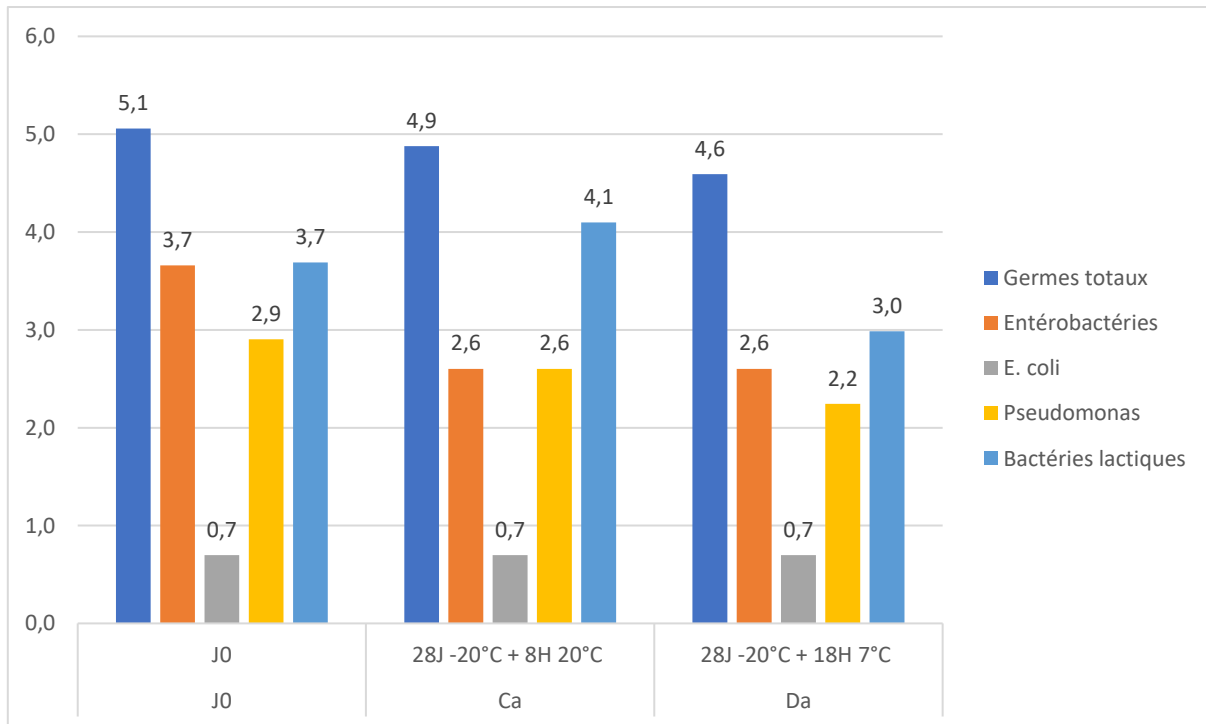


Figure 15 : Dénombrements microbiens à J0 sans congélation et directement après 28 jours de congélation sous MAP (70% O2 et 30% CO2) – Colruyt (log UFC/g).

Légende : 28J -20°C + 18H 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C

Selon la figure 15, il est remarqué, indépendamment de la méthode de décongélation, une diminution de la flore totale appuyée par la congélation de 28 jours. Cette diminution est cependant plus marquée pour les échantillons Da que pour Ca, puisqu'une diminution d'un log est visible. De même, une diminution d'un log concernant les entérobactéries est observée sans l'impact de la méthode de décongélation utilisée.

Concernant les échantillons ayant subi une décongélation à 20° C pendant 8 heures (Ca), on constate une légère augmentation pour les bactéries lactiques.

Il est également remarqué une diminution des bactéries lactiques pour les échantillons décongelés à 7° C pendant 18 heures (Da).

4.2.2. Analyses après conservation à 7°C pendant 5 jours

Les comparaisons dans l'analyse des résultats de cette partie du protocole 2 se font avec J₅.

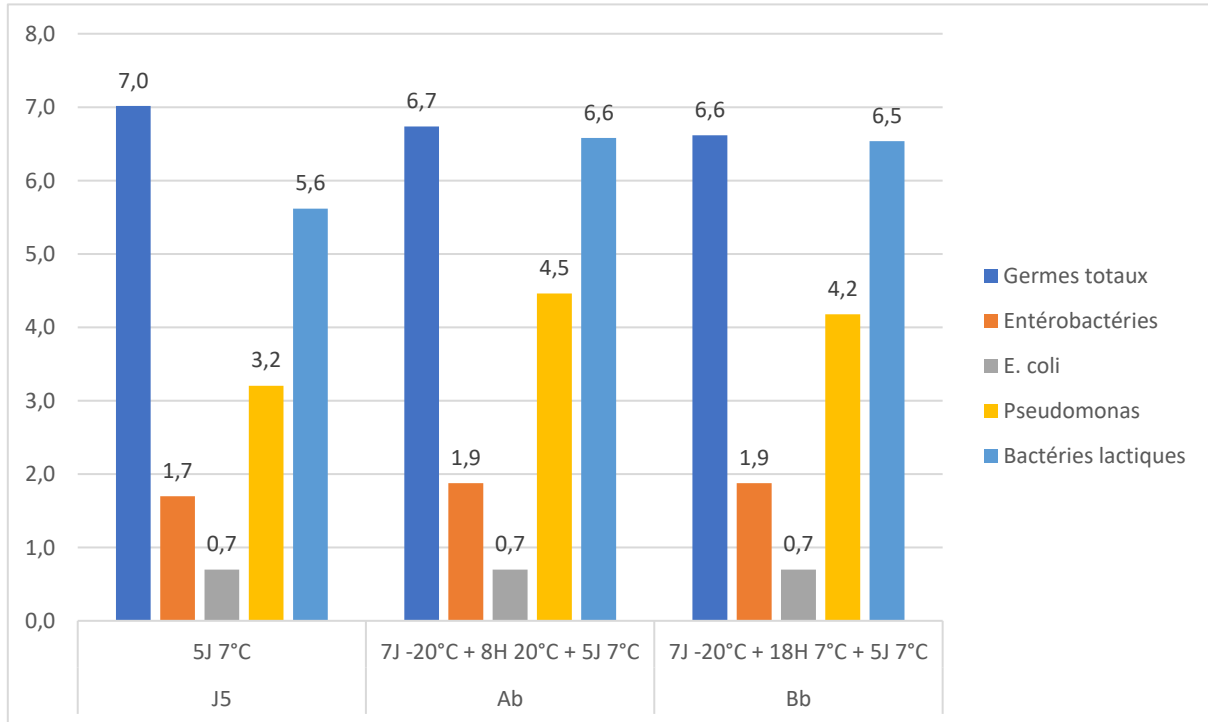


Figure 16 : Dénombrements microbiens à J₅ sans congélation et après 7 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O₂ et 30% CO₂) – Carrefour (log UFC/g).

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

En ce qui concerne la flore totale, on peut remarquer une légère diminution similaire quel que soit la méthode de décongélation. Les entérobactéries restent stables. On peut observer une augmentation d'un log pour les *Pseudomonas* et pour les bactéries lactiques.

Dans ce cas, il n'y a pas de différence marquante entre les différentes méthodes de décongélation (Figure 16).

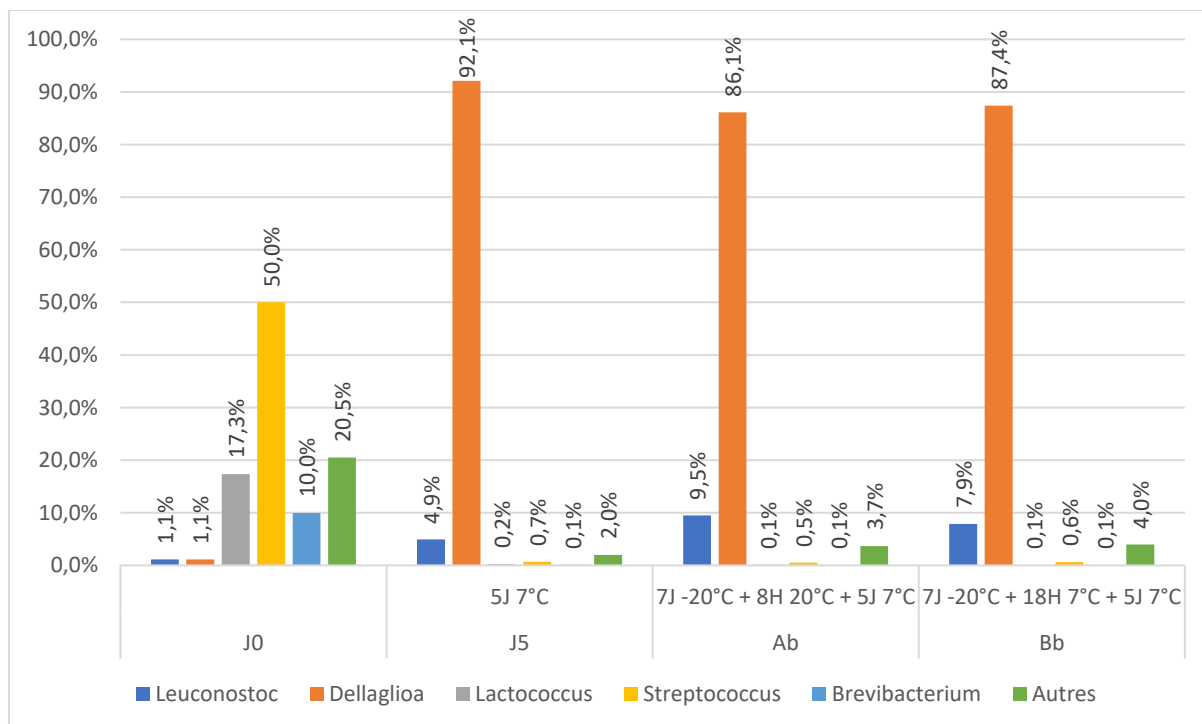


Figure 17 : Proportions des différents genres bactériens majoritaires à J0, J5 sans congélation et après 7 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) -Carrefour.

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 18H 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

Dans la figure 17, on remarque qu'une congélation de 7 jours à -20°C n'a pas impacté la diversité des genres bactériens présents dans les échantillons en comparaison aux genres bactériens présents à J5. De plus, aucune différence importante n'est à notifier en ce qui concerne l'impact des deux méthodes de décongélation sur la diversité bactérienne.

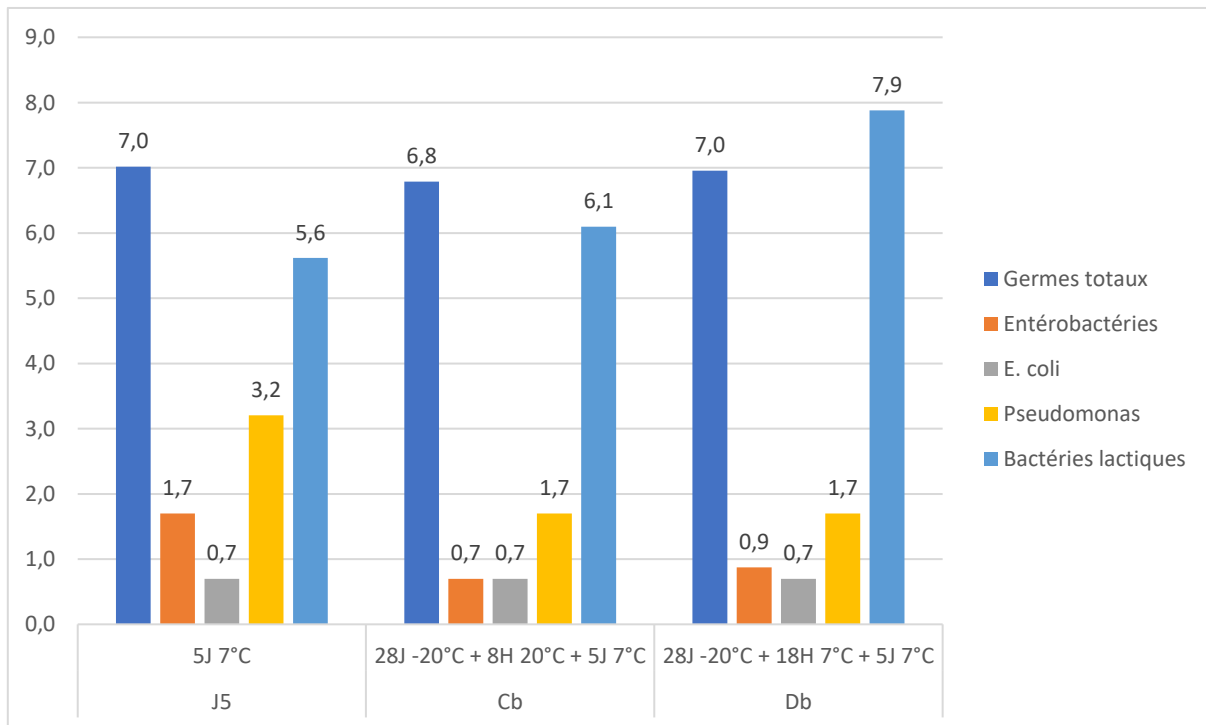


Figure 18 : Dénombrements microbiens à J5 sans congélation et après 28 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) – Carrefour (log UFC/g).

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

Pour les entérobactéries et *Pseudomonas*, on peut observer une diminution similaire pour les deux méthodes de décongélation. Aucune évolution n'est à constater pour *E. coli*.

La tendance est différente pour les bactéries lactiques, on constate une augmentation d'un log pour les échantillons décongelés à 20° C (Cb) et de deux log pour les échantillons décongelés à 7° C (Db).

Dans ce cas, on peut constater que la décongélation à 7° C suivie de la conservation à 7° C durant 5 jours supplémentaires permet un plus grand développement des bactéries lactiques dans les échantillons (Figure 18).

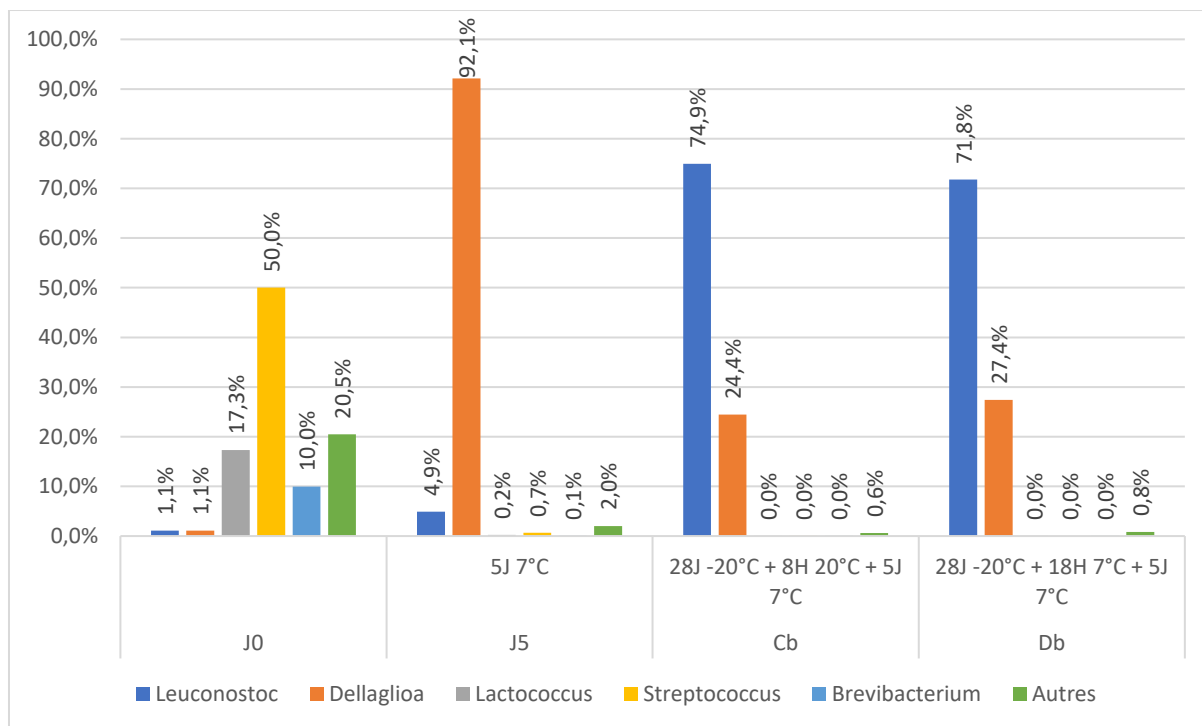


Figure 19 : Proportions des différents genres bactériens majoritaires à J0, J5 sans congélation et après 28 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) - Carrefour.

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

Dans la figure 19, on peut remarquer qu'avec une congélation longue de 28 jours, on aura une perte de diversité importante après décongélation. Nous observons une diminution de *Dellaglioia*, mais également une diminution voire la disparition des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Brevibacterium* et d'un ensemble d'autres genres bactériens regroupés dans la catégorie « autres ». A contrario, on remarque que le genre *Leuconostoc* est augmenté en quantité.

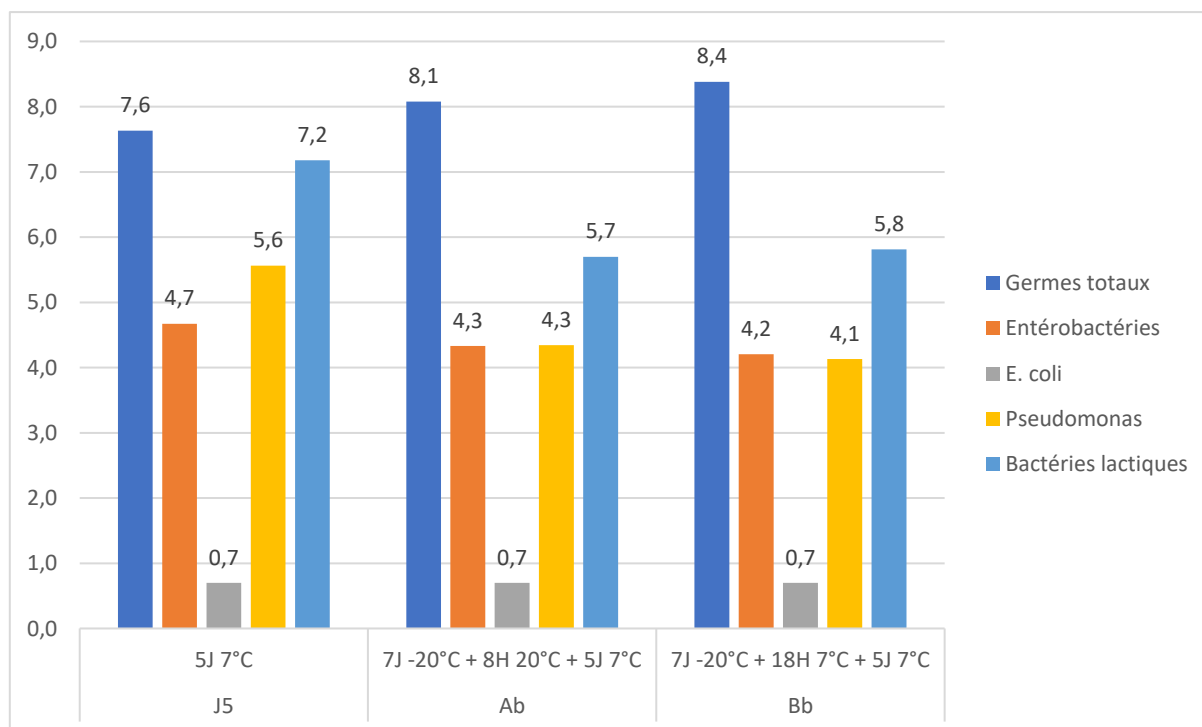


Figure 20 : Dénombrements microbiens à J5 sans congélation et après 7 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) – Colruyt (log UFC/g).

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

On remarque également que la température de décongélation n'impacte pas les genres bactériens retrouvés après une congélation de 28 jours.

Dans la globalité, on constate une augmentation d'un log pour la flore totale, une diminution d'un log pour *Pseudomonas* et les bactéries lactiques, et aucun changement notable pour les entérobactéries pour les deux méthodes de décongélation (Ab et Bb).

Les différentes méthodes de décongélation n'impactent pas les populations dans ce cas (Figure 20).

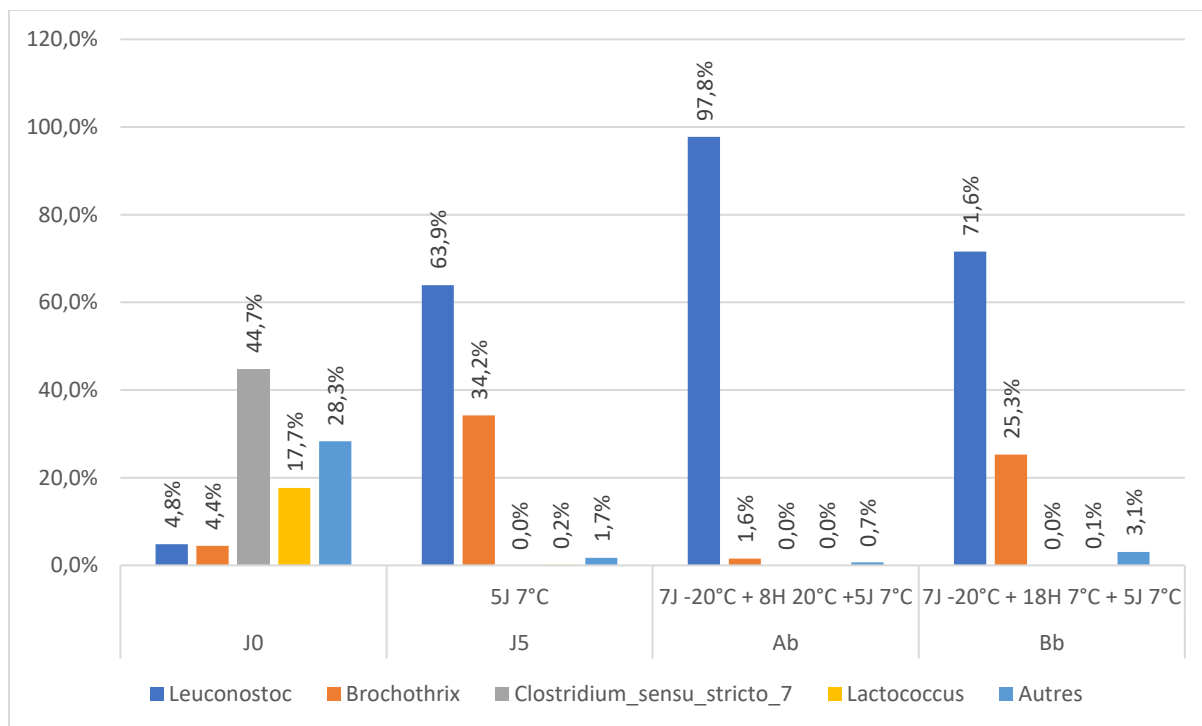


Figure 21 : Proportions des différents genres bactériens majoritaires à J0, J5 sans congélation et après 7 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) - Colruyt.

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

Dans l'ensemble, la congélation n'a pas impacté la diversité bactérienne présente dans ces échantillons.

On remarque une tendance différente en fonction de la température de décongélation. A 7°C, très peu de changements sont remarqués, les bactéries en genre et en quantité semblent peu impactées. A 20°C, on remarque une augmentation du genre *Leuconostoc* et une diminution importante du genre *Brochothrix* (Figure 21).

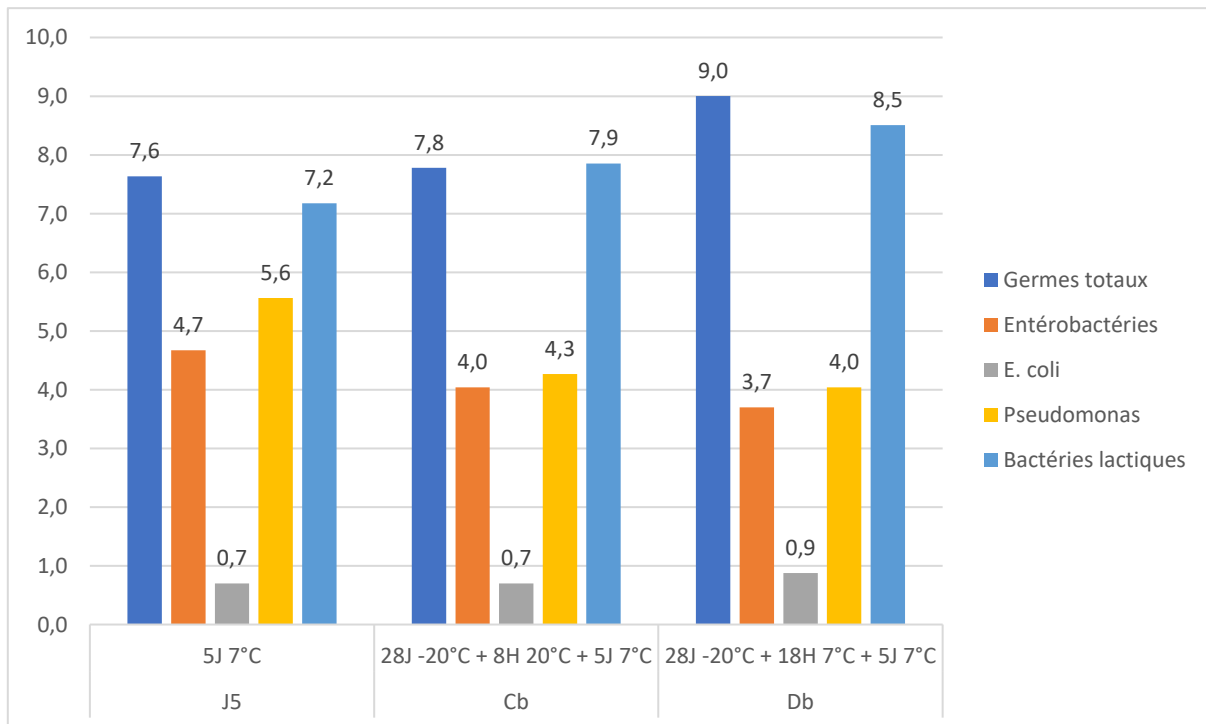


Figure 22 : Dénombrements microbiens à J5 sans congélation et après 28 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O2 et 30% CO2) – Colruyt (log UFC/g).

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

En ce qui concerne les échantillons décongelés à 20°C pendant 8 heures, on remarque que la flore totale et les entérobactéries restent stables par rapport aux données de comparaison. On observe une diminution d'un log pour les *Pseudomonas* et une légère augmentation pour les bactéries lactiques.

Pour les échantillons ayant subi une décongélation à 7°C pendant 18 heures, on constate une augmentation de la flore totale et des bactéries lactiques. Les entérobactéries et les *Pseudomonas* sont toutes deux diminuées (Figure 22).

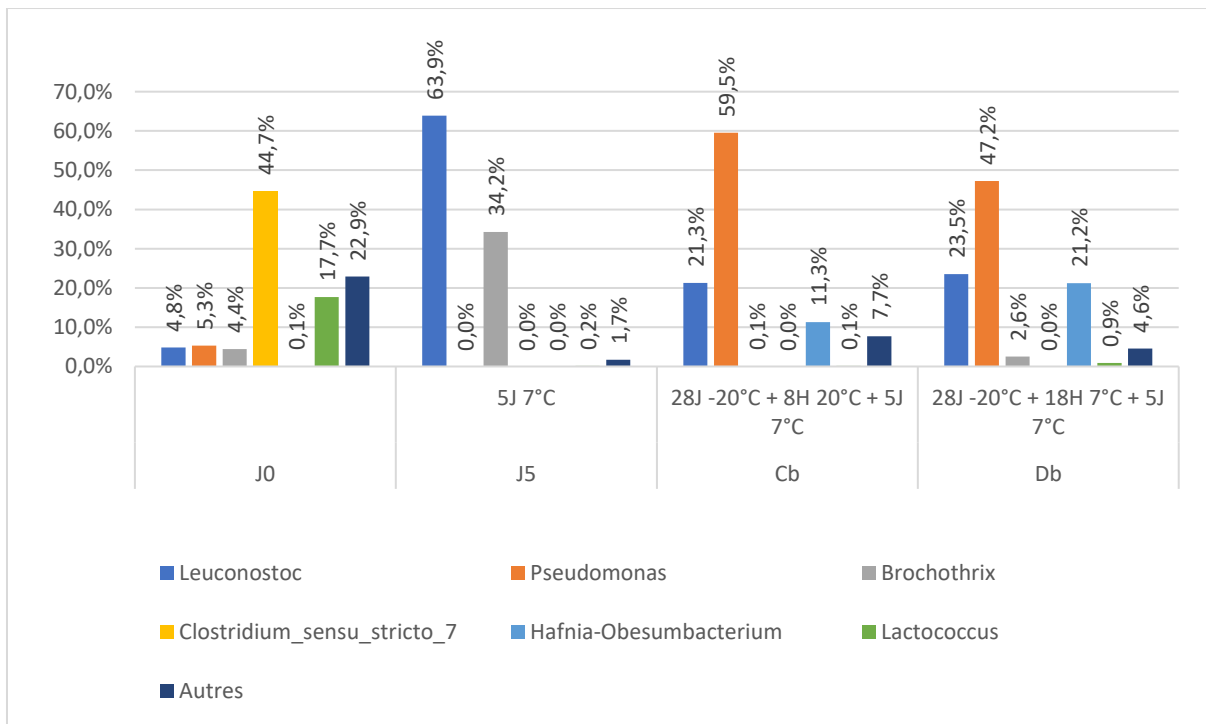


Figure 23 : Proportions des différents genres bactériens majoritaires à J0, J5 sans congélation et après 28 jours de congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O₂ et 30% CO₂) - Colruyt.

Légende : 5J 7°C : conservation de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

Après une congélation de 28 jours, on remarque une modification importante dans les genres bactériens créant une différence dans la diversité de nos échantillons avant et après congélation/décongélation.

Globalement on observe une apparition de *Pseudomonas* et d'*Hafnia-Obesumbacterium* après congélation, ainsi qu'une diminution des *Leuconostoc* et de *Brochothrix* (Figure 23).

5. Discussion

Il faut tout d'abord constater que dans l'ensemble de nos échantillons les trois viandes étudiées étaient très différentes en termes de contamination bactérienne initiale et après 5 jours de conservation à 7°C sous atmosphère modifiée (70% O₂/30% CO₂) sans congélation préalable (Figure 6). La métagénomique ciblée montre, elle aussi, des populations dominantes très différentes quand la viande a été conservée 5 jours sous MAP sans congélation préalable (Figure 7). De ce fait, il n'est pas pertinent de regrouper les résultats, mais des tendances peuvent être recherchées en examinant les résultats individuels.

En ce qui concerne l'analyse des échantillons directement après décongélation (Tableau III), réalisée uniquement dans le protocole 2, on a montré qu'une congélation préalable à -20°C réduit la population d'entérobactéries. On peut aussi noter une réduction de la flore totale après une congélation de 28 jours et une décongélation à 7°C. Pour *E. coli*, comme tous les échantillons étaient sous la limite de dénombrement, aucune conclusion ne peut être tirée ici. En ce qui concerne les *Pseudomonas*, les résultats sont opposés en fonction de l'origine de la viande. Pour la viande venant du Carrefour, il est démontré que la congélation courte comme longue réduit la population bactérienne. Concernant les viandes du Colruyt, la congélation a eu l'effet contraire lors d'une congélation courte avec une réduction de *Pseudomonas* observée seulement si la congélation a duré 28 jours. Il semble également qu'après une congélation longue de 28 jours, il existe une différence significative entre les deux méthodes de décongélation pour les bactéries lactiques. En effet, la décongélation à 7°C pendant 18 heures permet une réduction de la population des bactéries lactiques. *A contrario*, la décongélation à 20°C pendant 8 heures ne permet pas leur réduction, elle engendre même une augmentation de la population des bactéries lactiques.

On observe des résultats similaires pour les échantillons qui ont été conservés pendant 5 jours sous MAP que ce soit sans congélation préalable ou après 7 jours ou 28 jours de congélation à -20°C (Tableau III). Dans ce cas de figure, la diminution des entérobactéries se confirme et est constatée aussi pour *E. coli* dans l'échantillon contaminé. Cette réduction semble plus importante après 28 jours de congélation qu'après 7 jours et le type de décongélation ne semble pas avoir d'effet sur le niveau de cette réduction. L'effet de la congélation sur la flore totale est inconstant, mais semble « échantillon dépendant » avec augmentation pour les échantillons de Colruyt et diminution pour les deux autres. C'est le même type de constat pour les *Pseudomonas* et les bactéries lactiques avec parfois un *statu quo* et d'autres fois une réduction ou une augmentation de la bactérie. Cependant, dans ce cas, les résultats semblent tributaires des échantillons ou des conditions de congélation/décongélation. Les effets constatés semblent plus marqués après 28 jours de congélation qu'après 7 jours.

Tableau III : Évolution des dénombrements microbiens après décongélation des différents échantillons conservés sous MAP (70% O2 et 30% CO2) à J₀ et après conservation de 5 jours à 7°C.

	-20°C 7J									
	J ₀				J ₅					
	Ca 8H 20°C	Co 8H 20°C	Ca 18H 7°C	Co 18H 7°C	De 8H 20°C	Ca 8H 20°C	Co 8H 20°C	De 18H 7°C	Ca 18H 7°C	Co 18H 7°C
Germes totaux	x3	=	=	x2	=	/2	x3	/3	/2	x6
Entérobactéries	/4	/10	/3	/10	x2	=	/2	/2	=	/3
<i>E. coli</i>	=	=	=	=	/7	=	=	/18	=	=
<i>Pseudomonas</i>	/3	x2	/3	x2	x11	x18	/17	x7	x9	/27
Bactéries lactiques	x11	x49	x7	x5	/56	x9	/30	=	x8	/23
	-20°C 28J									
	J ₀				J ₅					
	Ca 8H 20°C	Co 8H 20°C	Ca 18H 7°C	Co 18H 7°C	De 8H 20°C	Ca 8H 20°C	Co 8H 20°C	De 18H 7°C	Ca 18H 7°C	Co 18H 7°C
Germes totaux	/2	=	/3	/3	/104	/2	=	/2	=	x23
Entérobactéries	/3	/11	/5	/11	/3	/10	/4	/4	/7	/9
<i>E. coli</i>	=	=	=	=	/7	=	=	/18	=	=
<i>Pseudomonas</i>	/2	/2	/3	/5	x5	/32	/20	x5	/32	/33
Bactéries lactiques	x11	x3	=	/5	/140	x3	x5	/326	x182	x21

Légende : *bactéries favorables à la conservation*, *bactéries défavorables à la conservation*, *diminution de la concentration*, *augmentation de la concentration*, Ca = Carrefour, Co = Colruyt, De = Delhaize, 8H 20°C = décongélation durant 8 heures à 20°C, 18H 7°C = décongélation 18 heures à 7°C

Le Tableau IV présente les proportions des différents taxons après 5 jours de conservation à 7°C sans congélation appliquée ainsi que l'évolution de ce pourcentage en fonction des différents barèmes de congélation/décongélation. On voit clairement que la congélation et sa durée modifient profondément les flores dominantes après 5 jours de conservation à 7°C et, que le processus de décongélation a moins d'effet sur ces modifications. Pour les échantillons de Delhaize, on passe d'une dominance de *Photobacterium* à celle de *Leuconotoc* et *Lactococcus* quels que soient les barèmes appliqués. Pour ceux de Carrefour, *Dellaglioia* est largement dominant et le reste après une congélation de 7 jours à -20°C. Par contre, ce taxon est pratiquement totalement remplacé par *Leuconostoc* si la congélation est prolongée jusqu'à 28 jours. Le processus de décongélation ne semble avoir que peu d'effet sur ces modifications de microflore. Enfin les échantillons de Colruyt sont dominés par *Leuconostoc* et *Brochothrix* après 5 jours à 7°C. La congélation pendant 7 jours renforce la présence de *Leuconostoc* au dépens de *Brochothrix* surtout après décongélation à 7°C alors que la congélation pendant 28 jours provoque un déséquilibre profond de la microflore qui est, dans ces conditions, dominée par des *Pseudomonas*, des *Hafnia-Obesumbacterium* et des *Serratia*. Cette analyse semble montrer que la durée de congélation est plus importante que le processus de décongélation pour influencer la nature des microflores dominantes lors d'une conservation ultérieure sous réfrigération des viandes sous MAP.

Si on veut analyser ces résultats en termes de qualité de la viande après conservation 5 jours à 7°C sous MAP, ce ne sont pas les proportions de chaque taxons qui sont importantes mais la concentration absolue de chacun d'entre eux. En combinant les résultats des dénombrements de la flore totale psychrotrophe avec les proportions des différents taxons obtenues par métagénomique ciblée, on peut estimer ces concentrations absolues pour les taxons majoritaires (Tableau V). Si on estime que des altérations organoleptiques peuvent être perçues lorsque la concentration d'un taxon altérant dépasse 7 log UFC/g, on peut tirer certaines conclusions des études menées même si des essais organoleptiques n'ont pas été réalisés. Les échantillons de Delhaize étaient déjà très fortement contaminés lors de l'achat, notamment par des entérobactéries et des *Pseudomonas* potentiellement altérants. Après 5 jours de conservation sous MAP, des flores potentiellement altérantes comme *Leuconostoc* (génération d'exopolysaccharides dans certaine condition rendant le produit gluant/filant) ou *Photobacterium* (protéolyse) ont atteint des niveaux élevés dépassant le seuil. L'application

d'un barème de congélation/décongélation a favorisé *Leuconostoc* et *Lactococcus*, germes plutôt neutres organoleptiquement, au détriment de *Photobacterium*, ce qui est plutôt favorable si *Leuconostoc* n'a pas produit trop d'exopolysaccharides. Aucune population n'a dépassé le seuil pour l'échantillon de Carrefour. Cependant la congélation pendant 28 jours, en favorisant *Leuconostoc*, pourrait être défavorable à une longue conservation préservée par *Dellagليا*. Enfin, pour les échantillons de Colruyt, sans congélation et après 7 jours de congélation, ils sont dominés par de fortes concentrations de *Leuconostoc* et de *Brochothrix*, altérants majeurs des viandes conservées sous atmosphère modifiée, ce qui est défavorable à la qualité de ces viandes ((Nychas et al., 2008). La décongélation à 7°C semble défavoriser *Brochothrix* par rapport à *Leuconostoc*, ce qui pourrait être favorable après une congélation de 7 jours. Par contre une congélation de 28 jours va générer de fortes concentrations de l'ordre de 6 à 7 log UFC/g de *Pseudomonas* et d'entérobactéries telles que *Hafnia* ou *Serratia* qui sont tous des germes fortement protéolytiques. Ces résultats déduits des données de métagénomique ciblée ne sont pas corroborés par les dénombrements par culture qui montre des résultats plutôt proches de 4 log UFC/g pour les entérobactéries et les *Pseudomonas* dans ces mêmes échantillons.

Tableau IV : Différence des proportions des différents taxons après conservation pendant 5 jours à 7°C et après congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O₂ et 30% CO₂)

	Delhaize					Carrefour					Colruyt				
	J5*	7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C**	7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C**	28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C**	28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C**	J5*	7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C**	7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C**	28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C**	28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C**	J5*	7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C**	7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C**	28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C**	28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C**
<i>Leuconostoc</i>	5,46%	62,34%	58,66%	78,68%	69,47%	4,92%	2,95%	4,57%	66,29%	70,01%	63,92%	7,65%	33,84%	-40,38%	-42,61%
<i>Photobacterium</i>	87,04%	-0,81%	-74,97%	-84,85%	-84,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,02%	0,02%	-0,02%	-0,02%
<i>Lactococcus</i>	3,63%	10,94%	12,54%	4,56%	12,84%	0,21%	-0,14%	-0,09%	-0,19%	-0,20%	0,15%	-0,08%	-0,13%	0,74%	-0,01%
<i>Dellaglioia</i>	2,17%	6,43%	2,32%	0,79%	-0,53%	92,11%	-4,73%	-6,00%	-64,71%	-67,67%	1,21%	1,27%	-0,95%	-1,00%	-1,19%
<i>Brochothrix</i>	0,75%	-0,26%	-0,27%	-0,38%	-0,52%	0,01%	0,01%	-0,01%	-0,01%	-0,01%	34,23%	-8,96%	-32,68%	-31,68%	-34,16%
<i>Pseudomonas</i>	0,04%	0,27%	0,35%	0,12%	1,55%	0,01%	-0,01%	0,01%	-0,01%	-0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	47,21%	59,52%
<i>Hafnia - Obesumbacterium</i>	0,03%	-0,01%	0,08%	-0,03%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	21,23%	11,26%
<i>Streptococcus</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,01%	0,66%	-0,04%	-0,13%	-0,66%	-0,65%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Serratia</i>	0,01%	0,02%	0,06%	-0,01%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,82%	7,09%
Autres taxons	1,20%	1,37%	0,90%	0,79%	0,77%	2,1%	1,96%	1,65%	-1,25%	-1,46%	0,47%	0,10%	-0,06%	0,08%	0,12%

Légende : bactéries favorables à la conservation, bactéries défavorables à la conservation, diminution de la proportion relative, augmentation de la proportion relative, * Proportions relatives des séquences constatées, ** Evolution de la proportion relative, 7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

Tableau V : Concentrations absolues des taxons majoritaires présents après conservation pendant 5 jours à 7°C et après congélation et conservation pendant 5 jours à 7°C sous MAP (70% O₂ et 30% CO₂) (log UFC/g)

	Delhaize					Carrefour					Colruyt				
	J5	7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	J5	7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	J5	7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C
Germes totaux	8,4	7,9	8,4	8,2	6,4	7	6,6	6,7	7	6,8	7,6	8,4	8,1	9	7,8
<i>Leuconostoc</i>	7,1	7,7	8,2	8,1	6,2	5,7	5,5	5,7	6,8	6,7	7,4	8,2	8,1	8,4	7,1
<i>Photobacterium</i>	8,3	6,6	7,5	6,5	4,8	<2,7	<2,3	<2,4	<2,7	<2,5	3,9	5,0	<3,8	<4,7	<3,5
<i>Lactococcus</i>	6,9	7,0	7,6	7,1	5,6	4,3	3,5	3,8	3,3	2,8	4,8	5,2	4,4	7,0	4,9
<i>Dellaglioa</i>	6,7	6,8	7,1	6,7	4,6	7,0	6,6	6,7	6,4	6,2	5,7	6,8	5,5	6,3	4,1
<i>Brochothrix</i>	6,3	5,6	6,1	5,8	3,7	3,1	3,0	<2,4	<2,7	<2,5	7,2	7,8	6,3	7,4	4,6
<i>Pseudomonas</i>	5,0	5,4	6,0	5,4	4,6	3,1	<2,3	3,1	<2,7	<2,5	<3,3	<4,1	<3,8	8,7	7,6
<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>	4,9	4,3	5,5	<3,9	3,5	<2,7	<2,3	<2,4	<2,7	<2,5	<3,3	<4,1	<3,8	8,3	6,8
<i>Streptococcus</i>			4,4	<3,9	2,4	4,7	4,4	4,5	<2,7	2,8	<3,3	<4,1	<3,8	<4,7	<3,5
<i>Serratia</i>	4,1	4,4	5,2	<3,9	2,8	<2,7	<2,3	4,5	<2,7	<2,5	<3,3	<4,1	<3,8	7,6	6,6
Autres taxons	6,5	6,3	6,7	6,5	4,7	5,3	5,2	5,3	2,2	2,3	5,3	6,1	5,7	2,3	2,6

Légende : *bactéries favorables à la conservation*, *bactéries défavorables à la conservation*, *valeur supérieure à une limite de 7 log UFC/g*, 7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 7 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 18 heures à 7°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C, 28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C = congélation de 28 jours à -20°C suivi d'une décongélation de 8 heures à 20°C et d'une conservation supplémentaire de 5 jours à 7°C

6. Conclusion

En conclusion, cette étude montre clairement que la congélation des viandes hachées modifie profondément les écosystèmes microbiens qui se développent si on les conserve ultérieurement sous réfrigération avant leur consommation. Le processus de décongélation, du moins avec les deux barèmes testés, a un effet moindre. Cette étude devrait être répétée sur un plus grand nombre de viandes hachées pour essayer d'en tirer des conclusions généralisables pour améliorer la conservation de ces produits. Des essais intégrant des microflores pathogènes seraient aussi très intéressants pour voir leur comportement en interaction avec le reste de l'écosystème afin de pouvoir proposer, le cas échéant, les barèmes de congélation/décongélation les plus sécuritaires.

7. Bibliographie

- Anses, 2019a. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “Clostridium perfringens” - Mai 2017. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-clostridium-1>.
- Anses, 2019b. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis” - Mai 2017. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-yersinia-0>.
- Anses, 2019c. Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments - : “Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC)” - Mai 2019. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-microbiologique-transmissible-par-les-aliments-escherichia>.
- Anses, 2021a. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “Campylobacter jejuni, Campylobacter coli” - Juin 2020. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

<https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-campylobacter-0>.

- Anses, 2021b. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “*Listeria monocytogenes*” - Avril 2020. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
<https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-listeria-0>.
- Anses, 2021c. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “*Salmonella spp*” - juin 2021. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
<https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-salmonella-spp-juin>.
- Anses. 2022. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “*Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques” - Mars 2022. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-staphylococcus-0>.
- Blickstad, Elisabeth, 1984. The Effect of Water Activity on Growth and End-Product Formation of Two *Lactobacillus Spp.* and *Brochothrix Thermosphacta* ATCC 11509T. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19, 13-17. doi.org/10.1007/BF00252810.
- Cauchie, Emilie, Laurent Delhalle, Bernard Taminiau, Assia Tahiri, Nicolas Korsak Koulagenko, Sophie Burteau, Abdoulaye Papa Fall, Frédéric Farnir, Ghislain Baré, et Georges Daube, 2020. Assessment of Spoilage Bacterial Communities in Food Wrap and Modified Atmospheres-Packed Minced Pork Meat Samples by 16S RDNA Metagenetic Analysis. *Frontiers in Microbiology* 10. doi.org/10.3389/fmicb.2019.03074.
- Choi, Y. M., H. J. Park, H. I. Jang, S. A. Kim, J. Y. Imm, I. G. Hwang, et M. S. Rhee, 2013. Changes in Microbial Contamination Levels of Porcine Carcasses and Fresh Pork in Slaughterhouses, Processing Lines, Retail Outlets, and Local Markets by Commercial Distribution. *Research in Veterinary Science* 94 (3), 413-18. doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.015.

- De Filippis, Francesca, Antonietta La Stora, Francesco Villani, et Danilo Ercolini, 2013. Exploring the Sources of Bacterial Spoilers in Beefsteaks by Culture-Independent High-Throughput Sequencing. *PloS One* 8 (7). doi.org/10.1371/journal.pone.0070222.
- Delhalle, L., N. Korsak, B. Taminiau, C. Nezer, S. Burteau, V. Delcenserie, J. B. Pouillet, et G. Daube, 2016. Exploring the Bacterial Diversity of Belgian Steak Tartare Using Metagenetics and Quantitative Real-Time PCR Analysis. *Journal of Food Protection* 79 (2), 220-29. doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-185.
- Devoyod, J. J., et Françoise Poullain, 1988. Les Leuconostocs. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Le Lait* 68 (3), 249-79. doi.org/10.1051/lait:1988317.
- Dykes, Gary A., 2006. Laboratory-Based Simulation of Freezing Profiles of Beef Trim for Escherichia Coli O157 Survival Determinations. *Journal of Microbiological Methods* 64 (2), 266-74. doi.org/10.1016/j.mimet.2005.05.006.
- Fall, Papa-Abdoulaye, 2011. Études des interactions entre la bactérie bioprotectrice Lactococcus piscium et Brochothrix thermosphacta et Listeria monocytogenes dans la crevette tropicale. (Thèse de doctorat en microbiologie alimentaire, Faculté des Sciences et des Techniques) Université de Nantes, Nantes.
https://archimer.ifremer.fr/doc/00050/16164/.
- Georgsson, Franklín, Ásmundur E. Þorkelsson, Margrét Geirsdóttir, Jarle Reiersen, et Norman J. Stern, 2006. The Influence of Freezing and Duration of Storage on Campylobacter and Indicator Bacteria in Broiler Carcasses. *Food Microbiology* 23 (7), 677-83. doi.org/10.1016/j.fm.2005.10.003.
- Jiang, Yanfen, Yinghui Ma, Qianqian Liu, Tianmei Li, Yiming Li, Kangkang Guo, et Yanming Zhang, 2022. Tracing Clostridium Perfringens Strains from Beef Processing of Slaughter House by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and the Distribution and Toxinotype of Isolates in Shaanxi Province, China. *Food Microbiology* 101. doi.org/10.1016/j.fm.2021.103887.
- Klein, Stefanie, Carlos Lorenzo, Sonja Hoffmann, Johannes M. Walther, Sonja Storbeck, Tanja Piekarski, Bryan J. Tindall, Victor Wray, Manfred Nimtz, et Jürgen Moser, 2009. Adaptation of Pseudomonas Aeruginosa to Various Conditions Includes TRNA-Dependent Formation of Alanyl-Phosphatidylglycerol. *Molecular Microbiology* 71 (3), 551-65. doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06562.x.

- Koutsoumanis, K., A. Stamatiou, P. Skandamis, et G.-J. E. Nychas, 2006. Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and PH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1), 124-34.
doi.org/10.1128/AEM.72.1.124-134.2006.
- Lengès, J, et Demeyer D., 1999. « Technologie de la viande ». In *La viande ?*, Belgian Association for Meat Science and Technology (éds), 97-140. Liège: Presses de la faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège.
- Les techniques de conservation des aliments, Clinquart Antoine, 2005.
- Lianou, Alexandra, et Konstantinos P. Koutsoumanis, 2009. Evaluation of the Effect of Defrosting Practices of Ground Beef on the Heat Tolerance of *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Meat Science* 82 (4), 461-68.
doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.018.
- Limsong, S., et W. C. Frazier, 1966. Adaptation of *Pseudomonas Fluorescens* to Low Levels of Water Activity Produced by Different Solutes. *Applied Microbiology* 14 (6), 899-901. doi.org/10.1128/am.14.6.899-901.1966.
- Manios, Stavros G., et Panagiotis N. Skandamis, 2015. Effect of Frozen Storage, Different Thawing Methods and Cooking Processes on the Survival of *Salmonella* Spp. and *Escherichia Coli* O157:H7 in Commercially Shaped Beef Patties. *Meat Science* 101, 25-32. doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.031.
- Martin, Tiphaine C., Alessia Visconti, Tim D. Spector, et Mario Falchi, 2018. Conducting Metagenomic Studies in Microbiology and Clinical Research. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (20), 8629-46. doi.org/10.1007/s00253-018-9209-9.
- Meng, Lu, Yangdong Zhang, Huimin Liu, Shengguo Zhao, Jiaqi Wang, et Nan Zheng, 2017. Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures. *Frontiers in Microbiology* 8, 2158.
doi.org/10.3389/fmicb.2017.02158.
- Moi, Ibrahim Musa, Noordiyanah Nadhirah Roslan, Adam Thean Chor Leow, Mohd Shukuri Mohamad Ali, Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman, Azam Rahimpour, et Suriana Sabri, 2017. The Biology and the Importance of *Photobacterium* Species.

Applied Microbiology and Biotechnology 101, 4371-85. doi.org/10.1007/s00253-017-8300-y.

- Nychas, George-John E., Panos N. Skandamis, Chrysoula C. Tassou, et Konstantinos P. Koutsoumanis, 2008. Meat Spoilage during Distribution. *Meat Science*, Symposium on Meat safety: From Abattoir to Consumer, 78 (1), 77-89.
doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020.
- Quelle est la consommation de viande et de poisson en Belgique ?, 2022. Celagri. 14 juillet 2022. <https://www.celagri.be/quelle-est-la-consommation-de-viande-en-belgique/>.
- Règlement (CE) n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale
- Règlement (CE) n° 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires
- Roccato, Anna, Mieke Uyttendaele, Veronica Cibirin, Federica Barrucci, Veronica Cappa, Paola Zavagnin, Alessandra Longo, Paolo Catellani, et Antonia Ricci, 2015. Effects of Domestic Storage and Thawing Practices on Salmonella in Poultry-Based Meat Preparations . *Journal of Food Protection* 78 (12), 2117-25.
doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-048.
- Salvetti, Elisa, Ilenia Campedelli, Ilaria Larini, Giada Conedera, et Sandra Torriani, 2021. Exploring Antibiotic Resistance Diversity in *Leuconostoc* Spp. by a Genome-Based Approach: Focus on the *LsaA* Gene . *Microorganisms* 9 (3), 491.
doi.org/10.3390/microorganisms9030491.
- Tordjman-Valency Laura, 2016. Défi du dénombrement microbien dans l'industrie pharmaceutique : les nouvelles méthodes alternatives sont-elles appliquées ? <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01373145>.
- Wang, Xiang, Evy Lahou, Elien De Boeck, Frank Devlieghere, Annemie Geeraerd, et Mieke Uyttendaele, 2015. Growth and Inactivation of Salmonella Enterica and Listeria Monocytogenes in Broth and Validation in Ground Pork Meat during Simulated Home Storage Abusive Temperature and Home Pan-Frying. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY* 6. doi.org/10.3380/fmicb.2015.01161.

- Weinroth, Margaret D., Brianna C. Britton, Kathryn R. McCullough, Jennifer N. Martin, Ifigenia Geornaras, Rob Knight, Keith E. Belk, et Jessica L. Metcalf, 2019. Ground Beef Microbiome Changes with Antimicrobial Decontamination Interventions and Product Storage. *PloS One* 14 (6). doi.org/10.1371/journal.pone.0217947.

8. Annexes

8.1. Annexe 1 : plan de congélation et d'analyses protocole 1

ORIGINE DE LA VIANDE	BARQUETTE	ECHANTILLON	JOUR DE L'ANALYSE	CONGELATION ¹	METHODE DE DECONGELATION ²
DELHAIZE ANS	J ₀ A	J ₀ A1 et J ₀ A2	J0	X	/
	J ₀ B	J ₀ B1 et J ₀ B2			
	J ₅ A	J ₅ A1 et J ₅ A2	J5	X	/
	J ₅ B	J ₅ B1 et J ₅ B2			
	AA	AA1 et AA2	J13	V1	M1
	AB	AB1 et AB2			
	CA	CA1 et CA2	J12	V1	M2
	CB	CB1 et CB2			
	DA	DA1 et DA2	J35	V2	M1
	DB	DB1 et DB2			
FA	FA1 et FA2	J34	V2	M2	
FB	FB1 et FB2				

¹ X : non, V1 : 7 jours, V2 : 28 jours

² M1 : 18 heures à 7 °C, M2 : 8 heures à 20 °C

8.2. Annexe 2 : plan de congélation et d'analyse protocole 2

ORIGINE DE LA VIANDE	BARQUETTE	ECHANTILLON	JOUR DE L'ANALYSE	CONGELATION ¹	METHODE DE DECONGELATION ²	CONSERVATION POST-CONGELATION ³	
CARREFOUR	J ₀ -D	J ₀ -D1 et J ₀ -D2	J0	X	/	/	
	J ₅ -D	J ₅ -D1 et J ₅ -D2	J5	X	/	/	
	Aa-D	Aa-D1 et Aa-D2	J7	V1	M2	X	
	Ab-D	Ab-D1 et Ab-D2	J11	V1	M2	V	
	Ba-D	Ba-D1 et Ba-D2	J7	V1	M1	X	
	BONCELLES	Bb-D	Bb-D1 et Bb-D2	J11	V1	M1	V
		Ca-D	Ca-D1 et Ca-D2	J26	V2	M2	X
		Cb-D	Cb-D1 et Cb-D2	J32	V2	M2	V
		Da-D	Da-D1 et Da-D2	J26	V2	M1	X
		Db-D	Db-D1 et Db-D2	J32	V2	M1	V
COLRUYT	J ₀ -C	J ₀ -C1 et J ₀ -C2	J0	X	/	/	
	J ₅ -C	J ₅ -C1 et J ₅ -C2	J5	X	/	/	
	Aa-C	Aa-C1 et Aa-C2	J7	V1	M2	X	
	Ab-C	Ab-C1 et Ab-C2	J11	V1	M2	V	
	Ba-C	Ba-C1 et Ba-C2	J7	V1	M1	X	
	BONCELLES	Bb-C	Bb-C1 et Bb-C2	J11	V1	M1	V
		Ca-C	Ca-C1 et Ca-C2	J26	V2	M2	X
		Cb-C	Cb-C1 et Cb-C2	J32	V2	M2	V
		Da-C	Da-C1 et Da-C2	J26	V2	M1	X
		Db-C	Db-C1 et Db-C2	J32	V2	M1	V

¹ X : non, V1 : 7 jours, V2 : 28 jours

² M1 : 18 heures à 7 °C, M2 : 8 heures à 20 °C

³ X : non, V : 5 jours à 7 °C

8.3. Annexe 3 : ensemencements réalisés lors du protocole 1 et du protocole 2

PROTOCOLE 1

		PCA	VRBG	TBX	CFC	MRS
J₀	J0	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM
J₅	J5	Surface : D3	Surface : D3	Surface : SM	Surface : D3	Surface : D1
		Surface : D5	Surface : D5		Surface : D5	Surface : D4
A	J13	Surface : D2	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D2
		Surface : D4	Surface : D4	Surface : D2	Surface : D4	Surface : D4
C	J12	Surface : D2	Surface : D2	Surface : SM	Surface : SM	Surface : D2
		Surface : D5	Surface : D5	Surface : D2	Surface : D3	Surface : D5
D	J35	Surface : D3	Surface : D1	Surface : SM	Surface : D1	Surface : D1
		Surface : D5	Surface : D3	Profondeur : SM	Surface : D3	Surface : D3
F	J34	Surface : D3	Surface : D1	Surface : SM	Surface : D2	Surface : D2
		Surface : D5	Surface : D3	Profondeur : SM	Surface : D4	Surface : D4

PROTOCOLE 2

		PCA	VRBG	TBX	CFC	MRS
J₀-D	J0	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM
J₀-C	J0	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM
J₅-D	J5	Surface : D1	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D3	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D1
J₅-C	J5	Surface : D1	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D3	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D1
AA-D	J7	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D2	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D2
		Surface : D3				
AA-C	J7	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM

		Surface : D2 Surface : D3	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D2
AB-D	J11	Surface : D1 Surface : D3	Surface : SM Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : D1 Surface : D3
AB-C	J11	Surface : D1 Surface : D3	Surface : SM Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : D1 Surface : D3
BA-D	J7	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2
BA-C	J7	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2
BB-D	J11	Surface : D1 Surface : D3	Surface : SM Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : D1 Surface : D3
BB-C	J11	Surface : D1 Surface : D3	Surface : SM Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : D1 Surface : D3
CA-D	J26	Surface : D1 Surface : D3	Surface : SM Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2
CA-C	J26	Surface : D1 Surface : D3	Surface : SM Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2
CB-D	J32	Surface : D1 Surface : D3	Profondeur : SM Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1 Surface : D3
CB-C	J32	Surface : D1 Surface : D3	Surface : SM Surface : D1	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1 Surface : D3
DA-D	J26	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2
DA-C	J26	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : SM Surface : D2	Surface : SM Surface : D2
DB-D	J32	Surface : D1 Surface : D3	Profondeur : SM Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1 Surface : D3
DB-C	J32	Surface : D1 Surface : D3	Surface : SM Surface : D1	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1 Surface : D3

8.4. Annexe 4 : résultats généraux des dénombrements microbiologiques (en log UFC/g)

Delhaize						
Echantillon	Traitement	Flore totale	Entérobactéries	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	Bactéries lactiques
J ₀	J0	6,0	5,5	1,9	5,6	5,7
J ₅	5J 7°C	8,4	5,6	2,5	5,1	7,6
A	7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	7,9	5,4	1,3	6,0	7,7
C	7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	8,4	5,8	1,7	6,2	5,9
D	28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	8,2	5,0	1,3	5,8	5,1
F	28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	6,4	5,1	1,7	5,8	5,5
Carrefour						
Echantillon	Traitement	Flore totale	Entérobactéries	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	Bactéries lactiques
J ₀	J0	4,8	2,7	0,7	2,7	3,1
J ₅	5J 7°C	7,0	1,7	0,7	3,2	5,6
Aa	7J -20°C + 8H 20°C	5,2	2,1	0,7	2,2	4,1
Ab	7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	6,7	1,9	0,7	4,5	6,6
Ba	7J -20°C + 18H 7°C	4,8	2,2	0,7	2,3	3,9
Bb	7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	6,6	1,9	0,7	4,2	6,5
Ca	28J -20°C + 8H 20°C	4,5	2,2	0,7	2,5	4,1
Cb	28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	6,8	0,7	0,7	1,7	6,1
Da	28J -20°C + 18H 7°C	4,3	2,0	0,7	2,2	3,0
Db	28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	7,0	0,9	0,7	1,7	7,9
Colruyt						
Echantillon	Traitement	Flore totale	Entérobactéries	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	Bactéries lactiques
J ₀	J0	5,1	3,7	0,7	2,9	3,7
J ₅	5J 7°C	7,6	4,7	0,7	5,6	7,2
Aa	7J -20°C + 8H 20°C	5,2	2,7	0,7	3,2	5,4
Ab	7J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	8,1	4,3	0,7	4,3	5,7
Ba	7J -20°C + 18H 7°C	5,4	2,7	0,7	3,2	4,4
Bb	7J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	8,4	4,2	0,7	4,1	5,8
Ca	28J -20°C + 8H 20°C	4,9	2,6	0,7	2,6	4,1
Cb	28J -20°C + 8H 20°C + 5J 7°C	7,8	4,0	0,7	4,3	7,9
Da	28J -20°C + 18H 7°C	4,6	2,6	0,7	2,2	3,0
Db	28J -20°C + 18H 7°C + 5J 7°C	9,0	3,7	0,9	4,0	8,5

8.5. Annexe 5 : résultats généraux de métagénétique - Delhaize

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	JOA1	JOB1	J5A1	J5B1	AA1	AB1	CA1	CB1	DA1	DB1	FA1	FB1
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Leuconostoc	372	361	432	656	7358	6198	6594	6224	8667	8158	6408	8574
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Vibrionaceae	Photobacterium	7923	7976	8898	8453	616	507	810	1604	151	288	384	219
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus	403	373	275	448	1036	1876	1829	1402	666	971	2534	758
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Dellaglioa	750	543	172	261	622	1097	457	442	264	328	210	118
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	Carnobacterium	116	119	18	17	126	90	80	95	61	79	80	68
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Listeriaceae	Brochothrix	216	386	82	68	50	49	36	60	34	41	22	25
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	63	125	6	2	34	28	35	43	14	19	203	115
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillaceae_ge	11	3	7	14	103	88	78	42	92	62	45	61
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Latilactobacillus	4	6	5	11	16	33	30	25	24	24	35	21
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Vibrionaceae	Vibrionaceae_ge	53	31	71	50	9	9	13	3	4	3	3	3
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Hafniaceae	Hafnia-Obesumbacterium	3	1	3	3	3	2	9	14	0	0	27	1
Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteria	Chloroplast	Chloroplast_fa	Chloroplast_ge	31	32	2	1	4	2	2	7	2	2	2	2
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Weissella	6	9	0	4	5	5	5	5	5	1	10	11
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillales_fa	Lactobacillales_ge	2	2	2	0	3	3	5	1	12	8	8	7
Bacteria	Bacteria_ph	Bacteria_cl	Bacteria_or	Bacteria_fa	Bacteria_ge	8	4	9	9	4	4	5	2	1	1	3	2
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Vagococcaceae	Vagococcus	7	4	3	2	0	2	2	1	0	3	1	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Yersiniaceae	Serratia	1	1	1	0	5	1	2	11	0	0	4	1
Bacteria	Firmicutes	Thermoanaerobacteria	Caldicellulosiraptorales	Caldicellulosiraptoraceae	Caldicellulosiraptor	5	2	0	0	0	0	0	0	0	2	10	7
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria_or	Gammaproteobacteria_fa	Gammaproteobacteria_ge	1	4	11	0	0	4	0	0	0	0	1	1
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium_sensu_stricto_5	2	4	0	0	1	3	1	0	0	1	1	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Yersiniaceae	Yersiniaceae_ge	1	1	0	0	0	1	1	0	1	3	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonadaceae_ge	2	1	1	1	0	0	1	0	0	1	4	0
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Myroides	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	3	1
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	2	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	2	1	1	0	0	0	1	2	0	1	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Morganellaceae	Morganella	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadales_fa	Pseudomonadales_ge	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Mitochondria	Mitochondria_ge	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacilli_or	Bacilli_fa	Bacilli_ge	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Aeromonadaceae	Aeromonas	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae_ge	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Shewanellaceae	Shewanella	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardiaceae	Rhodococcus	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Dermabacteraceae	Brachybacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Leucobacteriaceae	Leucobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Garicola	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Kocuria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriales_fa	Flavobacteriales_ge	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Campylobacterota	Campylobacteria	Campylobacteriales	Arcobacteraceae	Arcobacter	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcaceae_ge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Staphylococcales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Caulobacteriaceae	Caulobacteriaceae_ge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Devosiaceae	Devosia	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Pseudochrobactrum	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae_ge	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Rhodoferax	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	Pantoea	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Morganellaceae	Morganellaceae_ge	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Pectobacteriaceae	Pectobacteriaceae_ge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Proteobacteria_cl	Proteobacteria_or	Proteobacteria_fa	Proteobacteria_ge	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Terrimonas	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae_ge	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Moheibacter	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Riemerella	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Campylobacterota	Campylobacteria	Campylobacteriales	Arcobacteraceae	Pseudarcobacter	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteria_or	Cyanobacteria_fa	Cyanobacteria_ge	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales_fa	Bacillales_ge	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococaceae	Facklamia	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Fructobacillus	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Furfurilactobacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Limosilactobacillus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Hungateiclostridiaceae	Saccharofermentans	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	Oscillospiraceae_ge	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococaceae	UCG-001	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Peptostreptococcales-Tissierellales_fa	Peptostreptococcales-Tissierellales_fa_ge	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Peptostreptococcales-Tissierellales_Family_W5053		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Patescibacteria	ABY1	ABY1_or	ABY1_fa	ABY1_ge	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobiaceae_ge	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Rhodoferrax	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Oxalobacteraceae_ge	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Erwiniaceae	Rosenbergiella	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Succinivibrionaceae	Succinivibrionaceae_UCG-002	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria_or	Gammaproteobacteria_fa	Gammaproteobacteria_ge	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Marinobacteraceae	Marinobacter	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadales_fa	Pseudomonadales_ge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Luteimonas	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	Proteobacteria_cl	Proteobacteria_or	Proteobacteria_fa	Proteobacteria_ge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bacteria	Synergistota	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	Fretibacterium	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0