UNIVERSITE DE RENNES I
(U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement)
UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
(U.F.R. des Sciences &Techniques)

MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE Mention MICROBIOLOGIE
Parcours Microbiologie Fondamentale et Appliquée
Année 2019-2020

Impact des paramètres de fabrication des légumes fermentés sur leur composition microbiologique :

Caractérisation par approche culture-dépendante des populations de micro-organismes dans divers légumes fermentés

Mémoire présenté le 15 Juin 2020

Par Olivier Picard

Stage effectué au Laboratoire de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, 65 rue de St-Brieuc, 35000 Rennes

Sous la direction de Anne Thierry et Marie-Noelle Madec

UNIVERSITE DE RENNES I
(U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement)
UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
(U.F.R. des Sciences &Techniques)

MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE Mention MICROBIOLOGIE
Parcours Microbiologie Fondamentale et Appliquée
Année 2019-2020

Impact des paramètres de fabrication des légumes fermentés sur leur composition microbiologique :

Caractérisation par approche culture-dépendante des populations de micro-organismes dans divers légumes fermentés

Mémoire présenté le 15 Juin 2020

Par Olivier Picard

Stage effectué au Laboratoire de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, 65 rue de St-Brieuc, 35000 Rennes

Sous la direction de Anne Thierry et Marie-Noelle Madec

Présentation technique du stage et brève description du stage et du confinement

Ce stage a été réalisé du 13 Janvier 2020 au 17 Juillet 2020 par Olivier Picard, dans le cadre de la seconde année du Master Sciences, Technologies, Santé mention Microbiologie, parcours Microbiologie Fondamentale et Appliquée, durant l'année 2019-2020. L'encadrement a été effectué par Anne Thierry et Marie-Noelle Madec de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), se situant au 65, rue de St Brieuc à Rennes (35000). Le sujet de ce stage est l'étude de l'impact des paramètres de la fabrication de légumes fermentés sur leur composition microbiologique, par le biais d'une caractérisation par approche culture-dépendante des populations de micro-organismes.

La première partie du stage, du 13 Janvier au 01 Février, s'est déroulée au laboratoire et a été consacré à l'étude de la bibliographie disponible sur les légumes fermentés, à l'apprentissage des techniques nécessaires et à la mise en place du protocole utilisé pour les analyses microbiologiques, ainsi qu'à la prise en main et à la gestion de la base de données des Fermenteurs FLEGME. Cette gestion a consisté a répondre aux différents mails envoyé par les Fermenteurs, ainsi qu'en l'envoi de mail et questionnaires. Un premier échantillon a été analysé le 17 Février, de manière à tester le protocole mis en place. Ensuite, le nombre d'envoi de colis et d'échantillons analysés à augmentés et a été maintenu jusqu'à l'arrivée du confinement le 16 Mars, avec au total 15 échantillons analysés.

Le stage a été maintenu, en télétravail. Le télétravail a consisté à la gestion de la base de données FLEGME, avec notamment des mails adressés aux Fermenteurs tenant au courant de la situation au début de confinement et permettant de réorganiser les envois d'échantillons à la fin du confinement. Afin de préparer ce qui aurait dû être la seconde partie de ce stage, c'est-à-dire la caractérisation des populations bactériennes par culture-indépendante, un travail bibliographique a été réalisé, portant sur le choix des amorces à utiliser pour l'amplification du gène de l'ARN 16S de bactéries issues d'une matrice végétale, ainsi que sur les espèces et genres bactériens les plus fréquemment retrouvés dans les publications étudiant la diversité bactérienne par approche culture-indépendante. Enfin, les analyses des résultats pour les 15 échantillons analysés et la rédaction du rapport a commencé durant la période de confinement. Le stage a pu reprendre le 18 Mai, mais le temps que les envois et renvois de colis ne se fassent, des échantillons n'ont été analysés qu'à partir du 26 Mai. Il est à noter que 8 échantillons ont dû être jetés lors de la reprise car étant resté 2 mois en chambre froide. Ces échantillons n'était en effet pas parvenu dans leurs bocaux d'origine mais d'un autre contenant après prélèvements et le choix a été fait de ne pas les analyser à cause de leur longue période de stockage.

J'ai passé le confinement dans mon appartement, à Rennes. Je disposais d'un ordinateur avec un casque et micro ainsi que d'un accès internet fonctionnel. Je ne disposais pas de webcam fonctionnelle durant le confinement mais j'en ai acquis une lors du déconfinement. Mon numéro de téléphone est le 06 88 42 91 60.

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Anne Thierry et Marie-Noelle Madec pour m'avoir permis de réaliser ce stage, et pour leur encadrement.

A Anne, pour sa disponibilité, son investissement, et ses nombreux conseils lors de l'analyse des résultats et la rédaction de ce rapport. Son encadrement m'a permis d'acquérir de précieuses compétences rédactionnelles et également organisationnelles.

A Marie-Noelle, pour sa patience, sa pédagogie et les précieuses connaissances et compétences qu'elle m'a transmises lors de ce stage.

Je tiens également à remercier Victoria Chuat, Jessica Musset, Anne-Sophie Bage, Florence Valence-Bertel et Laurent Marché pour leur aide et la bonne humeur qu'il.elles ont apporté.es lors de ce stage.

Enfin, je remercie tout le personnel de l'INRAE, qui a contribué à faire de ce stage une très belle et enrichissante expérience.

Table des matières

Liste des figures et tableaux.....
Liste des abréviations.....
I. Introduction générale.....1
II. Introduction bibliographique.....2
2.1. Les légumes fermentés.....2
2.2.1. Contexte historique des produits fermentés.....2
2.1.1. Bénéfices et risques de la lactofermentation de légumes.....3
2.1. La lactofermentation.....4
2.2.1. Paramètres majeurs de la lactofermentation.....4
2.2.2. Déroulement de la lactofermentation : exemple de la choucroute.....5
2.2. Les bactéries lactiques.....6
2.3.1. Généralités.....6
2.3.2. Classification.....7
2.3.3. Fermentation homofermentaire et hétérofermentaire.....8
2.4. Caractérisation des populations microbiennes des légumes fermentés.....9
2.4.1. Approche culture-dépendante.....9
2.4.2. Approches culture-indépendantes.....9
2.4.3. Etat de l'art concernant les communautés microbiennes des légumes fermentés.....11
III. Matériel et méthodes.....12
3.1. Echantillonnage.....12
3.2. Caractérisation des différentes populations de micro-organismes.....12
3.3.1. Préparation des échantillons et mesure du pH.....12
3.3.2. Dénombrements des différentes populations de micro-organismes et recherche de pathogènes.....13
3.3. Recueil des pratiques de préparation des échantillons collectés.....15
3.4- Analyses statistiques.....15
IV. Résultats et discussion.....16
4.1. Recueil des pratiques de préparation des échantillons étudiés.....16
4.2. Caractérisation des différentes populations de micro-organismes.....19
4.3. Liens entre procédé de fabrication, composition microbiologique et pH.....22
V- Conclusion et perspectives.....24
Références bibliographiques.....26

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Réactions de la voie homofermentaire (A) et hétérofermentaire (B) chez les bactéries lactiques (21). 8

Figure 2. Diagrammes en boîte pour la quantité de sel ajouté, l'âge de l'échantillon et les températures de fermentation et conservation. 16

Figure 3. Histogramme illustrant la répartition des échantillons pour chaque variable issue des questions à choix binaires.. 18

Figure 4. Graphique représentant les modalités des variables actives utilisées pour l'ACM (A) et la répartition des individus, c'est-à-dire les 19 échantillons de légumes fermentés (B). 22

Figure 5. Représentation graphique de l'ACM effectuée avec comme variables supplémentaires le pH (A) et l'âge (B).. 23

Tableau 1. Classification des bactéries lactiques au niveau des familles et des genres 7

Tableau 2. Principaux genres bactériens identifiés dans les légumes fermentés au travers d'analyses métagénomiques ciblés publiées principalement ces 10 dernières années. 12

Tableau 3. Liste des milieux utilisés, des conditions appliquées et des populations de micro-organismes recherchées correspondantes 14

Tableau 4. Résultats des dénombrements réalisés sur les différents milieux utilisés et valeur du pH des 18 échantillons 19

Liste des abréviations

ACM : Analyse des correspondances multiples

BCA : Bacillus Cereus Selective Agar

BGN : population Bactérienne Gram-négative aérobie

BHI-YEA[1] : gélose infusion cœur-cervelle enrichie en extrait de levure

BHI-YEAn[1] : gélose infusion cœur-cervelle enrichie en extrait de levure + natamycine

BHI-YEAnp[1] : gélose infusion cœur-cervelle enrichie en extrait de levure + natamycine + pénicilline

BL : Bactéries Lactiques

BSpo : Population Bactérienne Sporulée aérobie

BT : population Bactérienne totale aérobie

KF : gélose Kenner Fecal

LF : Légumes Fermentés

MRSA : gélose de Man, Rogosa, Sharpe

OGAc : Oxytétracycline Glucose Agar au Chloramphénicol

TSAn-NaCl : Tryptone Soja Agar 4% NaCl + natamycine

TSN : gélose Tryptone Sulfite Néomycine

UFC : Unité Formant Colonie

VRBG[2] : gélose biliée glucosée au cristal violet et rouge neutre

YPMAnp : Yeast extract-Peptone-Mannitol Agar + natamycine + pénicilline

[1] De l'anglais Brain-Heart Infusion with Yeast Extract Agar
[2] De l'anglais Violet Red Red Bile Glucose

I. Introduction générale

La lactofermentation est un processus de conservation très répandu dans le domaine alimentaire. Il s'agit tout d'abord d'un procédé de conservation des aliments, mais également de transformation permettant d'obtenir de nouvelles propriétés organoleptiques. De nombreux aliments peuvent être fermentés, et nombreux sont ceux qui tiennent une place culturelle majeure. En ce qui concerne les légumes lactofermentés, ils sont largement consommés dans certaines cultures, mais ne sont pas toujours bien connus en Europe de l'Ouest. Des légumes fermentés (LF) y sont pourtant consommés, telles que la choucroute, plat traditionnel alsacien à base de chou fermenté, ou encore les olives. On observe cependant aujourd'hui un regain d'intérêt pour ce mode de conservation et préparation, avec notamment la présence de nombreux blogs culinaires sur ce sujet, dont le blog Ni Cru Ni Cuit, ainsi que la création de groupe sur des réseaux sociaux. Des festivals et sommets sont également organisés sur ce sujet. C'est le cas notamment du Sommet sur les fermentations, qui s'est déroulé en ligne du 13 au 22 mars 2020 et qui a été suivi par près de 11000 personnes. Les LF ont la réputation d'être bénéfiques pour la santé, notamment de par l'impact sur le microbiote intestinal, ce qui explique, avec l'apport organoleptique et la longue conservation, cet intérêt grandissant pour ces aliments et qui s'inscrit dans une volonté générale d'accorder plus d'attention à l'alimentation. De plus, il s'agit d'un procédé relativement simple et peu couteux à faire soi-même. En effet, une fermentation lactique spontanée de légumes, c'est-à-dire sans ajout de levain, se réalise en ajoutant à ces légumes du sel, de manière directe ou sous forme de saumure, et de les placer dans un récipient fermé hermétiquement de manière à obtenir une anaérobiose, permettant à la fermentation de s'y dérouler. Au cours de celle-ci, des communautés de bactéries lactiques (BL) vont fermenter les sucres présents et produire notamment de l'acide lactique, qui va entrainer une chute du pH. C'est cette chute du pH, combinée à la présence de sel, qui va garantir la conservation de l'aliment, en inhibant le développement des communautés de micro-organismes pathogènes ou d'altération.

La fermentation des légumes n'a pas été très étudié, bien que sa réalisation soit simple et son utilité grande. Les quelques études scientifiques concernant ces produits sont souvent ciblées sur un petit nombre de légumes, tels que la choucroute, les olives ou encore des plats traditionnels d'Asie ou d'Afrique. De plus, ces études portent sur la caractérisation microbiologique d'échantillons conçus en laboratoire ou de produits commerciaux, alors que les LF sont souvent produits par les consommateurs eux-mêmes. Cette production à titre personnel induit une certaine diversité dans les procédés de fabrication, qui pourrait être associée notamment à une diversité microbiologique plus riche que celle décrite dans la littérature actuellement. Le projet participatif FLEGME (Fermentation des LEGuMEs), financé par les régions Pays de la Loire et Bretagne, vise à obtenir une vision globale de la fermentation des légumes en France. Cette vision globale sera obtenue par le biais de la création d'un grand réseau d'acteurs diversifiés, tels que des instituts de recherche, des entreprises, des citoyens, des cuisiniers ou encore des journalistes, et a pour vocation d'être

partagée pour participer au développement de cette pratique. Elle consistera en un apport de connaissances sur notamment la composition nutritionnelle et microbiologique de ces produits permettant d'en exposer les potentiels bienfaits sur la santé mais également d'en évaluer les risques sanitaires. Des connaissances sur la diversité des procédés de fabrication seront également apportées par ce projet, permettant tout d'abord de lier ces procédés aux différents bienfaits ou risques qui pourront être observés. Enfin, le côté participatif de ce projet permettra de diffuser ces résultats à un large public, grâce à l'intervention de métiers permettant la valorisation de la fermentation des légumes. Ainsi, dans le cadre du premier module de ce projet, mené par l'INRAE, une communauté de citoyens appelés dans cette étude Fermenteurs a été constituée. Elle regroupe 274 personnes volontaires pratiquant la fermentation de légumes, à titre personnel ou professionnel, et/ou désireuses d'en savoir plus sur cette pratique et de participer à son développement. L'apport de cette communauté au projet FLEGME s'effectue par la fourniture d'échantillons de LF et également par leurs réponses à différents questionnaires visant à décrire leurs pratiques de fermentation, de manière spécifique pour les échantillons fournis mais également de manière plus générale. Le second module a pour objectif de caractériser les différentes populations de micro-organismes dits positives, pathogènes et d'altération présentes dans ces échantillons, par le biais d'approches culture-dépendante et culture-indépendante.

Ce stage s'inscrit dans le cadre des deux premiers modules ce projet participatif, et a pour objectifs d'observer l'impact que peuvent avoir le type de légume, le procédé de fermentation, et l'acidité du pH sur les caractéristiques microbiologiques du produit final, puis d'observer l'impact que peuvent avoir ces caractéristiques microbiologiques sur le pH. Pour ce faire, les différentes populations de micro-organismes présentes dans les échantillons de LF fournis par la communauté de Fermenteurs seront caractérisées par approche culture-dépendante. Les réponses aux différents questionnaires seront analysées et des liens seront faits entre l'ensemble des données microbiologiques, valeurs de pH et résultats des questionnaires, permettant donc d'observer quels sont les paramètres impactant majoritairement les caractéristiques microbiologiques du produit final.

II. Introduction bibliographique

2.1. Les légumes fermentés

2.2.1. Contexte historique des produits fermentés

La fermentation lactique est un processus que l'être humain utilise depuis maintenant plusieurs siècles. En effet, les premières traces d'aliments fermentés remontent à l'Antiquité, époque durant laquelle les moyens de conservation des aliments n'étaient pas aussi développés qu'aujourd'hui. De nombreux types d'aliments peuvent être fermentés, tels que les aliments d'origine animale (lait, viande, poisson) et végétale, avec les fruits, céréales, légumineuses et légumes.

En ce qui concerne les LF, les premières fermentations de concombres et cornichons (*Cucumis sativus*) sont estimées être apparues en 2000 avant J-C, au Moyen-Orient (1). La fermentation du chou, ingrédient principal le plus commun du plat traditionnel coréen kimchi, serait quant à elle apparue durant la période de l'Age de la Poterie Primitive (entre 8 000 et 3000 avant J-C) en Asie (1). En ce qui concerne l'Europe de l'Ouest, les premières descriptions de fermentation de légumes se limitent principalement au chou, avec la choucroute, en 1607 (2). Il se pourrait cependant que ce plat ait été importé de l'Asie au cours du 13ème siècle (1, 2). De nos jours, les LF sont principalement consommés dans les pays asiatiques, avec le kimchi et les nombreuses variations de paocai, et en Europe de l'Est, avec notamment le bortsch et la zupa orgókowa (soupe à base de concombres fermentés). L'intérêt global pour ces produits a globalement diminué, notamment avec l'apparition de nouveaux moyens de conservation comme la congélation, et en Europe de l'Ouest, il se limite très largement à la consommation de choucroute. Ce n'est cependant plus tout à fait le cas ces dernières années, durant lesquelles un gain d'intérêt, en Europe et aux Etats-Unis notamment, a été observé pour les LF, ainsi que pour les aliments fermentés de manière plus générale et qui peut s'expliquer par les effets supposés bénéfiques sur la santé (3, 4).

2.1.1. Bénéfices et risques de la lactofermentation de légumes

Un des principaux intérêts des LF est la longue durée de conservation de ces produits. En effet, la plupart des légumes se dégradent relativement rapidement après leur récolte, ce qui est principalement dû au mécanisme naturel de sénescence ainsi qu'aux dommages causés lors de la récolte et transport, ces deux causes augmentant le risque d'infection par différents micro-organismes d'altération (5, 6). La transformation de ces aliments permet donc de les conserver plus longtemps. Cependant, les procédés de transformation peuvent avoir des impacts sur la composition nutritionnelle des légumes. Par exemple, il a été montré que les traitements thermiques induisent notamment une diminution de la teneur en vitamine C dans le chou rouge et le brocolis (7). Les LF peuvent posséder à l'inverse une teneur en vitamines supérieure aux légumes frais, due à la production de ces vitamines par les bactéries associées à la lactofermentation (8). Il a également été montré que le kimchi contenait une petite quantité de vitamine B12 (9), vitamine retrouvée généralement dans les produits d'origine animale et étant parfois source de carence pour les personnes suivant un régime végétarien. De plus, les LF présentent une bioaccessibilité importante de composés variés tels que les protéines, vitamines ou polyphénols grâce à la production d'enzymes, encore une fois par les micro-organismes associés à la fermentation (8).

L'ingestion de ces micro-organismes peut également avoir un impact positif sur le microbiote intestinal, qui va jouer sur le fonctionnement de l'appareil digestif, notamment en modulant l'expression de gènes impliqués dans l'absorption des nutriments, l'immunité et le maintien des fonctions de la barrière intestinale (10), de la même manière que l'ingestion de probiotiques.

Bien que de nombreux bienfaits sur la santé soient attribués à la consommation de LF, il est important de souligner que les effets bénéfiques liés à l'ingestion d'aliments fermentés chez l'humain ont été recherché dans peu d'étude et que ces effets bénéfiques sont donc supposés (4). En effet, la plupart des études concernent l'impact d'un micro-organisme spécifique ou d'un métabolite qu'il produit sur une culture de cellule humaine ou sur des animaux. Les études réalisées sur l'être humain et prenant en compte le produit global sont en effet très difficiles à mettre en place, les bénéfices observés pouvant résulter d'autres facteurs. Par exemple, les personnes consommant régulièrement des LF sont généralement des personnes accordant une attention particulière à leur alimentation et ayant un bon rythme de vie. Enfin, la majorité des études portant sur la consommation de produits fermentés concernent principalement les produits laitiers, et non les légumes.

La consommation de LF peut toutefois comporter des risques, avec notamment la présence potentielle de bactéries pathogènes. Ces bactéries peuvent persister dans les LF dans le cas où la fermentation se termine avec un pH qui reste suffisamment élevé. Il est à noter que bien que des micro-organismes pathogènes aient été détectés dans certains LF, très peu de cas d'infection ou d'intoxication liés aux LF ont été rapportés (11). Il existe cependant des cas de toxi-infection alimentaire collective, comme cela peut être le cas pour tous les produits alimentaires, comme des épidémies de gastroentérite dans des écoles de Corée du Sud en 2103 et 2014, causées par la consommation de kimchi contaminé par une souche d'*Escherichia coli* entérotoxique (12). Certains micro-organismes peuvent également produire des amines biogènes au cours de la fermentation. Ces composés peuvent être néfastes pour l'humain, avec notamment l'histamine pouvant causer une intolérance chez certaines personnes prédisposées (11, 13).

2.1. La lactofermentation

2.2.1. Paramètres majeurs de la lactofermentation

Il existe différents paramètres pouvant avoir un impact majeur lors du processus de fermentation. Ces différents paramètres vont pour la plupart simultanément favoriser la croissance des BL et inhiber le développement d'autres micro-organismes, notamment pathogènes et d'altération.

La fermentation lactique étant un processus anaérobie, l'absence d'oxygène est un paramètre important dans la lactofermentation. Généralement, la préparation est tassée dans un contenant fermé, limitant ou empêchant l'apport d'oxygène. L'oxygène présent dans le contenant lors de sa fermeture va être rapidement consommé par les différents micro-organismes présents, et conduit à la production de CO_2 par certains d'entre eux. Tous ces facteurs vont donc participer à la formation d'une atmosphère anaérobie. Cette anaérobie progressive va empêcher la croissance des bactéries aérobies strictes et favoriser les bactéries anaérobies, dont les BL, ce qui va avoir un impact sur un autre paramètre important : le pH. En effet, la production d'acides par les BL va entrainer une

diminution progressive du pH, favorisant donc les micro-organismes pouvant se développer à pH acide.

La teneur en NaCl est également un paramètre important pour le processus de lactofermentation. De nombreuses BL sont en effet tolérantes au sel, à des concentrations allant de 2% à 8% (14). De manière similaire à l'absence d'oxygène, la concentration en sel permet de favoriser le développement des BL halotolérantes et d'inhiber celui des microorganismes non tolérants au sel, bien que le pH acide qui soit la cause majeure d'inhibition de ces micro-organismes (15).

La température joue également un rôle lors de la lactofermentation. Le processus de fermentation est généralement effectué à température ambiante, soit entre 15°C et 25°C. Les BL peuvent donc s'y développer, puisque la plupart d'entre elles se développent principalement à une température autour de 30°C. La température peut impacter les genres de BL retrouvés : une étude de la fermentation du suncai à différentes températures a montré qu'à 10°C et 15°C, le genre le plus abondamment retrouvé est *Leuconostoc* tandis que ce sont les genres *Weissella* et *Lactococcus* à 20°C et 25°C (16). Par opposition à l'anaérobie, la teneur en sel et le pH, la température de fermentation ne favorise cependant pas principalement le développement des BL, puisque de nombreuses autres populations bactériennes peuvent se développer à ces températures.

2.2.2. Déroulement de la lactofermentation : exemple de la choucroute

Au cours de la lactofermentation, certaines BL associées naturellement au légume et celles introduites de manière intentionnelle ou non lors de la préparation vont proliférer du fait des conditions favorables et transformer les sucres du légume en acides tels que l'acide lactique, principalement, ou l'acide acétique. La chute du pH provoquée par cette production d'acides va inhiber la croissance des micro-organismes pathogènes ou d'altération, et favoriser de nouvelles espèces de BL. Il y a donc une succession de différentes populations de BL suivant la diminution du pH.

Un des LF le plus étudié est le chou, ingrédient principal de nombreux plats à base de LF comme la choucroute et le kimchi. Les étapes de la fermentation du chou sont donc bien décrites (15). Elle est ainsi divisée en quatre stades. Le premier est l'initiation de la fermentation, rendu possible par l'atmosphère anaérobie créée par le tassage du légume, expulsant l'air, et par la consommation de l'oxygène restant par les cellules végétales et celles des micro-organismes anaérobies facultatifs durant les 3 premiers jours. Le pH commence à baisser suite à la fermentation de sucres en acides organiques.

Le 2ème stade, d'une durée de 3 à 6 jours, est marqué par le développement de BL anaérobies facultatives, du fait de la baisse du pH, ainsi que de la forte salinité et de l'anaérobiose. On y retrouve particulièrement des bactéries du genre *Leuconostoc, L. mesenteroides* principalement, représentant jusqu'à 10^8 Unité Formant Colonie (UFC)/g. Cette espèce étant hétérofermentaire, il

va y avoir production de CO_2 et d'acides lactique et acétique, conduisant respectivement à une augmentation de l'anaérobiose et une chute du pH, avec un taux d'acide lactique de l'ordre de 1%. D'autres BL hétérofermentaires ayant une plus grande tolérance au pH acide vont ensuite se développer en même temps que la population des *Leuconostoc* chute.

Les bactéries homofermentaires sont retrouvées majoritairement au cours du 3ème stade. Il s'agit principalement d'espèces de *Lactobacillus* telles que *L. plantarum*[3]. A ce stade, la concentration en BL dans le produit peut atteindre jusqu'à 10^9 UFC/g. Le pH continue de diminuer, jusqu'à atteindre environ 3,8 à 4,1 à cause d'un taux d'acide lactique aux alentours de 2%. C'est généralement à ce stade que le produit peut éventuellement être pasteurisé bien que ce ne soit pas systématique.

Le 4ème stade est atteint dans le cas des choucroutes non pasteurisées, où la fermentation continue de se dérouler jusqu'à la consommation. On y retrouve des BL hétérofermentaires capables de fermenter les pentoses, comme *L. brevis*[3]. On retrouve une quantité d'acide lactique de 2,5%, contribuant à diminuer le pH jusqu'à 3,4.

2.2. Les bactéries lactiques

2.3.1. Généralités

Les BL forment un groupe de bactéries se caractérisant par la capacité à fermenter des glucides, tel que le glucose, le sucrose ou le fructose, en acide lactique. Il s'agit de bactéries Gram-positif, en forme de coque ou de bacille, ne formant pas de spores. Elles sont anaérobies et pour la plupart aérotolérantes. Cette tolérance à l'oxygène est médiée par des superoxyde dismutase pour certaines BL ou parfois par l'accumulation de métaux, tel que le manganèse, permettant de piéger les espèces réactives de l'oxygène (17). Les BL sont en principe dépourvues d'activité catalase, ce qui s'explique par l'absence de production de porphyrine, le constituant des hèmes présents dans la catalase. L'absence d'hème chez les BL expliquent également pourquoi elles ne sont pas capables de pratiquer la respiration aérobie, bien que possédant les autres gènes nécessaires, dans un milieu non complémenté en hème. Il a été démontré que dans un milieu supplémenté en hème, certaines BL peuvent passer du mécanisme de fermentation à celui de la respiration aérobie, avec génération d'une force proton-motrice au sein d'une chaine respiratoire (18).

De nombreuses espèces de BL peuvent se développer dans des conditions dites extrêmes (pH faible ou élevé, forte salinité, faible ou forte température, forte concentration en éthanol, etc..) (14). Ainsi, les BL sont retrouvées dans une grande variété d'habitats, tels que le sol, l'eau et notamment associées aux aliments fermentés et non fermentés ainsi qu'aux appareils digestifs des vertébrés et

[3] La nouvelle dénomination de ces organismes sont *Lactiplantibacillus plantarum* et *Levilactobacillus brevis*

invertébrés. La plupart des espèces de BL sont considérées comme non pathogènes, bien qu'il existe au sein de ce groupe quelques espèces pathogènes, telles que certains streptocoques (*S. pneumoniae, S. pyogenes* et *S. agalactiae*) et entérocoques (*E. faecalis* et *E faecium*).

2.3.2. Classification

Les BL appartiennent à l'ordre des *Lactobacillales*, du phylum des *Firmicutes*. Cet ordre contient actuellement plus de 500 espèces[4] regroupées en 6 familles et 44 genres (Tableau 1)

Tableau 1. Classification des bactéries lactiques au niveau des familles et des genres

Famille	Genres	Nombre d'espèces validées[5]	Famille	Genres	Nombre d'espèces validées[5]
Lactobacillaceae	*Lactobacillus*	239	*Streptococcaceae*	*Streptococcus*	105
	Pediococcus	11		*Lactococcus*	17
	Sharpea	1		*Floricoccus*	2
Leuconostocaceae	*Weissella*	21		*Lactovum*	1
	Leuconostoc	15	*Carnobacteriaceae*	*Carnobacterium*	12
	Fructobacillus	5		*Alkalibacterium*	10
	Oenococcus	3		*Trichococcus*	9
	Conviva	1		*Jeogalibaca*	3
Aerococcaceae	*Aerococcus*	8		*Marinilactibacillus*	2
	Facklamia	6		*Agitococcus*	1
	Globicatella	2		*Allofustis*	1
	Abiotrophia	1		*Alloiococcus*	1
	Dolosicoccus	1		*Atopobacter*	1
	Eremococcus	1		*Atopococcus*	1
	Ignavigranum	1		*Atopostipes*	1
	Suicoccocus	1		*Desemzia*	1
Enterococcaceae	*Enterococcus*	59		*Dolosigranulum*	1
	Vagococcus	15		*Granulicatella*	3
	Tetragenococcus	8		*Isobaculum*	1
	Bavariicoccus	1		*Lacticigenium*	1
	Catellicoccus	1		*Pisciglobus*	1
	Melissococcus	1			

Classification obtenue d'après le site List of Prokaryotic names with Standings in Nomenclature, consulté le 06/05/2020

Récemment, une réattribution taxonomique concernant les familles *Lactobacillaceae* et *Leuconostocaceae* a été proposée, avec une fusion de ces deux familles en une seule famille, celle des *Lactobacillaceae* (19). De plus, le genre *Lactobacillus* a été subdivisé en 25 genres : *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacilus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioa*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus,* *Limosilactobacillus*,

[4] 590 d'après le site Encyclopedia Of Life

[5] Nombre d'espèces ayant un statut taxonomique validé et un nom correct non synonyme, d'après le site List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Les sous-espèces n'ont pas été incluses.

Fructilactobacillus, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* et *Lentilactobacillus*. Du fait du caractère récent de cette réattribution, l'ancienne taxonomie sera utilisée dans cette étude pour parler des bactéries lactiques.

D'autres taxons bactériens sont parfois assimilés, à tort, aux BL, C'est notamment le cas des espèces appartenant au genre *Bifidobacterium*. Ce genre appartient à l'ordre des *Bifidobacteriales* du phylum des *Actinobacteria*. Ce genre est constitué de 75 espèces de bactéries en forme de batônnets, Gram-positives et anaérobies, avec quelques espèces aérotolérantes (20).

2.3.3. Fermentation homofermentaire et hétérofermentaire

Il existe deux voies possibles de fermentation chez les BL : les voies homofermentaire et hétérofermentaire, décrites dans la figure 1.

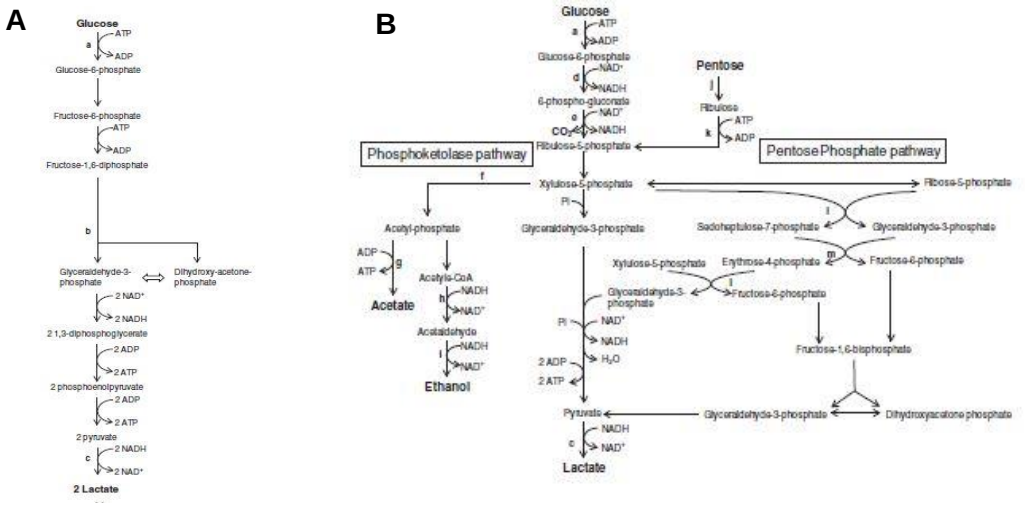


Figure 1. Réactions de la voie homofermentaire (A) et hétérofermentaire (B) chez les bactéries lactiques (21).

Les bactéries homolactiques, utilisant la voie homofermentaire, pratiquent la glycolyse pour fermenter une molécule de glucose en deux molécules d'acide lactique. Pour cela, la cascade de réactions va aboutir à la formation de pyruvate, avec une étape nécessitant la réduction du NAD en NADH. La dernière réaction de la voie homofermentaire est celle catalysée par la lactate déshydrogénase, permettant la formation d'acide lactique à partir de pyruvate, en réoxydant le NADH (21). Pour les bactéries hétérolactiques, ce sont des voies différentes qui entrent en jeu : la voie phosphoketolase et celle des pentoses phosphates. La fermentation hétérofermentaire va aboutir à la formation d'une molécule d'acide lactique, de CO_2 et d'éthanol (ou acétate). L'acide lactique est ici aussi synthétisé par la lactate déshydrogénase à partir de pyruvate. Cependant, des molécules de NADH nécessaires à cette réaction vont cette fois-ci être réoxydées par les réactions effectuées par l'acétaldéhyde déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase de la voie phosphoketolase, permettant la formation d'acétaldéhyde puis d'éthanol. Il y aura donc un partage du NADH entre ces différentes voies, aboutissant à une production de produits hétérogènes pour un même substrat (21).

2.4. Caractérisation des populations microbiennes des légumes fermentés

2.4.1. Approche culture-dépendante

La caractérisation des différentes populations microbiennes peut se faire via l'utilisation de méthodes culture-dépendantes, c'est-à-dire nécessitant une étape de culture sur différents milieux. Il faut donc avoir une idée *a priori* des communautés présentes dans le produit testé pour pouvoir utiliser les milieux les plus adaptés. Différents types de milieux de culture existent, tels que les milieux sélectifs, électifs et différentiels. Les milieux sélectifs vont contenir des composés inhibant la majorité des micro-organismes sans inhiber la croissance du groupe de micro-organismes recherchés (22). Les milieux électifs vont quant à eux favoriser la croissance des micro-organismes recherchés de manière à ce qu'ils supplantent compétitivement les autres micro-organismes (22). Enfin, un milieu de culture différentiel permet de différentier différents groupes de micro-organismes sur la base de caractéristiques biologiques (22). A la composition du milieu de culture vont s'ajouter d'autres paramètres pour les cultures, tels que la température d'incubation et l'atmosphère aérobie ou anaérobie, toujours pour dans le but de favoriser le développement de la population recherchée.

Cette approche permet d'obtenir relativement rapidement une donnée quantitative sur une population de micro-organismes et est généralement peu couteuse. Elles ne permettent cependant de n'observer et quantifier uniquement les cellules viables et cultivables (23). De plus, ces méthodes peuvent être fastidieuses à réaliser lorsqu'un grand nombre de milieux est requis et/ou qu'un grand nombre d'échantillons est à tester, bien qu'il existe aujourd'hui des outils permettant d'y pallier, tel que des ensemenceurs automatiques ou des compteurs automatiques de colonies. Enfin, l'identification formelle des colonies s'étant développées sur un milieu n'est pas possible sans passer par une étape supplémentaire de test d'identification. Cette étape d'identification n'est cependant pas systématique, les bactéries s'étant développées étant dans ce cas qualifiées de « présumées ».

En ce qui concerne les LF, le groupe de micro-organismes le plus recherché dans la littérature est celui des BL, que ce soit pour effectuer leur dénombrement ou identifier des isolats de BL présomptives. Les BL sont classiquement recherchées sur le milieu de Man, Rogosa, Sharpe (MRSA) (24) incubé en anaérobiose et à une température entre 20°C et 30°C pendant 2 à 7 jours. Les études ayant réalisées une identification des isolats obtenus sur MRS ont permis de montrer qu'ils correspondant très majoritairement au genre *Lactobacillus* (25), ainsi qu'aux genres *Leuconostoc* (26), *Pediococcus*, *Weissella*, et *Enterococcus* (27).

2.4.2. Approches culture-indépendantes

Les approches culture-indépendantes permettent de caractériser les différentes populations de micro-organismes présentes dans un échantillon sans passer par une étape de culture. Elles consistent généralement en une étape d'extraction de l'ADN présent dans un échantillon puis à un séquençage de celui-ci, précédée ou non d'une étape d'amplification d'une région précise de l'ADN.

C’est le cas des approches métagénomiques, dont il existe deux grands types, shotgun et amplicon (ou ciblée). Cette dernière consiste à séquencer un gène marqueur, après une étape d’amplification par PCR de ce gène. L’un des gènes marqueurs les plus utilisés pour l’identification bactérienne est le gène de l’ARN 16S. Ce gène contient des régions conservées ainsi que des régions variables, notés V1 à V9. En général, l’amplification et le séquençage de ce gène se fait sur une fraction et non sur la totalité du gène. Il existe donc plusieurs régions qui peuvent être amplifiées et séquencées. En ce qui concerne les études métagénomiques des communautés bactériennes des LF, la région V3-V4 est utilisée dans un grand nombre d’études (28–30) et est considérée comme la région permettant d’obtenir la meilleure représentation de la diversité bactérienne (31).

Les méthodes culture-indépendantes permettent d’identifier directement des taxons à des résolutions variables généralement jusqu’au niveau du genre ou au mieux de l’espèce, la résolution correspondant au niveau taxonomique que permet d’obtenir le séquençage de la région choisie. A la différence des méthodes culturales, l’approche métagénomique ne rend pas compte de la composition en micro-organismes vivants de l’échantillon au moment de l’analyse, mais va fournir des indications sur tous les micro-organismes qui ont été ou sont présents dans l’échantillon, ce qui peut donc rendre cette approche complémentaire des approches culturales. La métagénomique permet donc d’obtenir une quantité importante de données, notamment taxonomiques, de manière relativement simple. Ces méthodes ont cependant aussi des inconvénients : le traitement des données de séquençage peut être long et fastidieux, elles sont couteuses et elles introduisent de nombreux biais, à différentes étapes de l’analyse. Pour citer quelques biais parmi les plus importants, il existe tout d’abord un biais à l’étape d’extraction de l’ADN, puisque les différentes méthodes d’extraction ne vont pas extraire l’ADN de manière équivalente de toutes les espèces bactériennes (32). Un biais est également introduit lors de l’étape d’amplification puisqu’aucune amorces ne se fixent avec la même affinité sur les génomes (33). Enfin, les différentes technologies de séquençage possèdent des taux d’erreurs variables, ce qui peut introduire encore une fois un biais dans l’identification des communautés bactériennes.

Le fait de travailler à partir d’une matrice végétale comme c’est le cas pour les LF implique la présence d’ADN de végétaux et notamment des chloroplastes. L’ADN chloroplastique contient, comme celui des bactéries, le gène de l’ADNr 16S (34). Ainsi, l’utilisation des amorces amplifiant la région V3-V4 amplifie aussi bien que l’ADNr 16S des bactéries et des chloroplastes, introduisant donc parfois des biais importants au cours de l’étape d’amplification (31, 35). Pour pallier cela, des amorces spécifiques de l’ADNr 16S bactériens ont été développées (36). Ces amorces amplifient la région V5-V7 et profitent d’une différence de séquence sur deux nucléotides entre l’ADNr 16S bactérien et chloroplastique, permettant donc de supprimer le biais causé par l’amplification de l’ADN chloroplastique (31, 34). Cependant, la résolution, qu’apporte le séquençage de la région V5-V7 est plus faible que celui de la région V3-V4 et le choix final est un compromis entre une meilleure sélectivité vis-à-vis de ADN chloroplastique et une résolution plus faible des amorces V5-V7.

2.4.3. Etat de l'art concernant les communautés microbiennes des légumes fermentés

Les études caractérisant les différentes communautés bactériennes des LF concernent pour la grande majorité des produits d'origine asiatique, tels que le kimchi et le paocai, deux plats à base de chou fermenté. Au niveau des produits consommés en Europe, on retrouve la choucroute, les concombres/cornichons et les olives, bien qu'au sein du projet FLEGME, les olives n'aient pas été retenues comme étant un légume. Tamang et ses collaborateurs ont dressé dans une revue sur la diversité des micro-organismes des produits fermentés une liste des micro-organismes isolés de différents LF, majoritairement d'origine asiatique (37). Bien que les espèces puissent varier en fonction du produit étudié, on retrouve majoritairement des espèces appartenant selon l'ancienne nomenclature au genre *Lactobacillus*, telles que *L. plantarum*, *L. brevis* ou encore *L. fermentum*[6], pour ne citer que les plus souvent retrouvées. On y retrouve également les genres *Leuconostoc*, notamment *L. mesenteroides*, *Pediococcus*, *Weissella* et *Enterococcus.* Des espèces plus atypiques ont pu être isolées, comme certaines de *Bacillus* (*B. circulans, B. firmus* ou encore *B. subtilis*) ainsi que des levures, appartenant principalement aux genres *Candida* et *Saccharomyces.* Bien que très informatives sur les espèces retrouvées dans un grand nombre de produits, cette revue se concentre néanmoins sur les produits asiatiques, et ne décrit pas les communautés retrouvées dans certains produits d'Europe, de l'Est notamment.

Un des objectifs du projet FLEGME étant de caractériser les communautés bactériennes des LF via une approche culture-indépendante, une synthèse non exhaustive des publications des 10 dernières années caractérisant les populations de micro-organismes dans les LF avec cette approche a été effectuée et est présentée dans le tableau 2. Le légume le plus retrouvé dans ces publications est le chou, étudié seul ou en mélange. Nous pouvons y retrouver les mêmes genres que ceux précédemment cités (37), avec, selon l'ancienne classification, le genre *Lactobacillus* dominant dans un grand nombre de produits. Les approches culture-indépendantes permettant d'identifier les espèces ou genres bactériens étant ou qui ont été présents dans un échantillon donné, certains genres identifiés grâce à ces approches ne figurent pas dans la liste des espèces bactériennes isolées de LF décrite précédemment. Ces genres appartiennent principalement au phylum des *Proteobacteria,* tels Serratia, Enterobacter ou encore Halomonas. Ces espèces étaient donc probablement présentes dans le microbiote initial du légume avant fermentation.

[6] Les nouvelles dénominations taxonomiques pour ces espèces sont respectivement *Lactiplantibacillus plantarum, Levilactobacillus brevis* et *Limosilactobacillus.*

Tableau 2. Principaux genres bactériens identifiés dans les légumes fermentés au travers d'analyses métagénomiques ciblés publiées principalement ces 10 dernières années.

		Nombre de produits le genre ou espèce est identifiée						
		Selon l'abondance relative de l'espèce			Selon le type de légumes			Total
Phylum	Genre	> 50%	10% à 50%	1% à 10%	Chou seul (n=10)	Chou en mélange (n=10)	Autres (n=12)	(n=32)
Firmicutes	*Lactobacillus*	14	11	3	10	10	8	28
	Lactococcus	1	3	8	8	2	2	12
	Weissella	4	2	4	3	4	3	10
	Leuconostoc	1	4	5	5	2	3	10
	Pediococcus	0	2	7	4	4	1	9
	Staphylococcus	0	1	2	1	0	1	3
	Streptococcus	0	0	3	1	1	1	3
Proteobacteria	*Pseudomonas*	1	2	6	4	2	3	9
	Serratia	0	2	7	7	2	0	9
	Enterobacter	0	2	4	5	1	0	6
	Halomonas	0	1	3	1	1	2	4
	Erwinia	0	0	4	4	0	0	4
	Pantoea	0	2	1	1	1	1	3
	Citrobacter	0	1	2	1	1	1	3
	Pectobacterium	0	1	2	2	0	1	3

Le nombre total de produits analysés dans les 21 publications retenues est de 32. Le nombre de produits correspondant aux types de légumes sont indiqués entre parenthèses sous le type de légumes. Seuls les genres retrouvés dans 3 produits ou plus sont listés dans ce tableau. (25, 29, 30, 35, 38–52)

III. Matériel et méthodes

3.1. Echantillonnage

18 échantillons de LF provenant de l'ensemble du territoire Français ont été fournis par la communauté de Fermenteurs FLEGME par voie postale. Les échantillons ont été transmis dans leur contenant d'origine. Après réception, les échantillons ont été placés en chambre froide à 4°C avant analyse. Les échantillons ont été codés par l'identifiant unique de son producteur dans la base de données interne dédiée au projet FLEGME, allant de 001 à 274.

3.2. Caractérisation des différentes populations de micro-organismes

3.3.1. Préparation des échantillons et mesure du pH

Chaque échantillon a été transféré stérilement dans un contenant stérile et homogénéisé à l'aide d'ustensiles de cuisine stériles (fourchettes, cuillères). Une fraction de l'échantillon a été prélevé pour mesurer le pH. 10 g d'échantillon et 90 mL d'eau physiologique chauffée à 48°C ont été introduits dans un sac à filtre stérile, puis homogénéisés pendant 2 min au Stomacher. Le filtrat obtenu, correspondant à la dilution 10^{-1}, a ensuite été transféré dans une bouteille en verre stérile. Des dilutions en cascade dans de l'eau tryptonée ont été réalisées jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-6}. Afin de rechercher les formes bactériennes sporulées, 10 mL de la dilution 10^{-1} ont été

transférés dans un tube en verre stérile de 10 mL et placés à 70°C pendant 15min de manière à détruite les cellules végétatives. Cette dilution 10^{-1} chauffée a ensuite été diluée en cascade jusqu'à 10^{-3} de la même manière que la dilution 10^{-1} non chauffée.

10 mL de la dilution 10^{-1} ont été centrifugés à 18000g pendant 15 min de manière à obtenir un culot de cellules bactériennes. Le surnageant a ensuite été éliminé et les culots de cellules bactériennes restants ont été placés à - 20°C avant d'extraire l'ADN dans le but de réaliser une future analyse métagénomique amplicon 16S. Enfin, environ 150 g de chaque échantillon ont été conservés pour être transmis au laboratoire réalisant les recherches de pathogènes (Labocéa, Fougères). Le reste des échantillons a été congelé à -20°C.

3.3.2. Dénombrements des différentes populations de micro-organismes et recherche de pathogènes

Afin de caractériser les différentes populations de micro-organismes présents dans les LF, les différentes dilutions obtenues comme décrit précédemment ont été étalées sur différents milieux de culture. La liste des milieux de culture utilisés ainsi que les populations recherchées et conditions appliquées correspondantes sont décrites dans le tableau 3. Pour les milieux MRSA, BHI-YEAn, BHI-YEAnp, TSAn-NaCl, OGAc et YPMAnp, 0,1 mL des dilutions non chauffées 10^{-1} à 10^{-6} des échantillons ont été déposées. La température d'incubation pour ces milieux était de 25°C, température proche des températures de fermentation des échantillons. Afin de pouvoir dénombrer les micro-organismes à croissance lente à cette température, l'incubation de ces milieux a été prolongée à 7 jours. L'ajout de natamycine a été ajouté dans certains milieux pour d'inhiber la croissance des levures et moisissures. L'ajout de pénicilline dans les milieux YPMAnp et BHI-YEAnp a pour but d'inhiber la croissance des bactéries gram-positif (53), attendues comme étant principalement composés de BL. 0,1 mL des dilutions 10^{-1} à 10^{-3} non chauffées ont été déposées sur les milieux KF, en duplicat. 1 mL des dilutions 10^{-1} à 10^{-3} ont été inoculés dans la masse pour le milieu VRBG. Enfin, 0,1 mL des dilutions chauffées à 70°C 10^{-1} et 10^{-3} ont été déposés sur les milieux BHI-YEA et TSN, en duplicat.

La population principale attendue étant les BL, le milieu MRSA a été utilisé car étant l'un des milieux le plus utilisé pour rechercher les BL dans les produits alimentaires. Les populations bactériennes aérobies totale (PBT), Gram-négatif (PBGN) ont été recherchées sur des milieux à base d'infusion cœur-cervelle, de manière d'estimer la proportion de BL parmi la population bactérienne totale. Du sel étant ajouté lors de la préparation des LF, la population bactérienne halophile (BH) a été recherchée sur le milieu TSAn-NaCl. Bien que n'étant pas des populations attendues dans les produits fermentés car ayant besoin d'oxygène pour se développer, les levures/moisissures et les bactéries acétiques ont été recherchées respectivement sur les milieux OGAc et YPMAnp. En effet, ces organismes sont susceptibles de se développer dans les régions exposées à l'oxygène, comme la surface des légumes, et peuvent altérer le produit, comme cela a été montré pour les BA (42).

Tableau 3. Liste des milieux utilisés, des conditions appliquées et des populations de micro-organismes recherchées correspondantes

Milieu	Population recherchée	Conditions
Gélose de Man, Rogosa, Sharpe (MRSA)	Bactéries lactiques (BL)	25°C en anaérobie 7 jours
Gélose cœur-cervelle enrichie en extrait de levure + natamycine (BHI-YEAn)	Population bactérienne totale aérobie (BT)	25°C en aérobie 7 jours
Gélose cœur-cervelle enrichie en extrait de levure + natamycine (BHI-YEAnp)	Population bactérienne Gram-négatif aérobie (BGN)	25°C en aérobie 7 jours
Tryptone Soja Agar 4% NaCl + natamycine (TSAn-NaCl)	Population bactérienne totale halophile (BH)	25°C en aérobie 7 jours
Gélose Oxytétracycline Glucose Agar au chloramphénicol (OGAc)	*Fungi* (levures et moisissures)	25°C en aérobie 7 jours
Yeast Extract, Peptone, Mannitol Agar + pénicilline + natamycine (YPMAnp)	Bactéries acétiques (BA)	25°C en aérobie 7 jours
Gélose cœur-cervelle enrichie en extrait de levure (BHI-YEA)	Population bactérienne sporulée aérobie (PBSpo)	37°C en aérobie 2 jours
Tryptone Sulfite Néomycine Agar (TSN)	Bactéries sporulées anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridium*)	37°C en anaérobie 2 à 5 jours
Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBG)	*Enterobacteriacea*	37°C en aérobie 24h
Kenner Fecal (KF)	*Enterococcus*	37°C en aérobie 48h
B. cereus Selective Agar base (BCA)	*Bacillus cereus*	30h en aérobie 24h à 48h

Enfin, différentes populations bactériennes pouvant contenir des pathogènes ont été recherchées : les entérobactéries, indicateur de contamination fécale, ont été recherchées sur le milieu sélectif VRBG. Les entérocoques, bien que pouvant se développer sur le milieu MRSA, ont été recherchés plus spécifiquement sur le milieu sélectif KF. Enfin, les bactéries sporulées sulfito-réductrices anaérobies, soit les *Clostridium* ont été recherchés sur TSN, tandis que B. cereus a été recherchés sur BCA. La population bactérienne sporulée aérobie (BSpo) a également été recherchée. D'autres pathogènes, que sont *E. coli,* les staphylocoques à coagulase positive tel que *S. aureus, Salmonella* et Listeria monocytogenes ont été recherchés par un laboratoire sous-traitant (Labocéa, Fougères) en suivant respectivement les normes ISO 16649-2, ISO 6888-2, BRD 07/11-12/05 et AES 10/03-09/00.

3.3. Recueil des pratiques de préparation des échantillons collectés

Pour connaitre au mieux le procédé utilisé pour la fabrication des échantillons de LF collectés pour analyse, les « Fermenteurs » ont été invités à répondre à un questionnaire en ligne, réalisé grâce à l'outil Framaform (Framasoft[7]). Ce questionnaire contenait 64 questions (34 à réponse libre et 30 à choix multiples), réparties en 8 catégories : Informations personnelles, Légumes utilisés, Recette utilisée, Préparation des légumes, Ingrédients utilisés, Fermentation, Conservation et Observations libres. Les réponses à ce questionnaire ont été exportées sous Excel (Microsoft, version 16.0.12827.20268) et concaténées avec les résultats de dénombrement.

Les échantillons provenant tous de Fermenteurs différents, les réponses aux différentes questions n'étaient pas homogènes et directement analysables. Elles ont donc été traitées sur certains aspects : les réponses issues des questions libres ont été homogénéisées, en créant des catégories ou passant les réponses quantitatives à une même unité. C'est le cas pour la quantité de sel ajoutée : le pourcentage de sel ajouté a été calculé sans modification dans le cas d'ajout sous forme de sel sec et en appliquant un facteur de 0,3 dans le cas d'ajout par le biais d'une saumure. Ce facteur a été choisi d'après les recettes de certains livres, où la quantité de sel ajouté par une saumure était généralement 3 fois supérieure à celle ajouté en sec. Les réponses identiques entre différentes questions ont été différenciées pour permettre une meilleure discrimination des questions lors des analyses et certaines variables regroupant les réponses à plusieurs questions ont été créées.

Ces questions portaient donc sur des aspects très divers de la fabrication, seules les réponses aux questions portant sur des aspects susceptibles d'impacter la composition microbiologique ont été conservées dans le but d'établir des liens entre la nature du légume, le procédé de fabrication et la composition microbiologique ainsi que le pH des échantillons. Il était difficile d'homogénéiser certains paramètres en raison, comme les durées de fermentation et de conservation, qui était parfois identiques et égales à l'âge de l'échantillon. Ces paramètres n'ont donc pas été analysés. Afin de faciliter leur identification, les échantillons ont été identifiés sous la forme suivant : Chou_000 ou CaroM000, les quatre premières lettres indiquant l'ingrédient principal de l'échantillon, et les 3 derniers chiffres le numéro identifiant du producteur. La présence ou l'absence du M (Mélange) entre le nom du légume principal et le numéro identifiant indique respectivement que d'autres légumes que le légume principal était présent ou s'il n'y avait qu'un seul type de légume.

3.4- Analyses statistiques

Les analyses ont été effectuées sous R studio (version 1.2.5033). Une analyse des correspondances multiples (ACM) a été réalisée à l'aide du package FactoMineR avec 6 variables actives et 12 variables supplémentaires pour les 19 échantillons. Ces variables actives étaient les résultats de dénombrement en $\log_{10}$(UFC/mL) des milieux MRSA, BHI-YEAn, TSAn NaCl, BHI-YEAnp, OGAc et

[7] Site web Framasoft : https://framasoft.org/fr/

YPMAnp. Ces variables étant des variables quantitatives, elles ont été divisées en plusieurs modalités, de manière à les transformer en variables qualitatives. Les différents groupes obtenus étaient homogènes en nombre d'individus. Les valeurs de dénombrement sur MRSA, BHI-YEAn, TSAn NaCl et BHI-YEnp ont été divisés en 3 modalités, de manière à obtenir des groupes d'échantillons avec une abondance bactérienne faible, moyenne et forte. Les 2 autres variables ont été divisées en 2 modalités, correspondant à la présence ou à l'absence de colonies sur les milieux OGAc et YPMAnp. Les 12 variables supplémentaires étaient l'âge de l'échantillon, le pH, la catégorie de légume, le lavage des mains, le lavage des légumes, l'épluchage des légumes, utilisation des mains ou de gants/ustensiles pour mélanger les ingrédients, la température et l'exposition à la lumière durant la fermentation, le débordement du produit lors de la fermentation et la température et l'exposition à la lumière durant la conservation. Les graphiques ont été obtenus avec le package Explor.

IV. Résultats et discussion

4.1. Recueil des pratiques de préparation des échantillons étudiés

Afin d'illustrer la variabilité des valeurs des paramètres quantitatifs que ce sont la quantité de sel ajoutée, les températures de fermentation et conservation ainsi que l'âge des échantillons, des diagrammes en boîtes ont été réalisés (Figure 2).

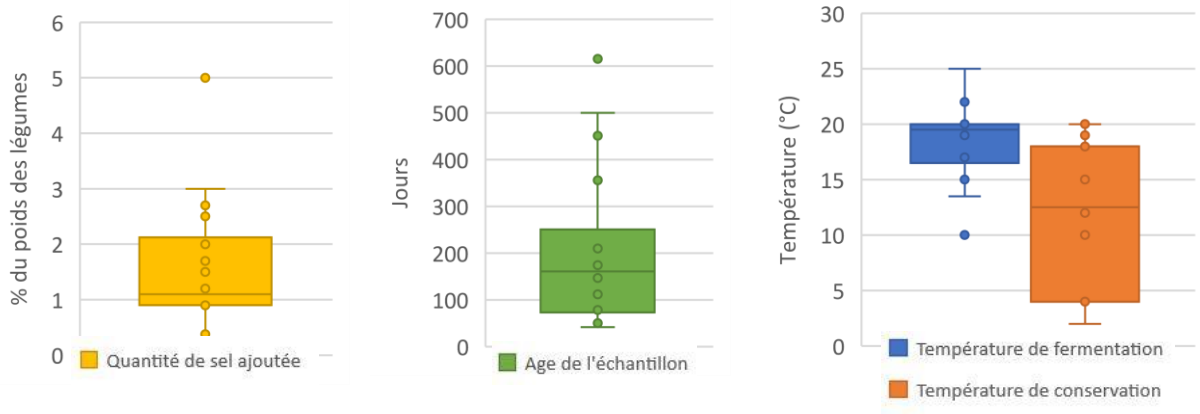


Figure 2. Diagrammes en boîte pour la quantité de sel ajouté, l'âge de l'échantillon et les températures de fermentation et conservation.

Pour la quantité de sel ajoutée, les valeurs étaient globalement similaires et s'échelonnaient entre 0,3% et 3% pour 17 des échantillons, tandis que pour le dernier échantillon NavtM229, elle était bien supérieure aux autres, avec 5% de sel ajouté. Ces quantités de sel ajoutée correspondent aux recommandations faites dans les livres de recette [8] et les blogs [9] traitant des LF, où elles s'échelonnent entre 1% et 3%. Il n'y avait donc pas de grande différence de procédé concernant

[8] « Des aliments aux milles vertus : cuisiner les aliments fermentés », de Claude AUBERT et Jean-James GARREAU, 2011
[9] Blog Ni Cru Ni Cuit : https://nicrunicuit.com/

l'ajout de sel dans les échantillons collectés. La même tendance était observée pour la température de fermentation, avec des valeurs situées autour de 18°C et qui s'étalaient pour la majorité des échantillons entre 13,5°C et 22°C. Deux échantillons s'écartaient de cette répartition, avec une température de 10°C et 25°C pour respectivement les échantillons ChouM015 et BettM189. L'homogénéité des températures de fermentation s'expliquent par le fait que la majorité des Fermenteurs fermentent leur légume dans des pièces de leur maison, comme la cuisine, qui sont à une température ambiante autour de 18°C-20°C, et qui peut varier durant la saison : la température élevée de l'échantillon BettM189 peut s'expliquer par le fait que sa fermentation a eu lieu durant l'été 2019, en pleine période de canicule. La température de conservation était plus variable, avec des valeurs allant de 2°C à 20°C. En effet, certains Fermenteurs placent leur produit au réfrigérateur (~4°C) après fermentation, d'autres dans une pièce fraiche comme une cave (~10°C) ou bien laissent le produit dans la même pièce que pour la fermentation. L'âge de l'échantillon avant analyse, c'est-à-dire la durée de fermentation additionnée à la durée de conservation, s'étalaient de 3 à 7 mois pour la plupart des échantillons. Trois échantillons étaient âgés de plus d'un an au moment de l'analyse.

Les échantillons n'étaient pas tous équivalent en termes de composition. L'ingrédient principal des échantillons étaient le chou (n=6), la carotte (n=3), la betterave (n=3), ainsi que le navet, le radis, le fenouil, le cyclanthère, le poireau et le panais (n=1 pour chacun). Certains produits étaient composés d'un seul type de légume tandis que d'autres contenaient différents légumes en proportion différentes. Nous avons donc classé les produits dans ces deux catégories : 11 échantillons étaient composés de plusieurs légumes et 7 contenaient majoritairement un seul type de légume. Toujours concernant la composition des échantillons, la plupart des échantillons étaient composés d'aromates condiments et épices, comme le poivre, l'ail ou encore la coriandre. Ces ingrédients supplémentaires sont également susceptibles d'impacter la composition microbiologique des LF, comme c'est le cas pour l'ail (52).

Concernant les aspects du procédé déterminés à partir des réponses aux questions à choix binaires, les résultats sont présentés dans la figure 3.

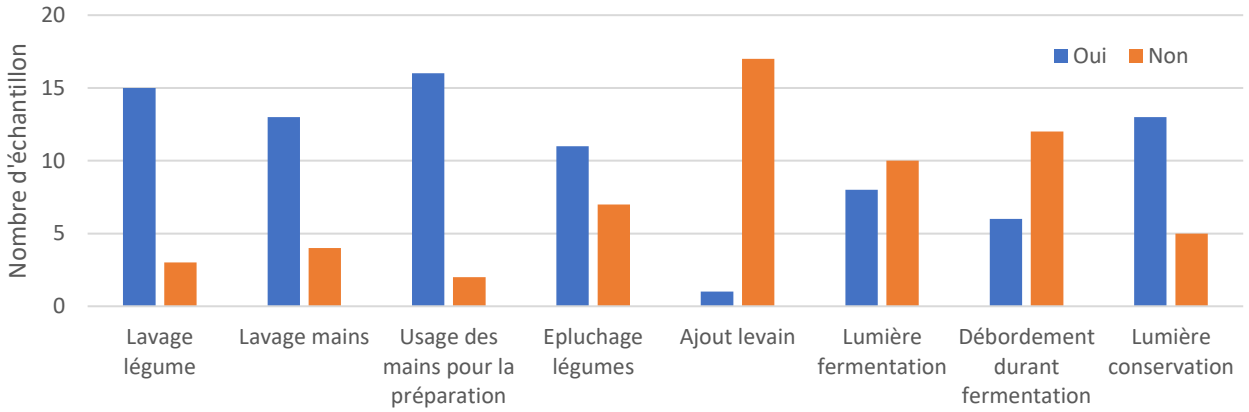


Figure 3. Histogramme illustrant la répartition des échantillons pour chaque variable issue des questions à choix binaires. Par ordre d'apparition sur l'histogramme : lavage des légumes et des mains, usage des mains sans protection pour la préparation, épluchage des légumes, l'ajout de levain, exposition à la lumière lors de la fermentation, débordement du bocal lors de la fermentation et exposition à la lumière lors de la conservation.

Nous pouvons voir ici que certains aspects du procédé étaient couramment appliqués par la majorité des Fermenteurs. Ainsi, nous pouvons voir que de manière générale, la majorité des Fermenteurs ont lavé leurs légumes (15/18) et leurs mains (14/18) avant la préparation des échantillons. Ils utilisaient principalement leurs mains pour manipuler les légumes et autres ingrédients (16/18). Deux tiers des légumes ont été épluchés. Seul un Fermenteur avait ajouté du levain pour la fermentation, correspondant à du jus issu d'une précédente fermentation. Bien que n'étant pas un aspect du procédé à proprement parler, nous pouvons voir que lors de la fermentation, 6 des 18 échantillons ont débordé. Enfin, un peu moins de la moitié des échantillons ont fermenté à la lumière (8/18) tandis que la majorité d'entre eux (12/18) ont été conservés en étant exposés à la lumière. Concernant les expositions à la lumière lors de la fermentation et la conservation, il est à noter que ce choix est probablement imposé par le lieu où est placé le produit. Par exemple, pour une conservation au froid, le bocal sera très souvent à l'obscurité dans un réfrigérateur ou une cave qui sont donc à l'obscurité.

Le type de légume est susceptible d'impacter la composition microbiologique car ils possèdent des compositions et teneurs en sucre différentes, et donc des substrats différents pour le développement des micro-organismes. De plus, les légumes de type feuillus et racinaires n'ont probablement pas le même les mêmes communautés de micro-organismes associées. Les épices et aromates sont également susceptibles d'impacter la composition finale du produit, certains possédant des propriétés antibactériennes, comme c'est le cas pour l'ail. De la même manière, les différents paramètres de fabrication sont susceptibles d'agir sur la composition en micro-organismes initiale du produit, en ajoutant des micro-organismes exogènes, dans le cas où le fermenteur manipule ses ingrédients avec ses mains ou en ajoutant du levain, et en retirant des micro-organismes du légumes dans le cas où ceux-ci sont lavés. Ils sont également susceptibles d'agir sur la composition finale du produit, en favorisant ou inhibant la croissance de certains micro-organismes, comme c'est le cas

pour la quantité de sel ajouté et des températures de fermentation et conservation. Nous pouvons voir que dans l'ensemble, les Fermenteurs appliquent un procédé similaire pour la production de LF, bien qu'il existe des différences sur certains aspects, comme notamment la température de conservation. En effet, le fait de placer le bocal au froid après fermentation n'aura probablement pas le même impact sur les communautés de micro-organismes que le fait de laisser le bocal à la même température que celle de fermentation. Cette diversité de procédé était attendue lors de la préparation du projet, dont l'objectif était justement d'avoir un aperçu global des différents procédés de fermentation en France.

4.2. Caractérisation des différentes populations de micro-organismes

Les résultats des dénombrements des différentes populations de micro-organismes sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4. Résultats des dénombrements réalisés sur les différents milieux utilisés et valeur du pH des 18 échantillons

Echantillon	pH	MRSA	BHI-YEAn	BHI-YEAnp	TSAn NaCl	OGAc	YPMAnp	BHI	TSN	B. cereus agar
CaroM115	3,48	8,2	8,2	8,1	8,0	2,5	<2	2,0	<2	<2
PoirM043	3,92	8,1	7,9	5,6	7,5	<2	5,6	2,0	<2	<2
Pana_247	3,63	7,9	7,9	<2	7,2	<2	<2	2,0	<2	<2
ChouM015	3,72	7,7	7,7	4,8	7,1	3,0	<2	2,5	<2	<2
Bett_175	3,55	7,6	7,5	<2	7,3	<2	<2	2,3	<2	<2
NavtM229	4,3	7,5	7,5	<2	7,6	<2	<2	2,0	<2	<2
Chou_239	3,53	7,5	6,9	7,2	7,5	<2	<2	3,8	2,3	<2
ChouM071	3,65	7,4	7,3	6,5	6,7	<2	<2	2,3	<2	2,0
BettM056	3,61	7,3	7,3	4,7	5,1	<2	4,9	2,6	<2	<2
CyclM089	3,77	7,0	7,0	6,8	6,4	5,3	6,9	2,0	<2	2,0
RadiM090	3,76	6,5	6,5	<2	6,2	<2	<2	2,0	<2	<2
Caro_244	3,21	5,9	6,0	4,4	3,7	3,3	4,6	2,0	<2	<2
FenoM044	3,33	5,1	5,0	3,3	3,5	<2	<2	2,0	<2	<2
Chou_260	3,66	3,7	3,9	3,3	3,2	<2	3,8	2,3	<2	<2
Caro_103	3,3	2,9	4,3	<2	3,8	<2	<2	2,8	<2	<2
ChouM008	3,48	<2	4,1	<2	4,0	<2	<2	NA	<2	<2
ChouM042	3,25	<2	<2	<2	<2	2,0	<2	<2	<2	<2
Bett_189	3,15	<2	<2	<2	<2	2,8	<2	<2	<2	<2

Les résultats sont exprimés en log10(UFC/mL). Pour les milieux VRBG et KF, aucune colonie n'a été détectée au-dessus du seuil de détection de respectivement 10 UFC/mL et 100 UFC/mL
a : Aucune colonie n'a été détectée au-dessus du seuil de détection de 2, soit 10^2 UFC/mL.
b : Non réalisé

Aucune colonie caractéristique d'*Enterococcus* et d'*Enterobacteriacea* n'a été détectée au-dessus du seuil de détection de 10 UFC/mL et 100 UFC/mL sur respectivement les milieux VRBG et KF, ils

ne sont pas donc pas indiqués dans ce tableau. De la même manière, les staphylocoques à coagulase positive, *E. coli*, *Salmonella* et *Listeria* n'ont été détectés dans aucun des échantillons. Le pH des différents échantillons variait de 3,15 à 4,3, avec une moyenne de 3,6. Au niveau des populations retrouvées, nous pouvons voir que des BL présumées étaient présentes dans 15 des 18 échantillons analysés, avec des abondances variables allant de 10^3 à 10^8 UFC/mL pour une moyenne entre 10^6 et 10^7 UFC/mL. Pour trois échantillons, ChouM008, ChouM042 et Bett_189, aucune colonie de BL n'a été détectée.

Des résultats similaires ont été observés pour les BT recherchée sur BHI-YEAn, avec les échantillons ChouM042 et Bett_189 n'ayant aucune colonie à s'être développé sur ce milieu. En ce qui concerne les bactéries aérobies halophiles, recherchées sur le milieu TSA 4% NaCl + natamycine, nous pouvons voir qu'elles ont été retrouvées dans 16 des 18 échantillons, dans des gammes similaires aux précédents milieux, entre 10^3 et 10^8 UFC/mL. Encore une fois, les échantillons pour lesquels aucune colonie ne s'était développée sur ce milieux sont ChouM042 et Bett_189. La BGN dénombrée sur BHI-YEnp était variable suivant les échantillons : 8 des échantillons possédaient une abondance inférieure à 10^2 UFC/mL, 8 avaient des abondances situées entre 10^3 et 10^7 UFC/mL et 2 une abondance supérieure à 10^7 UFC/mL. Des moisissures et levures ont été détectées dans 6 échantillons, avec une abondance variant de 10^2 à 10^3 UFC/mL pour 5 d'entre eux. Le dernier, CyclM089, était caractérisé par une forte abondance en moisissures et levures de 10^5 UFC/ml. Des BA n'ont été retrouvées que dans 5 échantillons, PoirM043, BettM056, CyclM089, CaroM244 et Chou_260, à des abondances comprises entre 10^4 et 10^7 UFC/mL.

Des bactéries sporulées aérobies ont été détectées dans 15 des 17 échantillons testés, à des abondances faibles et très similaires allant de 10^2 à 10^4 UFC/mL. Des colonies suspectes de *Clostridium* ont été retrouvés sur TSN dans un seul échantillon, à une abondance faible de 10^2 UFC/mL. Concernant *B. cereus*, des colonies caractéristiques ont été retrouvées sur BCA dans 2 échantillons, ChouM071 et CyclM089. Pour ces deux derniers milieux, l'objectif étant de rechercher des espèces bactériennes pathogènes pour l'humain, il est à noter que l'identification de colonies suspectes n'a pas été réalisée à ce jour, ce qui ne permet pas de confirmer la présence de *B. cereus* et de *Clostridium* pathogènes dans les échantillons concernés.

Nous pouvons donc voir que l'abondance en micro-organismes des différents échantillons est variable, allant d'une abondance située en dessous du seuil de détection pour les échantillons ChouM042 et Bett_189 à une abondance élevée de 10^8 UFC/mL pour les échantillons PoirM043 et CarotM115. Les fortes valeurs des dénombrements sur le milieu MRSA indique que la population dominante dans la majorité des LF est celle des BL. De manière générale, les dénombrements effectuer sur MRSA et BHI-YEAn étaient très similaires : l'équation représentant les colonies observées sur MRSA en fonction de celles observées sur BHI-YEAn est y=1,0086x, avec un coefficient de corrélation R=0,9784. Ces deux informations nous permettent de formuler l'hypothèse selon laquelle les bactéries présentes sur le milieu BHI-YEAn sont les mêmes que celles présentes

sur MRSA, et correspondraient donc à des BL. La durée d'incubation de 7 jours des milieux a vraisemblablement facilité la croissance des BL, même en aérobiose. Concernant les résultats de dénombrements des BGN, nous pouvons voir qu'ils ne sont pas liés à ceux des BL et BT. En effet, certains échantillons avec abondance moyenne à forte en BL et BT pouvaient soit contenir une abondance similaire en BGN, plus faible ou en dessous du seuil de détection, comme c'est le cas pour respectivement les échantillons CaroM115, PoirM043 et Pana_247.

L'absence dans tous les échantillons de *Salmonella, Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Enterobacteriacea*, *Enterococcus* et staphylocoques à coagulase positive, dont *S. aureus*, peut s'expliquer tout d'abord par les conditions stressantes du produit, et notamment par le pH faible de tous les échantillons, entre 3,15 à 4,3, la plupart de ces bactéries ne pouvant en effet pas se développer à des pH inférieurs à 4 en moyenne. De plus, il est probable qu'il y ai eu production de composés antibactériens permettant d'inhiber la croissance de ces pathogènes par les BL présentes dans les échantillons (54). La présence dans un grand nombre de bactéries aérobies sporulées à des abondances faibles s'explique probablement par la capacité élevée de certaines spores bactériennes à résister au pH acide et aux conditions stressantes des échantillons. Ces spores bactériennes étaient présentes avant l'étape de fermentation, et n'ont vraisemblablement pas pu germer et se développer dans les échantillons.

L'abondance des différentes populations de micro-organismes obtenues lors de cette étude est en adéquation avec les données disponibles dans la littérature concernant les BL et la BT. L'abondance des BL a été décrites dans des échantillons de choucroute et variaient entre 10^3 et 10^8 UFC/g et $<10^1$ et 10^8 UFC/g pour d'autres LF comme le kimchi et les concombres/cornichons (55). L'abondance en BL dans un échantillon contenant des feuilles de moutarde fermentées avec une teneur en sel entre 2% et 5% était similaire à celle obtenue dans cette étude et variait entre $<10^2$ UFC/mL et 10^7 UFC/mL, tandis que dans des échantillons ayant des teneurs plus élevée en sel, de l'ordre de 10% à 20%, aucune BL vivante n'a pu être dénombrée (56). Les différences d'abondance entre les différents échantillons, et notamment ceux dans lesquels aucune BL n'a été détectée, peut s'expliquer par le fait que les conditions stressantes tel que le pH, le taux de sel ou le froid lié à la conservation du produit peuvent entrainer la mort des bactéries ou les faire passer au stade viable mais non cultivable. Dans le dernier cas, ces bactéries sont toujours présentes et métaboliquement actives dans le produit mais ne parviennent plus à se développer sur les milieux de culture permettant traditionnellement leur culture (57).

4.3. Liens entre procédé de fabrication, composition microbiologique et pH

Afin d'observer les liens entre les différents paramètres du procédé de fabrication et la composition microbiologique et le pH, une analyse multivariée a été réalisée (Figure 4).

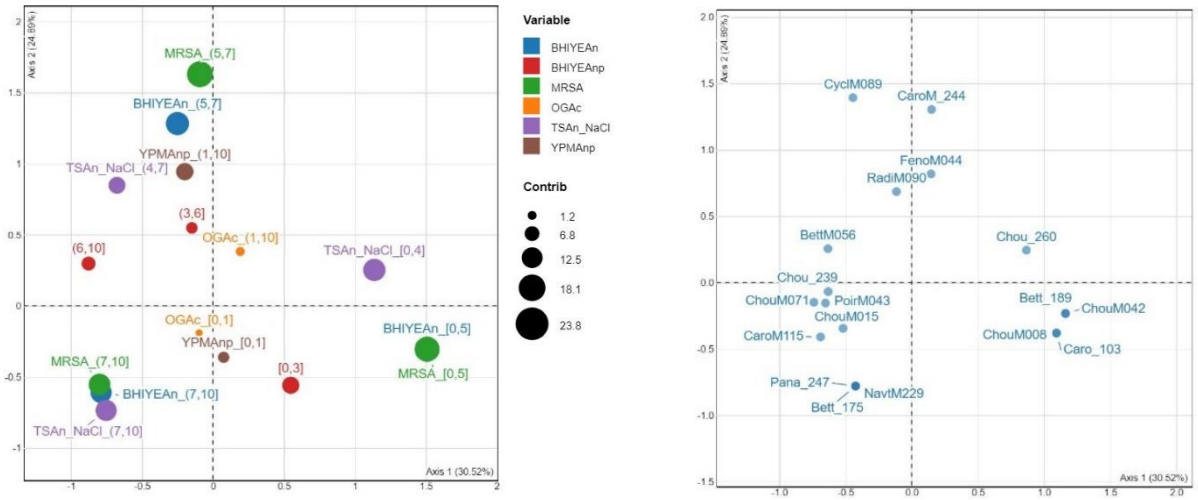


Figure 4. Graphique représentant les modalités des variables actives utilisées pour l'ACM (A) et la répartition des individus, c'est-à-dire les 19 échantillons de légumes fermentés (B). Les variables actives correspondent aux valeurs de dénombrements des milieux MRSA, BHI-YEAn, BHI-YEAnp, TSAn NaCl, OGAc et YPMAnp. Les variables correspondant aux dénombrements milieux BHI-YEA, TSN et BCA ont été exclues de l'analyse, car la majorité des échantillons (respectivement 16,17 et 16 sur 18) avaient des valeurs identiques .

L'inertie donnée par les dimensions 1 et 2 était de 55,5%. Nous pouvons tout d'abord voir que les modalités ayant les plus fortes contributions, c'est-à-dire l'influence de ces modalités sur la représentation, sont celles modalités des variables MRSA, BHI-YEAn et TSAn NaCl (Figure 3A). Ainsi, les échantillons étaient répartis sur le plan des 2 premières dimensions de l'ACM principalement en fonction de ces variables (Figure 3B), où ils apparaissent divisés en 3 groupes : ceux ayant une abondance forte supérieure à 10^7 UFC/mL en bactéries observées sur MRSA, BHI-YEAn et TSAn NaCl, ceux ayant une abondance bactérienne moyenne entre 10^5 et 10^7 UFC/mL et enfin ceux ayant une faible abondance bactérienne entre $<10^2$ et 10^4 UFC/mL. Il est à noter que nous pouvons observer sur la figure 3A que les valeurs de dénombrement sur MRS et BHI-YE sont relativement bien corrélées, puisque les points représentant les modalités de ces variables sont très proches voir superposées pour certains. Les axes 3 et 4 avaient une inertie de 35,2%, et étaient principalement représentés par les modalités des variables OGAc et BHI-YEAnp (Résultats non illustrés).

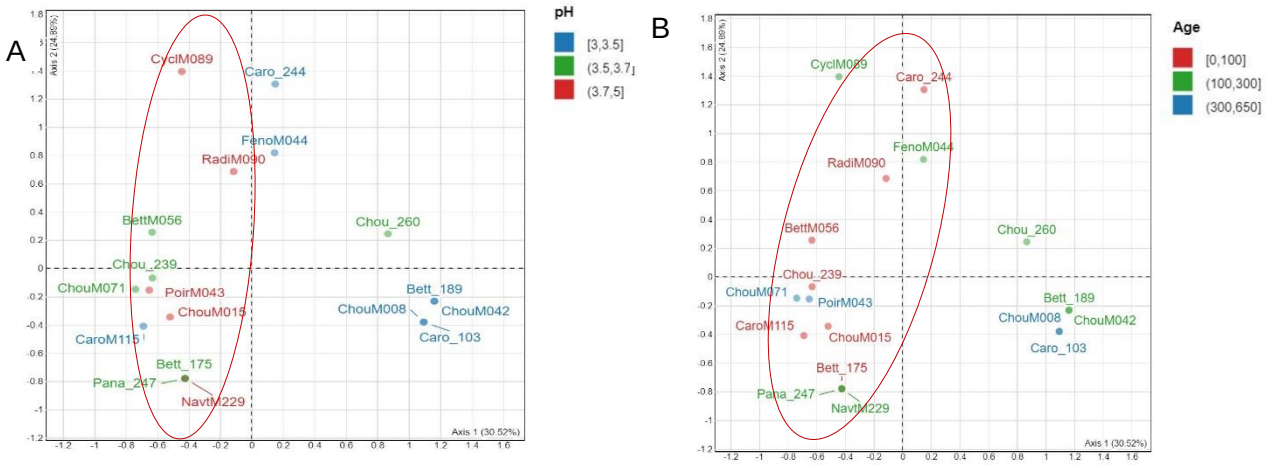


Figure 5. Représentation graphique de l'ACM effectuée avec comme variables supplémentaires le pH (A) et l'âge (B). Les ellipses ont été placées à la main et indique la région où se situent tout les échantillons ayant un pH entre 3,7 et 5 (A) et les échantillons agés de moins de 100 jours (B).

En superposant à cette projection des variables supplémentaires, correspondant aux différents paramètres du procédé ainsi qu'au pH, nous pouvons observer si la répartition des échantillons en fonction des variables actives principales correspond ou non à des modalités données des paramètres du procédé. En ce qui concerne le pH et l'âge de l'échantillon, nous pouvons observer qu'aucun des échantillons avec un pH élevé supérieur à 3,7 ou un âge jeune inférieur à 100 jours n'a été retrouvés parmi ceux ayant une faible population bactérienne. En effet, les ellipses regroupant l'ensemble des échantillons ayant ces valeurs de pH et d'âge excluent les échantillons ayant de faible population bactérienne (figure 3A et 3B). De la même manière que pour le pH et l'âge, le fait de ne pas se laver les mains (n=4), l'absence de lumière lors de la conservation (n=5) et l'utilisation d'ustensiles ou de gants pour mélanger les ingrédients lors de la préparation (n=5) étaient des paramètres qui n'étaient pas présents pour les échantillons avec une faible abondance bactérienne (Résultats non illustrés). Il est à noter que les échantillons pour lesquels les mains n'ont pas été lavées et pour lesquels des gants ont été utilisés ne sont pas les mêmes, excepté pour l'échantillon Chou_239. Les échantillons dont les légumes ont été lavés (n=3) correspondent uniquement à des échantillons ayant une abondance bactérienne moyenne (Résultats non illustrés). Enfin, à l'inverse des autres, aucun échantillon dont les légumes ont été épluchés n'a été retrouvé parmi les échantillons avec une forte abondance bactérienne (Résultats non illustrés). Les autres paramètres du procédé n'ont permis d'observer aucune tendance.

La projection des variables supplémentaires sur la représentation des échantillons de l'ACM nous permet de voir des tendances, et permet de formuler des hypothèses sur les différences d'abondance bactérienne observées entre les échantillons. Ainsi, les faibles abondances bactériennes observées pour certains échantillons seraient en partie dues au pH faible et à l'âge avancé de l'échantillon. Il pourrait également s'agir d'une combinaison de ces deux paramètres (longue exposition à un pH trop faible) Concernant l'exposition à la lumière lors de la conservation,

il est probable que ce paramètre reflète en réalité la température de stockage : en effet, les lieux de stockage les plus froids (cave et réfrigérateur) ne sont généralement pas exposés à la lumière. Cependant, aucune tendance n'a été observée avec le paramètre correspondant à la température de stockage. Les paramètres liés au lavage et à l'usage des mains peuvent probablement impacter la composition microbiologique initiale, et donc la composition finale, bien que les deux tendances observées ici semblent contradictoire, l'une favorisant l'apport de micro-organismes exogènes et l'autre limitant cet apport. Le fait que plusieurs variables décrivant le procédé semblent influer sur les teneurs bactériennes nous permet de penser que l'impact du procédé de fabrication sur la composition microbiologique est probablement multifactoriel. Enfin, le faible nombre d'échantillons disponible actuellement dans cette étude ne permet pas de conclure à un effet certain de ces variables de procédé sur la composition microbiologique, mais simplement d'observer qu'il existe des tendances. L'augmentation du nombre d'échantillon pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer ces tendances et hypothèses.

V- Conclusion et perspectives

L'objectif de cette étude était de caractériser les différentes grandes populations de micro-organismes présentes dans des échantillons de LF variés et d'observer l'impact du procédé de fermentation sur ces populations. Les BL présumées formaient la population dominante dans 15 des échantillons, avec une abondance allant de 10^3 à 10^8 UFC/mL. 3 des 18 échantillons présentaient une abondance bactérienne très faible, avec notamment une population de BL $<10^2$. Des bactéries acétiques et des levures/moisissures ont été détectés dans un tiers des échantillons. Les recherches de pathogènes ont pu mettre en évidence l'absence de Salmonelles, de *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, des staphylocoques à coagulase positive, des entérocoques et des entérobactéries. Des colonies suspectes de *B. cereus* et de bactéries anaérobies sporulées sulfito-réductrices ont été détectés dans respectivement 2 et 1 des 18 échantillons analysés. L'absence d'identification de ces colonies ne permet cependant pas de conclure quant à la présence de pathogène dans ces échantillons. L'identification des colonies, provenant des milieux dénombrant les grandes populations de micro-organismes et de ceux recherchant les pathogènes, seraient d'une grande utilité pour mieux comprendre les résultats de dénombrements présentés dans cette étude. En effet, certains milieux comme le milieu YPMAnp permet théoriquement de rechercher les bactéries acétiques, mais étant donné la différence d'aspect des colonies que nous avons pu observer entre des colonies issues d'échantillons de LF et celles issus d'échantillon de kéfir de fruit, une boisson fermentée, nous pouvons nous interroger sur la taxonomie des colonies obtenues sur ce milieu. C'est également le cas pour les BGN s'étant développé sur le milieu BHI-YEAnp, pour lesquelles les résultats de leur dénombrement n'ont pas pu être liés à ceux des BL et BT. L'identification des colonies sur ces différents milieux permettraient donc de confirmer la présence des grandes populations recherchées dans cette étude et de fournir des pistes sur ces valeurs de dénombrements.

Seules des tendances ont pu être observées concernant l'impact des paramètres de la fabrication des échantillons et du pH sur la composition microbiologique des échantillons. Nous avons notamment observé qu'aucun échantillon avec une abondance bactérienne faible ne possédait un pH supérieur à 3,7 et un âge inférieur à 100 jours. Cette tendance pourrait se confirmer par la mise en place d'un plan d'expérience visant à évaluer l'impact du pH et de l'âge d'échantillons de LF sur leur composition microbiologique. Il consisterait à produire des échantillons de LF, avec des paramètres fixes comme la température de fermentation et conservation, la composition en ingrédients et la manipulation de ceux-ci. Le pH serait mesuré à différents temps de la fermentation, afin de pouvoir mesurer l'évolution du pH en fonction du temps. Des dénombrements des populations bactériennes lactique et totale seraient effectuées en parallèle afin de pouvoir lier les paramètres à l'abondance bactérienne Le nombre prévu d'échantillons à analyser, dans le cadre du projet FLEGME, était d'une centaine. Ainsi, le faible nombre d'échantillons analysés ne permet que de constater des tendances et pas de démontrer d'effets significatifs des paramètres de fabrication sur la composition microbiologique. L'une des perspectives est donc de poursuivre l'analyse d'échantillons. De plus, une analyse métagénomique des espèces présentes dans les échantillons de LF permettrait d'apporter de nouveaux éléments et contribuerait de manière complémentaire, avec l'analyse culture-dépendante décrite dans cette étude, à caractériser microbiologiquement les échantillons de légumes fermentés.

Références bibliographiques

1. Breidt F, McFeeters RF, Prez-Diaz I, Lee C-H. 2013. Fermented Vegetables, p. 841–855. *In* Doyle, Buchanan (eds.), Food Microbiology. American Society of Microbiology.

2. Tamang JP, Kailasapathy K. 2010. Fermented Foods and Beverages of the World. CRC Press.

3. Melini F, Melini V, Luziatelli F, Ficca AG, Ruzzi M. 2019. Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. Nutrients 11.

4. Lortal S, El Mecherfi K-E, Mariotti F, Eutamène H, Rul F, Champomier-Vergès M-C, Savary-Auzeloux I. 2020. Aliments fermentés & bénéfices santé : un défi pour la recherche. Cahiers de Nutrition et de Diététique.

5. Pogson BJ, Morris SC. 2004. 22 - Postharvest Senescence of Vegetables and its Regulation, p. 319–329. *In* Noodén, LD (ed.), Plant Cell Death Processes. Academic Press, San Diego.

6. Singh B, Singh S. 2018. Advances in Postharvest Technologies of Vegetable Crops. CRC Press.

7. Xu F, Zheng Y, Yang Z, Cao S, Shao X, Wang H. 2014. Domestic cooking methods affect the nutritional quality of red cabbage. Food Chemistry 161:162–167.

8. Septembre-Malaterre A, Remize F, Poucheret P. 2018. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. Food Research International 104:86–99.

9. Kwak CS, Lee MS, Oh SI, Park SC. 2011. Discovery of Novel Sources of Vitamin B12 in Traditional Korean Foods from Nutritional Surveys of Centenarians. Current Gerontology and Geriatrics Research. Review Article, Hindawi.

10. Bell V, Ferrão J, Pimentel L, Pintado M, Fernandes T. 2018. One Health, Fermented Foods, and Gut Microbiota. Foods 7.

11. Medina E, Castro A, Romero C, Ramírez E, Brenes M. 2016. Safety of Fermented Fruits and Vegetables, p. 355–367. *In* .

12. Shin J, Yoon K-B, Jeon D-Y, Oh S-S, Oh K-H, Chung GT, Kim SW, Cho S-H. 2016. Consecutive Outbreaks of Enterotoxigenic Escherichia coli O6 in Schools in South Korea Caused by Contamination of Fermented Vegetable Kimchi. Foodborne Pathog Dis 13:535–543.

13. Tamang JP, Shin D-H, Jung S-J, Chae S-W. 2016. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. Front Microbiol 7.

14. Holzapfel WH, Wood BJB. 2014. Introduction to the LAB, p. 1–12. *In* Lactic Acid Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd.

15. Buckenhueskes HJ. 2015. 22 - Quality improvement and fermentation control in vegetables, p. 515–539. *In* Holzapfel, W (ed.), Advances in Fermented Foods and Beverages. Woodhead Publishing.

16. He Z, Chen H, Wang X, Lin X, Ji C, Li S, Liang H. 2020. Effects of different temperatures on bacterial diversity and volatile flavor compounds during the fermentation of suancai, a traditional fermented vegetable food from northeastern China. LWT 118:108773.

17. Archibald FS, Fridovich I. 1981. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. Journal of Bacteriology 146:928–936.

18. Brooijmans R, Smit B, Santos F, van Riel J, de Vos WM, Hugenholtz J. 2009. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. Microb Cell Fact 8:28.

19. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. Int J Syst Evol Microbiol.

20. Holzapfel WH, Wood BJB. 2014. Physiologically 'related' genera, p. 507–508. *In* Lactic Acid Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd.

21. Endo A, Dicks LMT. 2014. Physiology of the LAB, p. 13–30. *In* Lactic Acid Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd.

22. Adams MR, Moss MO. 2008. Methods for the Microbiological Examination of Food, p. 370–376. *In* Food Microbiology. Royal Society of Chemistry.

23. Holzapfel W. 2014. Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits. Elsevier.

24. Reuter G. 1985. Elective and selective media for lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 2:55–68.

25. Jun Z, Shuaishuai W, Lihua Z, Qilong M, Xi L, Mengyang N, Tong Z, Hongli Z. 2018. Culture-dependent and -independent analysis of bacterial community structure in Jiangshui, a traditional Chinese fermented vegetable food. LWT 96:244–250.

26. Barrangou R, Yoon SS, Breidt F, Fleming HP, Klaenhammer TR. 2002. Identification and characterization of Leuconostoc fallax strains isolated from an industrial sauerkraut fermentation. Appl Environ Microbiol 68:2877–2884.

27. Chao S-H, Huang H-Y, Chang C-H, Yang C-H, Cheng W-S, Kang Y-H, Watanabe K, Tsai Y-C. 2013. Microbial Diversity Analysis of Fermented Mung Beans (Lu-Doh-Huang) by Using Pyrosequencing and Culture Methods. PLoS ONE 8:e63816.

28. Chen A, Luo W, Peng Y, Niu K, Liu X, Shen G, Zhang Z, Wan H, Luo Q, Li S. 2019. Quality and microbial flora changes of radish paocai during multiple fermentation rounds. Food Control 106:106733.

29. Liu Z, Li J, Wei B, Huang T, Xiao Y, Peng Z, Xie M, Xiong T. 2019. Bacterial community and composition in Jiang-shui and Suan-cai revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA. International Journal of Food Microbiology 306:108271.

30. Tomita S, Watanabe J, Nakamura T, Endo A, Okada S. 2019. Characterisation of the bacterial community structures of sunki, a traditional unsalted pickle of fermented turnip leaves. Journal of Bioscience and Bioengineering S1389172319308886.

31. Wang F, Men X, Zhang G, Liang K, Xin Y, Wang J, Li A, Zhang H, Liu H, Wu L. 2018. Assessment of 16S rRNA gene primers for studying bacterial community structure and function of aging flue-cured tobaccos. AMB Express 8:182.

32. Zhao N, Cai J, Zhang C, Guo Z, Lu W, Yang B, Tian F-W, Liu X-M, Zhang H, Chen W. 2017. Suitability of various DNA extraction methods for a traditional Chinese paocai system. Bioengineered 8:642–650.

33. Poirier S, Rué O, Coeuret G, Champomier-Vergès M-C, Loux V, Chaillou S. 2018. Detection of an amplification bias associated to Leuconostocaceae family with a universal primer routinely used for monitoring microbial community structures within food products. BMC Res Notes 11:802.

34. Beckers B, Op De Beeck M, Thijs S, Truyens S, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J. 2016. Performance of 16s rDNA Primer Pairs in the Study of Rhizosphere and Endosphere Bacterial Microbiomes in Metabarcoding Studies. Front Microbiol 7.

35. Wuyts S, Van Beeck W, Oerlemans EFM, Wittouck S, Claes IJJ, De Boeck I, Weckx S, Lievens B, De Vuyst L, Lebeer S. 2018. Carrot Juice Fermentations as Man-Made Microbial Ecosystems Dominated by Lactic Acid Bacteria. Appl Environ Microbiol 84:UNSP e00134.

36. Chelius MK, Triplett EW. 2001. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of Zea mays L. Microb Ecol 41:252–263.

37. Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. 2016. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. Front Microbiol 7.

38. Kim M, Chun J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. International Journal of Food Microbiology 103:91–96.

39. Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae J-W, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO. 2011. Metagenomic Analysis of Kimchi, a Traditional Korean Fermented Food. Appl Environ Microbiol 77:2264–2274.

40. Ono H, Nishio S, Tsurii J, Kawamoto T, Sonomoto K, Nakayama J. 2014. Monitoring of the microbiota profile in nukadoko, a naturally fermented rice bran bed for pickling vegetables. Journal of Bioscience and Bioengineering 118:520–525.

41. Paramithiotis S, Doulgeraki AI, Karahasani A, Drosinos EH. 2014. Microbial population dynamics during spontaneous fermentation of Asparagus officinalis L. young sprouts. Eur Food Res Technol 239:297–304.

42. Medina E, Ruiz-Bellido MA, Romero-Gil V, Rodríguez-Gómez F, Montes-Borrego M, Landa BB, Arroyo-López FN. 2016. Assessment of the bacterial community in directly brined Aloreña de Málaga table olive fermentations by metagenetic analysis. Int J Food Microbiol 236:47–55.

43. Liang H, Zhang A, Wu Z, Liu C, Zhang W. 2016. Characterization of Microbial Community during the Fermentation of Chinese Homemade paocai, a Traditional Fermented Vegetable Food. Food Sci Technol Res 22:467–475.

44. Cao J, Yang J, Hou Q, Xu H, Zheng Y, Zhang H, Zhang L. 2017. Assessment of bacterial profiles in aged, home-made Sichuan paocai brine with varying titratable acidity by PacBio SMRT sequencing technology. Food Control 78:14–23.

45. Lee M-H, Li F-Z, Lee J, Kang J, Lim S-I, Nam Y-D. 2017. Next-Generation Sequencing Analyses of Bacterial Community Structures in Soybean Pastes Produced in Northeast China: Bacterial communities in Chinese soybean pastes…. Journal of Food Science 82:960–968.

46. Liu D, Tong C. 2017. Bacterial community diversity of traditional fermented vegetables in China. LWT 86:40–48.

47. Du R, Song G, Zhao D, Sun J, Ping W, Ge J. 2018. Lactobacillus casei starter culture improves vitamin content, increases acidity and decreases nitrite concentration during sauerkraut fermentation. International Journal of Food Science & Technology 53:1925–1931.

48. Müller A, Rösch N, Cho G-S, Meinhardt A-K, Kabisch J, Habermann D, Böhnlein C, Brinks E, Greiner R, Franz CMAP. 2018. Influence of iodized table salt on fermentation characteristics and bacterial diversity during sauerkraut fermentation. Food Microbiology 76:473–480.

49. Zabat MA, Sano WH, Wurster JI, Cabral DJ, Belenky P. 2018. Microbial Community Analysis of Sauerkraut Fermentation Reveals a Stable and Rapidly Established Community. Foods 7:77.

50. Weldemichael H, Stoll D, Weinert C, Berhe T, Admassu S, Alemu M, Huch M. 2019. Characterization of the microbiota and volatile components of kocho, a traditional fermented food of Ethiopia. Heliyon 5:e01842.

51. Guan Q, Zheng W, Huang T, Xiao Y, Liu Z, Peng Z, Gong D, Xie M, Xiong T. 2020. Comparison of microbial communities and physiochemical characteristics of two traditionally fermented vegetables. Food Research International 128:108755.

52. Huang T-T, Wu Z-Y, Zhang W-X. 2020. Effects of garlic addition on bacterial communities and the conversions of nitrate and nitrite in a simulated pickle fermentation system. Food Control 113:107215.

53. Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A. 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Appl Microbiol Biotechnol 75:149–164.

54. Ricci A, Bernini V, Maoloni A, Cirlini M, Galaverna G, Neviani E, Lazzi C. 2019. Vegetable By-Product Lacto-Fermentation as a New Source of Antimicrobial Compounds. Microorganisms 7.

55. Rezac S, Kok CR, Heermann M, Hutkins R. 2018. Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. Front Microbiol 9:1785.

56. Ly D, Mayrhofer S, Schmidt J-M, Zitz U, Domig KJ. 2020. Biogenic Amine Contents and Microbial Characteristics of Cambodian Fermented Foods. 2. Foods 9:198.

57. Giraffa G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. FEMS Microbiol Rev 28:251–260.

Résumé

La fermentation des légumes est une pratique en plein essor et est pratiqué à titre personnel par de nombreuses personnes. Le projet **participatif** FLEGME (Fermentation des LEGuMEs), financé par les régions Pays de la Loire et Bretagne, a pour objectif d'obtenir une vision globale de la fermentation des légumes en France. Ce stage, réalisé à l'INRAE, s'inscrit dans les premiers modules du projet et vise à caractériser les différentes populations de micro-organismes présentes dans des échantillons de **légumes fermentés** produits par des citoyens participant au projet et d'étudier l'impact des paramètres de production de ces légumes fermentés sur leur composition microbiologique. Les différentes populations de micro-organismes de 18 échantillons ont été dénombrées par méthode **culture-dépendante**, avec l'utilisation de 11 milieux de cultures. Les paramètres de fabrication des échantillons ont été fournis par le biais de réponse à un questionnaire et ont été mises en lien avec les résultats de dénombrement. Certains paramètres tels que la quantité de sel ajoutée et la température de fermentation était similaire entre les échantillons, tandis que certains paramètres étaient plus variables, traduisant une certaine diversité des pratiques de fermentation en France. Les résultats de dénombrements ont montré que la population dominante était celles des **bactéries lactiques** présumées, allant de $<10^2$ à 10^8 UFC/mL. Des colonies suspectes de *B. cereus* et de bactéries anaérobies sulfito-réductrices ont été détectées dans respectivement 2 et 1 échantillons, à une abondance de 10^2 UFC/mL. Aucun effet des paramètres de la fabrication des échantillons de légumes fermentés sur leur composition microbiologique n'a été observé, notamment à cause du faible nombre d'échantillons analysés. Certaines tendances ont cependant permis de formuler l'hypothèse selon laquelle un pH et un âge avancé de l'échantillon pouvait avoir un impact négatif son l'abondance bactérienne et seront à confirmer par l'analyse d'échantillons supplémentaires

Mots clés : Légumes fermentés, bactéries lactiques, culture-dépendante, participatif

Abstract

The fermentation of vegetables is a booming practice and is practiced on a personal basis by many people. The participatory FLEGME project (Fermentation des LEGuMEs), funded by the Pays de la Loire and Bretagne regions, aims to obtain a global vision of the fermentation of vegetables in France. This internship, carried out at INRAE, is part of the first modules of the project and aims to characterize the different populations of microorganisms present in samples of fermented vegetables produced by citizens participating in the project and to study the impact production parameters of these fermented vegetables on their microbiological composition. The different populations of microorganisms from 18 samples were counted using the culture-dependent method, using 11 culture media. The parameters for manufacturing the samples were provided through a questionnaire response and were linked to the count results. Some parameters such as the amount of salt added and the fermentation temperature were similar between the samples, while certain parameters were more variable, reflecting a certain diversity of fermentation practices in France. The results of the counts showed that the dominant population was that of the suspected lactic acid bacteria, ranging from <102 to 108 CFU / mL. Suspicious colonies of B. cereus and anaerobic sulphite-reducing bacteria were detected in 2 and 1 samples, respectively, at an abundance of 102 CFU / mL. No effect of the parameters of the manufacture of the samples of fermented vegetables on their microbiological composition was observed, in particular because

of the low number of samples analyzed. However, certain trends have led to the hypothesis that a pH and an advanced age of the sample could have a negative impact on its bacterial abundance.