

Université de Montréal

L'analyse de la variabilité du microbiote de surface des carcasses et des produits finis de porc
comme valeur indicatrice de la salubrité de la viande

Par

Charlotte Braley

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophia doctor* (Ph. D.)
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Avril 2023

© Braley, 2023

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

**L'analyse de la variabilité du microbiote de surface des carcasses et des produits finis de porc
comme valeur indicatrice de la salubrité de la viande**

Présentée par

Charlotte Braley

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Juan Carlos Arango Sabogal

Président-rapporteur

Alexandre Thibodeau

Directeur de recherche

Phillipe Fravalo

Codirecteur

Marie-Lou Gaucher

Codirectrice

Imourana Alassane-Kpembé

Membre du jury

Sadjia Bekal

Examinatrice externe

Résumé

La viande de porc est l'un des produits alimentaires les plus consommés au monde. La demande pour des produits de viande sains et de qualité par les consommateurs ne cesse d'augmenter à mesure que la consommation elle-même augmente. Pour pouvoir répondre à cette demande, la contamination microbienne doit être surveillée et maîtrisée. Il s'agit d'une préoccupation majeure pour les industries œuvrant en agroalimentaire, car la présence de bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires chez les consommateurs est une menace pour la santé publique. De plus, la présence de bactéries d'altération rend la viande impropre à la consommation humaine et diminue la durée de vie des produits, entraînant un gaspillage alimentaire et des pertes économiques.

La contamination initiale des carcasses de porc est un processus inévitable et se produit par l'apport continu de bactéries, particulièrement celles composant le microbiote (intestinal, oral) des porcs et de l'environnement de l'abattoir. Le contrôle de la qualité microbiologique et la description des communautés microbiennes retrouvées à la surface des carcasses et des viandes sont réalisés, en cultivant des micro-organismes indicateurs classiques tels que les bactéries aérobies mésophiles totales ou les entérobactéries. Aujourd'hui, de nouvelles approches existent pour caractériser l'ensemble des bactéries constituant un microbiote grâce à des méthodes de séquençage à haut débit dans le but d'en étudier toute sa diversité. Cependant, l'ensemble du microbiote des carcasses et des viandes, ainsi que sa diversité sont très peu connus en production porcine. Par conséquent, il y a un manque général d'information disponible sur la façon dont ce microbiote varie dans des conditions réelles de transformation et d'entreposage de la viande de porc. Ainsi, les principaux objectifs de cette thèse étaient de décrire la variabilité du microbiote porcin retrouvé sur la surface des carcasses en fonction de la provenance de la ferme d'origine des animaux et des étapes du procédé d'abattage et celle du microbiote retrouvé sur la surface des viandes emballées sous vide en fonction des conditions d'entreposage, en plus de décrire la variation de ces microbiotes dans le temps.

Pour cette thèse, trois échantillonnages ont été effectués dans un abattoir porcin au Québec, Canada. Des échantillons de surface de carcasses ont été prélevés à plusieurs étapes de la chaîne d'abattage et de transformation et ce, pendant plusieurs semaines. Des échantillons de longes de porc emballées sous vides et entreposées à plusieurs températures distinctes pendant 56 jours, pour imiter l'exportation de ces produits frais à l'étranger, ont également été prélevés. Des analyses microbiologiques classiques, à savoir le dénombrement d'indicateurs microbiens et la détection des bactéries pathogènes telles que *Salmonella*, ainsi que la caractérisation du microbiote via le séquençage de la région V4 de l'ARNr 16S sur la plateforme Illumina Miseq ont été réalisées.

Globalement, les résultats ont montré que le microbiote de surface des carcasses de porc était similaire lorsque comparé après l'habillage des carcasses (jusqu'à la douche précédant le refroidissement), et ce entre les zones basses (correspondant au cou) et hautes (correspondant au jambon), ainsi que selon l'origine des carcasses, provenant de différents élevages, abattues pendant une même journée. Le microbiote semblait être constitué de bactéries provenant du microbiote intestinal ou oral des porcs. À l'inverse, une différence entre les charges microbiennes était observée, avec des comptes bactériens plus élevés pour les indicateurs dans la partie correspondant au cou. Lorsque les microbiotes ont été comparés sur une période de quatre semaines, une plus grande diversité bactérienne a été observée sur les zones correspondant au jambon. La composition et la structure du microbiote à la surface des carcasses apparaissaient différentes selon les journées d'abattage et les différents quarts de production (matin vs après-midi). Après le refroidissement des carcasses, une diminution de la charge bactérienne ainsi que de la diversité ont été observées, telles qu'attendues, malgré le fait que la plupart des genres bactériens présents sur les carcasses avant le refroidissement ont également été détectés après ce même refroidissement. La caractérisation du microbiote de longes de porc emballées sous vide entreposées à des températures de $-1,5^{\circ}\text{C}$ et subissant des fluctuations de la température durant les 56 jours d'entreposage a démontré que la diversité, la composition et la structure du microbiote n'étaient pas impactées. Les communautés bactériennes identifiées sur les carcasses de porc avant et après le refroidissement, tels qu'*Escherichia*, *Shigella* et

Lactobacillales_unclassified, semblaient contribuer au microbiote des longes tout au long de l'entreposage. Les résultats ont révélé que les microbiotes de longes de porc, similaires en début de l'entreposage, se différenciaient après 56 jours d'entreposage. Dans cette thèse, les faibles prévalences de *Salmonella* et de *Listeria monocytogenes* n'ont pas permis de décrire et d'identifier les changements du microbiote potentiellement associés à la présence de ces bactéries. La caractérisation du microbiote a néanmoins permis d'identifier des genres bactériens hébergeant des espèces reconnus pour être pathogènes pour l'humain, comme *Campylobacter* spp. et *Yersinia* spp.

Les méthodes de contrôles pour assurer le contrôle de la qualité microbiologique mises en place à l'abattoir ne permettent pas de caractériser toute la contamination microbienne. Par conséquent, la description complète des communautés microbiennes retrouvées à la surface des carcasses et viandes de porc est importante pour déterminer le rôle des conditions de transformation primaire et d'entreposage dans la composition et la diversité du microbiote. Ce projet permet d'ouvrir sur de nouvelles perspectives pour un meilleur contrôle de la qualité microbiologique et une meilleure prévention de la contamination microbienne des carcasses et viandes de porc.

Mots-clés : abattoir porcin, carcasses, longes sous-vide, microbiologie, indicateur, altération, pathogènes, microbiote, diversité.

Abstract

Pork is one of the most consumed food products in the world. Requests for quality safe and high pork meat products is increasing too, as the consumption itself continues to increase. To be able to meet these requests, microbial contamination must be controlled. This is a major concern for the pig industry as the presence of pathogenic bacteria is responsible for human foodborne infections, making it a public health issue, as well as the presence of spoilage bacteria render meat unsuitable for human consumption, leading to food waste and economic losses.

During pig meat processing, the initial carcass contamination appears inevitable and bacteria from the digestive tract and from the slaughterhouse environment contribute to the contamination of the carcass surface, both jeopardizing food safety and meat shelf life.

The control of microbiological contamination and the description of the microbial communities on the surfaces of pork carcasses and meats are performed using culture-dependent methods, such as counting total aerobic bacteria or *Enterobacteriaceae*. Currently, new approaches allow to describe and analyze the entire composition of a microbial community using high-throughput sequencing. However, few studies have described the composition and diversity of all bacterial populations on carcass surfaces and fresh pork products during processing. To address this lack of available information on how the microbiota varies under actual processing and storage conditions, this thesis aims to describe the variability of surface microbiota of pig carcasses according to the animal origin, stage of the slaughter process, the variability of surface microbiota of vacuum-packed pork meats according to storage conditions and to study the variations of these microbiota over time.

In this thesis, three samplings were carried out in a pig slaughterhouse in the province of Quebec, Canada. Samples from the surface of pig carcasses were collected at several stages during primary processing, as well as samples from the surface of fresh vacuum-packed pork loins stored for 56 days and subjected to different temperature deviations, to mimic overseas exportation. Culture-

dependent methods such as enumeration of traditional indicator microorganisms, detection of pathogenic bacteria such as *Salmonella*, as well as high-throughput sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene on the Illumina platform were performed.

Results showed that the microbiota of the carcass surfaces sampled was similar following primary processing (until the final wash that precedes cooling) between samples from the top (ham) and the bottom areas (neck), and between different pig batches slaughtered the same day. Bacteria which seem to come from the gut and oral cavity of pigs mainly contribute to the carcass microbiota composition. Microbial counts were different between areas, higher bacterial counts were observed for the bottom area. However, when the microbiota was compared over a four-week period, a higher bacterial diversity was observed on top areas, and the microbiota composition and diversity found on the pig carcass surface appear different according to different visits and work shifts (morning vs afternoon). After cooling, a decrease in bacterial counts and diversity were observed, even if most bacterial genera present on carcasses before cooling were also detected afterward. The microbiota composition, diversity, and structure of vacuum-packed pork loin stored at -1.5°C (Control) and at different temperature deviations over 56 days were not statistically different. Bacterial communities identified on pig carcasses before and after chilling, such as *Escherichia*, *Shigella* and *Lactobacillales_unclassified*, seemed to contribute to the vacuum-packed pork loin microbiota during storage. Results revealed that the vacuum-packed pork loin microbiota from the eight batches sampled were different after 56 days of storage, even though they appeared similar at the beginning of this storage period. In this thesis, the low prevalence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* did not allow us to describe any potential changes in the microbiota associated with the presence of these bacteria. However, sequencing analysis revealed the frequent presence of known foodborne pathogens like *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp.

The control methods to ensure microbiological quality control implemented at the slaughterhouse do not allow to characterize all microbial contamination. Therefore, the complete description of the microbial communities from carcass and meat surfaces is important in

determining the role of primary processing and storage conditions in the composition and diversity of microbiota. This study is a step forward in the better control and prevention of microbial contamination of meat products.

Keywords : pig slaughterhouse, carcasses, vacuum-pack loins, microbiology, indicator, spoilage, pathogens, microbiota, diversity.

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	6
Table des matières	9
Liste des tableaux	12
Liste des figures	14
Liste des sigles et abréviations.....	18
Remerciements.....	22
Chapitre 1 – Introduction.....	24
Chapitre 2 – Revue de littérature	28
2.1 L’industrie porcine	28
2.1.1 Les données sur la production porcine au Canada et au Québec.....	29
2.1.2 Les étapes de transformation des animaux en viandes	29
2.1.2.1 L’élevage de porc	29
2.1.2.2 Le processus d’abattage.....	30
2.1.2.3 La découpe et la transformation.....	32
2.1.2.4 L’emballage, l’entreposage et l’expédition des viandes	33
2.2 Les différents types d’altérations de la viande	34
2.3 Les bactéries responsables de l’altération.....	35
2.3.1 Les bactéries associées à l’altération des viandes sous aérobiose	36
2.3.2 Les bactéries associées à l’altération des viandes emballées sous anaérobiose ..	38
2.4 Les bactéries responsables des maladies d’origine alimentaire	41
2.4.1 Les maladies d’origine alimentaire	41
2.4.2 Les principales bactéries pathogènes pour l’humain et associées au porc.....	42
2.4.3 <i>Salmonella</i> spp. en filière porcine.....	45
2.5 La qualité microbiologique des carcasses et des viandes de porcs.....	48
2.5.1 Méthodes d’analyses des populations bactériennes par microbiologie classiques..	48
.....	48
2.5.2 Le contrôle de la qualité microbiologique des carcasses et des viandes de porc .	49
2.5.2.1 Les critères microbiologiques.....	49

2.5.2.2	Établissement des critères microbiologiques en Europe	50
2.5.2.2.1	Critères applicables aux carcasses	50
2.5.2.2.2	Critères applicables aux viandes	51
2.5.2.3	Établissement des critères microbiologiques au Québec et au Canada	52
2.5.2.3.1	Critères applicables aux carcasses	53
2.5.2.3.2	Critères applicables aux viandes	54
2.6	La contamination des carcasses et des viandes de porc.....	56
2.6.1	Évolution de la contamination par les indicateurs microbiens à l'abattoir	56
2.6.1.1	Évolution de la contamination des carcasses de porc.....	56
2.6.1.2	Évolution de la contamination des viandes	63
2.6.2	La contamination des carcasses et des viandes par <i>Salmonella</i> spp.....	67
2.6.3	Le contrôle de la contamination microbienne des carcasses et des viandes de porc.....	73
2.6.4	Limites du contrôle de la contamination microbienne des carcasses et des viandes de porc.....	74
2.7	Le microbiote des carcasses et des viandes de porc.....	75
2.7.1	Analyses de biologie moléculaire.....	75
2.7.1.1	Le gène codant pour l'ARNr 16S	76
2.7.1.2	Le séquençage de deuxième génération.....	77
2.7.1.2.1	Préparation de la librairie de séquençage	78
2.7.1.2.2	La technologie Illumina	79
2.7.1.3	Les analyses bio-informatiques.....	82
2.7.1.3.1	Étape de nettoyage des lectures.....	84
2.7.1.3.2	Étape de clustering	86
2.7.1.3.3	Variant de séquence d'amplicon (ASV).....	87
2.7.1.3.4	L'assignation taxonomique	87
2.7.1.4	La profondeur de séquençage.....	88
2.7.1.5	Les analyses du microbiote	89
2.7.1.5.1	La diversité alpha	90
2.7.1.5.2	La diversité bêta.....	93
2.7.1.5.3	Tests d'identification de biomarqueurs microbiens	95
2.7.2	Application générale des méthodes de séquençage de nouvelle génération en microbiologie alimentaire	97

2.7.3	Description du microbiote des carcasses de porcs	99
2.7.4	Description du microbiote de viande emballée sous vide	104
Chapitre 3	– Problématique, hypothèse et objectifs	109
Chapitre 4	– Similar carcass surface microbiota observed following primary processing of different pig batches.....	111
Chapitre 5	– Carcass surface microbiota analysis for investigating the evolution of bacterial communities during pig processing	146
Chapitre 6	– Slight temperature deviation during a 56-day storage period does not affect the microbiota of fresh vacuum-packed pork loins	200
Chapitre 7	– Discussion générale	234
7.1	Choix de la méthodologie	234
7.2	La contamination bactérienne et le microbiote des surfaces des carcasses de porc .	239
7.3	Le microbiote des surfaces des longes de porc emballées sous vide	247
7.4	La détection des bactéries pathogènes à la surface des carcasses et des longes.....	253
Chapitre 8	– Conclusion	259
Références bibliographiques	261

Liste des tableaux

Chapitre 2 – Revue de littérature

Tableau 1. – Caractéristiques microbiologiques, symptômes, réservoirs et sources d’infection des principales bactéries pathogènes responsables de zoonoses d’origine alimentaire associées aux porcs.....	42
Tableau 2. – Critères de rendement (exprimé en UFC/cm ²) relatifs aux organismes indicateurs pour les carcasses de porc établis par le FSIS-USDA et rapportés par l’ACIA [88]......	54
Tableau 3. – Critères microbiologiques des coupes de viandes (exprimés en UCF/g) qui seront cuites avant d’être consommées d’après les lignes directrices et normes pour l’interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire du MAPAQ publiées en 2019 [83].	55
Tableau 4. – Principes majeurs du pyroséquençage et du séquençage par détection de la libération de ions H ⁺	78
Tableau 5. – Potentielles sources d’introduction d’erreurs dans la caractérisation d’un microbiote lors des étapes de l’extraction de l’ADN et de l’amplification par PCR.....	83
Tableau 6. – Caractéristiques des indices de diversité alpha les plus couramment utilisés pour l’analyse de la diversité du microbiote	91
Tableau 7. – Caractéristiques des indices de diversité bêta les plus couramment utilisés pour l’analyse de la diversité du microbiote.	94
Tableau 8. – Liste des applications récentes des méthodes de séquençage de nouvelle génération appliquées aux viandes de porc fraîches et emballées sous vide.	105

Chapitre 4 - Similar carcass surface microbiota observed following primary processing of different pig batches

Tableau 1. – Culture conditions for the enumeration of mesophilic aerobic bacteria, Enterobacteria, <i>Escherichia coli</i> , lactic bacteria, and <i>Pseudomonas</i>	129
Tableau 2. – Percentage of positive carcasses and mean bacterial concentrations for Enterobacteria <i>Escherichia coli</i> , lactic acid bacteria, <i>Pseudomonas</i> , and <i>Salmonella</i> for the top and bottom areas of the carcass surface samples analyzed.....	130

Supplementary material

Tableau 1. – (Supplementary) Complete list of significant associations between carcass area (top or bottom) and relative microbial abundance using Maaslin2	136
--	-----

Chapitre 5 – Carcass surface microbiota analysis for investigating the evolution of bacterial communities during pig processing

Tableau 1. – Mean bacterial counts (\log_{10} CFU/600 cm ² \pm σ) for mesophilic aerobic bacteria, enterobacteria, <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , and lactic acid bacteria and p-values of statistical tests when comparing each bacterial population mean count with samples collected from the top and bottom areas before and after cooling.....	170
Tableau 2. – <i>Salmonella</i> serotypes isolated from samples (collected from the top (n = 384) and bottom (n = 384) areas before cooling from 64 batches and their distribution according to week, visit, and work shift.....	171
Tableau 3. – Comparison of alpha diversity indices (Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices) between samples collected from both (top and bottom) areas between week, visit, and work shift.....	172
Tableau 4. – Comparison of alpha diversity indices (Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices) between samples collected from the top between week, visit, and work shift, as well between samples collected from the top between week, visit, and work shift and bottom areas of 16 batches before and after cooling.....	173
Tableau 5. – Comparison of alpha diversity indices (Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices) between samples collected from the top and bottom areas of 16 batches before and after cooling.....	175
Tableau 6. – Comparison of alpha diversity indices (Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices) between samples collected before and after cooling and between samples collected from the top or the bottom area before and after cooling from 16 batch	176

Liste des figures

Chapitre 2 – Revue de littérature

Figure 1. – Représentation schématique de la technologie d'Illumina (adaptée de l'exploration du principe présenté en 3D par Illumina [196], schéma réalisé avec BioRender)... 82

Chapitre 4 - Similar carcass surface microbiota observed following primary processing of different pig batches

Figure 1. – Mean concentration (log CFU/600 cm²) for mesophilic aerobic bacteria counts for the top and the bottom areas of the pig carcass surface. *p < 0.05. ns, non-significant. 131

Figure 2. – Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure between all samples. The red circle identifies the samples removed from the analysis due to their proximity to the negative controls..... 132

Figure 3. – Mean relative abundance of the major bacterial groups at the phylum level (A), family level (B), and genus level (C) identified in samples representing the top and bottom areas of the pig carcasses. Only bacterial communities representing at least 5% of carcass surface microbiota are shown. 133

Figure 4. – Alpha diversity measures among the top and the bottom areas of the pig carcasses sampled using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices. 134

Figure 5. – Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiome structure of the pig carcass surface according to area (A), top area according to batch (B), and bottom area according to batch (C)..... 135

Supplementary material

Figure 1. – (Supplementary) Alpha diversity analyses using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices between the top and the bottom areas of pigs from six different batches. 137

Figure 2. – (Supplementary) Alpha diversity analyses using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices between the six batches and the top carcass surface samples..... 138

Figure 3. – (Supplementary) Alpha diversity analyses using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices between the six batches and the bottom carcass surface samples. 139

Chapitre 5 – Carcass surface microbiota analysis for investigating the evolution of bacterial communities during pig processing

Figure 1. – Sampling protocol for number of pigs batches sampled. Sampling was performed over a period of 4 weeks. During each week, four visits were conducted on four different days (Monday: #1; Tuesday: #2; Wednesday: #3; Thursday: #4). During each visit, 4 or 5 batches, depending on operation constraints, were sampled. A total of 64 batches were sampled just before the final wash that preceded cooling and 16 batches from these 64 were re-sampled on the next day immediately after the cooling stage. From these 64 batches, 32 batches were sampled during the morning shift and the remaining 32 were sampled during the afternoon shift..... 177

Figure 2. – Illustration of the top and the bottom areas sampled before and after cooling of the same pig carcass. For three carcasses, one sample was collected from the top left side and one sample from the bottom right side (A). The alternate sides were sampled for the remaining three carcasses (B). 178

Figure 3. – Mean relative abundance (%) of bacterial community members (individual representation in microbiota > 5%) identified at the phylum (A), family (B), and genus (C) levels on samples collected from the top (n = 64) and bottom (n = 64) areas before cooling from 64 batches. The category “Others” covers bacterial genera with individual relative abundance <5%..... 180

Figure 4. – Alpha (A) and beta (B) diversity measures for samples collected from the top (n = 64) and bottom (n = 64) areas before cooling from 64 batches using, respectively, Observed, Shannon, Inverse Simpson indices, and non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot to illustrate the comparison of the microbiota structure of pig carcass surfaces, calculated with the Bray-Curtis index, for samples collected from top (n = 64) and bottom (n = 64) areas..... 181

Figure 5. – Mean relative abundance (%) of bacterial community members (individual representation in microbiota > 5%) identified at the genus level from samples collected from the top (n = 16) and bottom (n = 16) areas before and after cooling from 16 batches. The category “Others” regroups bacterial genera with individual relative abundance <5%. 182

Figure 6. – Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure of the pig carcass surface, calculated with the Bray-Curtis index, and comparing samples collected from the top (n = 16) and bottom (n = 16) areas before and after cooling from 16 batches..... 183

Supplementary material

Figure 1. – (Supplementary) Mean relative abundance (%) of bacterial community members (individual representation in microbiota > 5%) identified at the genus level on samples collected

from top (n = 64) and bottom (n = 64) areas before the cooling stage from 64 batches according to week (A), visit (B), and work shift (C). Category “Others” covers bacterial genera with an individual relative abundance <5%. 185

Figure 2. – (Supplementary) Comparison of alpha diversity measures of samples collected from the top (n = 64) and bottom (n = 64) areas according to week (A), visit (C), and work shift (E) using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure of the pig carcass surface, calculated with the Bray-Curtis index, and comparing microbiota of samples collected from the top (n = 64) and bottom (n = 64) areas according to week (B), visit (D), and work shift (F). 187

Figure 3. – (Supplementary) Comparison of alpha diversity measures of samples collected from top areas (n = 64) before cooling according to week (A), visit (C), and work shift (E) using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure of the pig carcass surface, calculated with the Bray-Curtis index, and comparing microbiota of samples collected from the top (n = 64) areas before cooling according to week (B), visit (D) and work shift (F). 189

Figure 4. – (Supplementary) Comparison of alpha diversity measures of samples collected from the bottom (n = 64) areas before cooling according to week (A), visit (C), and work shift (E) using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure of the pig carcass surface, calculated with the Bray-Curtis index, and comparing microbiota of samples collected from the bottom (n = 64) areas before cooling according to week (B), visit (D) and work shift (F). 191

Figure 5. – (Supplementary) Alpha diversity measure samples collected from the top (n = 16) and bottom (n = 16) areas before and after the cooling stage using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices on 16 batches of pig carcasses. 192

Chapitre 6 – Slight temperature deviation during a 56-day storage period does not affect the microbiota of fresh vacuum-packed pork loins

Figure 1. – Sampling of six vacuum-packed pork loins for each condition per batch : control (stable temperature) sampled at day 1, day 21, and day 56; a temperature increase of 2 °C for 2 days at day 15, sampled at day 21 and day 56; a temperature increase of 2 °C for 2 days at day 29, sampled at day 56; a temperature increase of 10 °C for 6 h at day 15, sampled at day 21 and day 56; a temperature increase of 10 °C for 6 h at day 29, sampled at day 56. This sampling was repeated for the 8 batches. 217

Figure 2. – Relative abundance of the major bacterial genera identified from the vacuum-packed pork loin surface microbiota at day 1, 21, and 56. Only bacterial genera representing at least 2% of the total reads are shown. 218

Figure 3. – Alpha diversity measures among the control samples at day 1, 21, and 56 using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices. 219

Figure 4. – Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) illustrating beta diversity, calculated with the Bray–Curtis index according to the day of sampling (D1, D21, D56). Significant differences were found in the vacuum-packed surface microbiota between day 1 and 21, as well as day 1 and 56. No significant difference between day 21 and 56 was seen..... 220

Figure 5. – Relative abundance of the major bacterial genera identified on the vacuum-packed pork loin surface microbiota at day 56 for each batch. Only the bacterial genera representing at least 2% of the total reads are shown. 221

Figure 6. – Alpha diversity measures among the control samples and samples that were subjected to a temperature increase of 2 °C or 10 °C, carried out at day 15 and 29 and sampled at day 56..... 222

Figure 7. – Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) illustrating microbiota beta diversity, calculated with the Bray–Curtis index, comparing control samples to samples that were subjected to a temperature increase of 2 °C or 10 °C, carried out at day 15 and 29, and sampled at day 56..... 223

Supplementary material

Figure 1. – (Supplementary) Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) illustrating microbiota beta diversity, calculated with the Bray-Curtis, according to batch and day of sampling..... 224

Figure 2. – (Supplementary) Alpha diversity measures among the control samples at day 1 and 56 for the 8 batches of the surface of vacuum pork loin sampled using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices..... 225

Liste des sigles et abréviations

ACIA : Agence canadienne d'inspection des aliments

ADN/DNA : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analysis of variance (analyse de la variance)

ARN : Acide ribonucléique

ARNr/rRNA : Acide ribonucléique ribosomal/Ribosomal ribonucleic acid

ASV : Amplicon sequence variant (variant de séquence d'amplicon)

ATCC : American Type Culture Collection

Aw : Water activity (activité de l'eau)

BGA : Brilliant Green Agar (gélose au vert brillant)

BGS : Brilliant Green Sulfa (gélose à la sulfadiazine et au vert brillant)

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool (outil de recherche d'alignement local de base)

bp : Paire de bases

COVID-19 : Coronavirus disease, appeared in 2019

CRIPA : Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole

DALY : Disability-adjusted life years (Années de vie ajustées sur l'incapacité)

DFD : Dark firm dry (sombres fermes sèches)

DGGE : Denaturing gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid (acide éthylènediaminetétraacétique)

EFSA : European food safety authority

FSIS : Food Safety and Inspection Service

HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point (analyse des dangers et points critiques pour leur maîtrise)

HCl : Acide chlorhydrique

H₂S : Sulfure d'hydrogène

INSPQ : Institut national de santé publique du Québec

LAB : Lactic acid bacteria (bactéries lactiques)

MaAsLin : Multivariate Association with Linear Models (association multivariée avec modèles linéaire)

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

Mb : Mégabase

MSRV : Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar (gélose Rappaport-Vassiliadis modifiée semi-solide)

NaCl : Chlorure de sodium

NGS : Next generation sequencing (séquençage à haut débit)

NH₃ : Ammoniac

NMDS : Non-Metric Multidimensional Scaling (positionnement multidimensionnel non métrique)

NSERC : Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (conseil de recherches en sciences naturelles et en génie, CRSNG)

OMS : Organisation mondiale de la Santé

OTU : Operational taxonomic unit (unité taxonomique opérationnelle)

PASA : Programme d'amélioration de la salubrité des aliments

PBS : Phosphate-buffered salin (ampon phosphate saline)

PCoA : Principal coordinates analysis (analyse en coordonnées principales)

PCR : Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PERMANOVA : Permutational multivariate analysis of variance (analyse de variance multivariée par permutations)

pH : Potentiel d'hydrogène

PICRA : Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens

RDP : Ribosomal Database Project

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction (réaction en chaîne de la polymérase après transcription inverse)

SDS : Sodium dodecyl sulfate (dodécylsulfate de sodium)

SOP : Standard operating procedure (procédure d'opération standard)

TIAC : Toxi-infections alimentaires collectives

TSA : Tryptone Soja Agar (gélose tryptone soja)

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

UE : Union Européenne

UFC/CFU : Unité formant colonie/ Colony forming unit

USDA : U.S. Department of Agriculture (Département de l'Agriculture des États-Unis)

XLD : Xylose-Lysine-Desoxycholate

cm : Centimètre

cm²: Centimètre carré

g : Gramme

g : Force g

h : heure

m : Mètre

min : Minute

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

mm : Millimètre

nmol : Nanomole

ng : Nanogramme

p-value/p : Probability value (valeur de probabilité)

s : Seconde

w/v : Weight/Volume (masse/volume)

μL : Microlitre

μm : Micromètre

μM : Micromolaire

°C : Degré Celsius

< : Inférieur à

> : Supérieur à

% : Pourcentage

/ : Par

« Je ne pensais pas que tu en serais arrivée là »

Maman

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Dr Alexandre Thibodeau, pour tout son soutien, ses conseils, son écoute, sa patience, ses encouragements, son aide et sa confiance dans la réalisation de ce doctorat. Je le remercie également pour son support, autant sur le plan professionnel que personnel, pendant ces quatre années. Merci de m'avoir accompagnée tout au long de mon parcours. Je tiens également à remercier mes codirecteurs, Dr Philippe Fravallo, avec qui j'ai commencé mon stage de maîtrise à la Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV), et la Dre Marie-Lou Gaucher, pour leurs conseils et aides pendant la préparation de mes articles. Je remercie les deux stagiaires que j'ai encadrés lors de cette thèse : Marie et Amély. Ce fut une expérience enrichissante pour moi et je vous remercie d'avoir participé à mes projets. Je tiens également à remercier les membres du jury pour l'évaluation de ma thèse.

Je remercie mes présents et anciens collègues de la CRSV : Jessika, William, Mathieu, Fanie, Mélodie, Ilhem, Catherine, Guillaume, Saoussen, Mohamed et Nicole; pour votre aide et votre gentillesse au quotidien. Merci à Guillaume de m'avoir accompagnée dans mes premières analyses bio-informatiques. Je tiens tout particulièrement à remercier Jessika d'avoir mis de côté son projet pendant plusieurs semaines pour m'accompagner et m'aider dans mes échantillonnages. Merci pour son soutien lorsqu'elle était au laboratoire, et même encore à l'heure d'aujourd'hui. Merci de m'avoir accueillie dans un environnement et un pays que je ne connaissais pas et de m'avoir donné envie de m'installer ici au Québec. J'aimerais remercier aussi, William, pour son aide, sa gentillesse, ses rires, ses réponses à mes nombreuses questions, et tout son soutien qu'il m'a apporté pendant ce doctorat. Encore merci à toute cette équipe pour tous les bons moments passés ensemble à l'extérieur du laboratoire.

J'aimerais remercier mes deux meilleurs amis, Laureen et Maxime. Malgré un océan qui nous séparent depuis maintenant cinq ans, vous êtes toujours là pour moi. Merci pour votre soutien et vos encouragements si précieux depuis le début de cette thèse. Merci ma Laureen d'être venue me voir ici pendant ma thèse.

Je tiens à remercier l'homme qui partage ma vie, mon fiancé. Merci pour ton soutien et ta patience depuis notre rencontre. Tu es aux premières loges de toutes les émotions que j'ai traversées durant cette thèse. Merci de me soutenir et de croire en ma réussite.

En dernier lieu, je tiens à remercier ma famille et particulièrement mes parents. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous, à votre soutien, votre confiance, votre patience, vos encouragements, vos conseils et surtout votre amour inconditionnel. Vous m'avez tout donné afin d'avoir eu la chance de réaliser ce doctorat au Canada. J'espère vous rendre fière. Merci à vous deux. Je vous aime.

Chapitre 1 – Introduction

Le porc compte parmi les produits alimentaires les plus consommés dans le monde [1]. Au Canada, plus de 8 000 fermes porcines sont en opération et près de 22 millions de porcs ont été abattus, représentant plus de 2 millions de tonnes de viande de porc produites en 2021 [2]. Plus de 40 % de l'abattage de porc au Canada est réalisé dans la province du Québec. En 2019, le Canada a exporté plus de 1,4 million de tonnes de porc dans le monde entier, représentant une valeur de 4,96 milliards de dollars canadiens. Le Québec est le principal exportateur de viande de porc du Canada et les principaux pays d'exportation d'outre-mer sont la Chine et le Japon [3]. Alors que les consommateurs portent une attention croissante sur l'origine des produits et exigent des produits de viande de haute qualité, les producteurs et les transformateurs font face à des défis pour réduire au minimum la contamination microbienne des produits et ainsi améliorer et assurer la qualité microbiologique et la salubrité des viandes.

La viande est l'un des aliments les plus périssables. Sa teneur élevée en nutriments et en eau libre favorise la croissance de nombreux microorganismes, principalement les bactéries [4]. Parmi ces bactéries, des agents pathogènes zoonotiques responsables des toxi-infections alimentaires chez l'humain et des bactéries dites « d'altération », responsables de la détérioration de la viande, sont retrouvées [4–9]. La consommation de viande de porc contaminée est une source majeure des maladies humaines d'origine alimentaire [10]. *Salmonella* est l'une des principales bactéries pathogènes zoonotiques associées à la production porcine et est responsable de la salmonellose. Par exemple, aux États-Unis, il a été estimé que *Salmonella* cause environ 35 % des maladies liées à la consommation de porc [11]. La présence de ces bactéries pathogènes sur les carcasses de porc en fin d'abattage et sur les produits finis demeure une préoccupation de santé publique. Au Canada, la prévalence de *Salmonella* retrouvée chez les porcs à l'arrivée à l'abattoir s'élevait à plus de 60 % en 2019 [12].

La croissance microbienne est la cause la plus fréquente de l'altération des viandes et est à l'origine de la modification des propriétés organoleptiques perceptibles par les consommateurs, telles que le changement de couleur, d'apparence et de texture ou l'apparition d'odeurs nauséabondes [4,7]. Cette détérioration des aliments entraîne d'énormes pertes économiques, aussi bien pour les producteurs, les transformateurs et les consommateurs et contribue fortement au gaspillage alimentaire [8]. Le type de bactéries et leurs charges dépendent de la contamination initiale et des conditions d'entreposage (température, conditionnement). Ces conditions influencent le développement des différentes populations microbiennes impliquées dans l'altération, affectant ainsi le type et la vitesse du processus de détérioration [9]. Les micro-organismes les plus couramment impliqués sont les bactéries aérobies mésophiles ou psychrophiles et les bactéries lactiques. Pour augmenter la durée de vie des viandes, les viandes de porc fraîches sont généralement emballées sous vide ou sous atmosphère modifiée [13]. Associés à des conditions d'entreposage où la température est abaissée à 1 ou 2°C en-dessous du point de congélation, ces processus d'emballage permettent d'augmenter jusqu'à quatre fois la durée de vie des produits rapport à celle des viandes non emballées et entreposées à 4°C, principalement en ralentissant la croissance microbienne tout en conservant les qualités nutritives et organoleptiques des viandes [4,14–16]. Toutefois, ils ne permettent pas d'inhiber entièrement la croissance des bactéries d'altération ou des bactéries pathogènes [17–21].

La contamination initiale des carcasses est un processus inévitable pendant l'abattage et la transformation est un point-clé affectant la dynamique d'altération et la présence d'agents pathogènes sur la viande [22–29]. Les bactéries colonisant les poils, le tube digestif, la peau et les matières fécales des porcs sont les principales sources de contamination des carcasses lors du processus de transformation de ces animaux en viande. Par exemple, il est connu que l'éviscération est une étape critique qui entraîne une contamination des carcasses par les bactéries pathogènes retrouvées dans le tube digestif de l'animal renfermant un microbiote bactérien lorsque l'application des bonnes pratiques n'est pas optimale [10,30,31]. La contamination des carcasses peut également être d'origine environnementale et provenir de l'eau, de l'équipement, des matériaux ou des surfaces telles que les convoyeurs qui entrent en

contact avec les carcasses [26,32–34]. De plus, la manipulation des carcasses et des viandes par les travailleurs peut contribuer à cette contamination. Par conséquent, les contaminations croisées peuvent se produire entre les carcasses et tout ce qui entre en contact direct ou indirect avec elles, contribuant ainsi à la composition bactérienne et à la charge microbienne des viandes avant l'entreposage. Ainsi, pour réduire le risque de contamination des carcasses, il a été démontré que l'application de bonnes pratiques d'hygiène est essentielle. Certaines bactéries sont capables de persister et de croître malgré la mise en place des procédures de lavage et de décontamination des carcasses et de l'environnement, des conditions d'entreposage au froid et l'emballage des produits finis [20,35–37].

Jusqu'alors, les communautés microbiennes de surface des carcasses et des viandes ont été le plus souvent décrites par des méthodes faisant appel à la microbiologie classique, soit des méthodes dépendantes de la culture [4]. Cependant, les mesures de surveillance et les contrôles microbiologiques mis en place à l'abattoir utilisant des méthodes de culture classique ne permettent pas de caractériser toute la contamination microbienne [4,38]. Aujourd'hui, les méthodes de séquençage à haut débit permettent de caractériser l'ensemble des bactéries présentes dans un environnement sans devoir passer par l'étape de la culture. L'ensemble de la composition des populations bactériennes composant le microbiote des carcasses et des viandes, ainsi que sa diversité sont très peu connus en production porcine. L'hypothèse de cette thèse est donc que le microbiote, des carcasses et des produits finis de porc, peut être utilisé comme indicateur de la salubrité alimentaire. Les principaux objectifs de ce travail étaient de décrire la variabilité du microbiote de surface des carcasses de porc et celui des viandes de porc emballées sous vide, en fonction de la provenance des animaux, des étapes du procédé d'abattage, des conditions d'entreposage, mais aussi de décrire la variation de ce microbiote dans le temps.

Le premier objectif de cette étude a été de décrire la variabilité du microbiote de surface des carcasses en fonction de la provenance des animaux, en utilisant une approche de séquençage à haut débit. Le but était de déterminer si ce microbiote variait selon le lot à la suite de l'abattage et de l'habillage des carcasses et s'ils pouvaient être associés à la ferme d'origine des animaux. Le

deuxième objectif était d'investiguer la variation du microbiote des carcasses de porc pendant quatre semaines, à la suite du processus d'habillage des carcasses, et d'étudier l'impact du refroidissement des carcasses sur ce microbiote. Enfin, le troisième objectif était d'étudier l'évolution du microbiote de produits finis de porc (longes) emballés sous vide sur une période de plusieurs semaines, qui imite l'exportation outre-mer, de déterminer la variation de ce microbiote entre les produits provenant de différents lots de porcs abattus, ainsi que de déterminer l'impact de différents écarts de température d'entreposage sur ce microbiote. Le but était de déterminer si le microbiote de surface de viande peut être utilisé comme signature de la perte de contrôle sanitaire dans la chaîne de distribution.

Chapitre 2 – Revue de littérature

2.1 L'industrie porcine

A l'échelle mondiale, le porc est l'une des viandes les plus consommées. Jusqu'en 2015, la consommation de la viande de porc était la plus élevée par rapport aux autres viandes (volaille, bœuf, etc.). En 2022, la production mondiale de viande de porc était estimée à 110 500 millions de tonnes. En comparaison, la production mondiale de viande de volaille et de bœuf atteignait 132 500 et 70 500 millions de tonnes, respectivement. La consommation mondiale annuelle de porc est quant à elle estimée à plus de 110 millions de tonnes équivalent-carcasses [1]. La Chine, l'Union européenne (UE) et les États-Unis consomment plus de 70 % de la production mondiale de porc [3]. À l'échelle mondiale, la consommation du porc était stable jusqu'en 2018, et depuis, a connu une diminution d'environ 10 %. Cette diminution s'explique par deux événements majeurs mondiaux, à savoir l'épidémie de peste porcine africaine déclarée en Chine à la fin de 2018 qui s'est propagée en Asie et en Europe, et la pandémie de COVID-19 [3]. En effet, l'épidémie de peste porcine africaine, particulièrement en Chine, a décimé les cheptels porcins et réduit considérablement la quantité de carcasses disponibles. La pandémie de COVID-19 a également eu un impact sur les opérations d'abattage et de découpe au Canada et dans le monde, réduisant ainsi l'offre. Ces événements ont limité l'accès à la viande de porc à partir de 2019 et ainsi influencé les marchés d'exportation de l'Amérique du Nord, dont celui du Canada. La diminution de la consommation de viande porcine est également liée aux répercussions de la hausse des prix de la viande, combinée à une baisse générale des revenus des ménages, ainsi que la fermeture des établissements de restauration lors de la pandémie de COVID-19. Malgré tout, les perspectives mondiales indiquent une croissance annuelle de la consommation de porc jusqu'en 2030, avec à cette date, une estimation de plus de 128 000 millions de tonnes de viande consommées [1].

2.1.1 Les données sur la production porcine au Canada et au Québec

Le Canada compte plus de 8 000 fermes porcines en activité, abattant environ 22 millions de porcs, et représentant plus de 2 millions de tonnes de viande de porc en 2021 [2]. La consommation de viande porcine est de 22,2 kg par personne par année au Canada [39]. Plus de 40 % de l'abattage de porc au Canada ont lieu au Québec, ce qui place la province en tant que premier producteur de porcs au Canada. Les producteurs de porcs se retrouvent principalement dans les régions Chaudière-Appalaches (32 %), Montérégie (30 %), et dans le Centre-du-Québec (13 %). En 2020, plus de 1 800 fermes porcines étaient présentes sur le territoire québécois. Le nombre de fermes porcines au Québec a diminué de 5 %, mais le nombre moyen de porcs par ferme a augmenté de 7 %, avec un nombre moyen de près de 7 500 porcs par ferme [3]. De 2015 à 2020, la consommation du porc par personne a diminué au Québec pour atteindre 24,5 kg, alors que la consommation de bœuf ou de poulet a augmenté. Toutefois, la consommation de porc au Québec reste supérieure à la moyenne canadienne qui est de 18,8 kg. En 2020, Le Québec, comme le Canada, a observé une hausse des prix à la consommation [40]. Les viandes de porc fraîches et surgelées ont connu une hausse de prix de 12 % [3]. Ces augmentations sont étroitement liées à la baisse de la production mondiale, combinées aux difficultés apportées par la pandémie de COVID-19.

Annuellement, le Canada se place en tant que troisième exportateur de porc au monde. En 2019, le Canada a exporté plus de 1,4 million de tonnes de porc, représentant une valeur de 4,96 milliards de dollars canadiens. Le Québec est principal exportateur de viande de porc du Canada. En 2020, les principaux pays exportateurs étaient la Chine (46 %), les États-Unis (23 %) et le Japon (17 %) [3].

2.1.2 Les étapes de transformation des animaux en viandes

2.1.2.1 L'élevage de porc

L'élevage de porc se compose de trois périodes spécifiques : le naissage, le post-sevrage (ou pouponnière) et l'engraissement. En résumé, le naissage comprend les étapes de fécondité, de gestation et de maternité. Les truies sont fécondées par insémination artificielle ou par saillie. La

période de gestation des truies dure 3 mois, 3 semaines et 3 jours. Au terme de la gestation, les truies mettent bas à une portée moyenne d'une douzaine de porcelets dans des cages individuelles pour la protection de ces derniers. Au Québec, après 21 jours d'allaitement, les porcelets vont être séparés de leurs mères et envoyés dans une autre ferme, dite de post sevrage. Ils vont alors, durant 6 à 8 semaines, y être nourris avec des aliments solides comme des granulés à base de mélange de céréales telles que le blé et l'orge qui apportent de l'énergie, du soya qui apporte des protéines et des sels minéraux et vitamines[41]. À l'issue du post-sevrage, les porcs partent en engraissement pour une durée de 3 à 4 mois, phase pendant laquelle la composition de l'alimentation est adaptée à l'évolution des besoins physiologiques de la forte croissance (ratio protéines énergie). À la fin de l'engraissement, les porcs dits charcutiers, pèsent plus de 100 kg et sont prêts à être envoyés à l'abattoir pour la transformation en viande après leurs examens réalisés par des vétérinaires de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) pour s'assurer qu'ils sont aptes au transport [42]. Les porcs sont transportés dans des camions réservés au transport d'animaux, qui sont lavés avant et après chaque chargement d'animaux. L'ensemble des exigences relatives aux transport (chargement, densité, facteurs météorologique, circulation de l'air) permet d'assurer le bien-être animal.

2.1.2.2 Le processus d'abattage

A l'arrivée à l'abattoir, les porcs sont déchargés via des rampes et des quais adaptés, assurant leur bien-être. Après réception, les porcs sont installés dans des parcs d'attente où leur traçabilité est contrôlée. Une inspection *ante mortem* est réalisée par les inspecteurs de l'ACIA vérifiant l'état de santé global des animaux, et détectant la présence de tout signe apparent de maladies ou même de défauts qui pourraient rendre la viande impropre à la consommation humaine. Lorsque l'inspecteur soupçonne que l'animal présente des écarts par rapport au comportement ou à la physiologie qui sont considérés comme normaux, celui-ci doit être inspecté par un vétérinaire de l'ACIA. Dans le cas où le vétérinaire condamnerait l'animal, ce dernier doit être désigné comme étant non comestible [43,44].

Les animaux sains sont assommés, soit par étourdissement au dioxyde de carbone, soit par un choc électrique, ce qui déclenche, dans les deux cas, la perte de conscience immédiate en minimisant la douleur de l'animal [45]. Avant que l'animal ne soit relevé par les pattes et accroché à la chaîne d'abattage, l'état d'inconscience est vérifié visuellement en s'assurant de l'absence de respiration rythmique ou de réflexes oculaires par exemple. La saignée est réalisée manuellement conduisant à la mise à mort de l'animal par le sectionnement des veines jugulaires. Lors de l'exsanguination, le sang est collecté pour la production de boudin ou autres produits sanguin à destination de la consommation humaine. Les carcasses sont ensuite échaudées. L'échaudage par immersion est la technique la plus répandue, comparativement à l'échaudage vertical à l'eau chaude ou à la vapeur. Les carcasses sont immergées pendant quelques minutes (5-6 minutes) dans un bassin d'eau chaude dont la température varie le plus souvent entre 59°C et 65°C. Cette étape permet d'éliminer plus facilement les poils lors de l'opération d'épilation. Les carcasses sont donc épilées mécaniquement à l'aide de racleurs, puis flambées et grattées avant d'être lavées à l'eau. Ces étapes permettent de détacher et d'éliminer les résidus, tels que les poils (appelés soies), les pellicules épidermiques et les particules de saleté résiduelles.

Après l'ouverture abdominale, les carcasses sont éviscérées afin de procéder à l'ablation de tous les viscères de l'animal. Les viscères intestinaux sont déposés dans des nacelles ou des bacs et ceux du système cardio-respiratoire sur des crochets, et leurs cheminements sur la chaîne suit celui de la carcasse jusqu'à l'inspection. Chaque viscère doit en effet être obligatoirement identifié avec sa carcasse correspondante. Une fois éviscérées, la tête est partiellement sectionnée. Les carcasses sont fendues en deux longitudinalement jusqu'au cou à l'aide d'une scie électrique et le gras est ensuite retiré de l'intérieur de la cavité des carcasses. Avant d'être à nouveau lavées, les carcasses doivent être parées et vérifiées afin qu'elles ne comportent aucun défaut d'habillage (lésion, contaminant). Les viscères sont alors acheminés dans un autre département et sont valorisées en alimentation humaine ou animal selon les besoins [46]. L'inspection *post mortem* de la tête, des viscères et des carcasses est réalisée par des inspecteurs de l'ACIA. L'inspection de la tête consiste à un examen visuel de celle-ci et de tous les nœuds lymphatiques (excision et inspection des nœuds lymphatiques mandibulaires). L'inspection des

viscères consiste en l'examen visuel de l'estomac, des intestins, de la rate, des nœuds lymphatiques mésentériques au niveau de l'iléon, et d'autres nœuds lymphatiques (hépatique, des poumons, du foie, des reins, trachéobronchique gauche). L'inspection des carcasses consiste à faire l'inspection visuelle de l'extérieur et de la cavité interne, y compris des nœuds lymphatiques iliaques. Dans le cas où une carcasse présente un défaut, signifiant une pathologie, celle-ci, accompagnée de ces viscères correspondants est examinée individuellement par un vétérinaire de l'ACIA et doit être condamnée si un parage ne permet pas de la rendre conforme. [43,44]

Les carcasses sont ensuite pesées et classées selon leurs caractéristiques (poids, teneur estimée en viande maigre). Pour finir, avant le refroidissement en chambre froide, l'ablation de la tête est réalisée. Alors, les demi-carcasses sont transférées dans une chambre froide pour l'étape de refroidissement, un froid choc (air pulsé) pour une descente rapide de la température de surface, puis le refroidissement statique qui permet d'abaisser la température des carcasses de 39°C à 7°C en moins de 24 heures. La température des chambres froides se situant entre 0 et 5°C permet d'atteindre cet objectif.

2.1.2.3 La découpe et la transformation

À la sortie du refroidissement, les carcasses sont acheminées dans le département de découpe et de transformation. La tête est entièrement sectionnée au début des étapes de la découpe. Les carcasses sont sectionnées en deux avec une lame automatisée et sont déposées sur deux convoyeurs distincts. La première découpe, dite primaire, consiste à séparer chaque quart de carcasse en quatre pièces : le jambon, l'épaule, la poitrine et la longe. La découpe secondaire est réalisée selon les spécifications et le cahier des charges des clients, ainsi que la destination finale des produits. Les pièces issues de la découpe primaire sont préparées et transformées, le plus souvent découennées, désossées, dégraissées, dénervées, tranchées et découpées selon les pratiques industrielles qui correspondent soit à une opération manuelle réalisée par des employés, soit à une étape automatisée faisant appel à des équipements spécialisés. Les pièces de viande sont en tout temps maintenues à des températures de 4°C et moins [4].

2.1.2.4 L'emballage, l'entreposage et l'expédition des viandes

Après les découpes, les produits vont être emballés et étiquetés avant l'expédition. Il existe, pour les viandes fraîches et réfrigérées, plusieurs types d'emballage. Le type de conditionnement est adapté au produit et est établi selon les spécifications des clients. L'emballage « pré-emballé » s'effectue dans des barquettes sous film plastique perméable à l'air. L'emballage sous vide consiste à retirer la totalité de l'air présent et ensacher la pièce en conditions hermétiques. Dans le même ordre d'idées, l'emballage sous atmosphère modifiée consiste à remplacer l'air à l'intérieur de l'emballage par un gaz ou un mélange gazeux, tels que le dioxyde de carbone ou l'azote. Ces types d'emballage permettent d'augmenter la durée de vie et donc de conservation des pièces fraîches, tout en préservant la qualité nutritive et organoleptique de celles-ci [15]. Associé à un entreposage à basse température, la croissance microbienne se voit ainsi ralentie, la viande se détériore moins vite et les aliments se conservent environ quatre fois plus longtemps [4,13,14,37].

Les viandes et produits de viande sont ensuite étiquetés et expédiés. L'ACIA a établi des exigences en matière d'étiquetage des produits de viande qui sont fabriqués et transformés au Canada et qui sont destinés au commerce interprovincial, à l'importation ou à l'exportation [47]. En résumé, il doit être mentionné le nom du produit, la liste des ingrédients, la quantité nette, le nom et principal lieu de production, le pays d'origine, les instructions d'entreposage, le code de lot, la date limite de conservation, ainsi que l'estampille d'inspection. L'ACIA présente également les informations relatives à la satisfaction des exigences vétérinaires, de salubrité, d'emballage, d'étiquetage et selon les certifications requises par la plupart des pays vers lesquels le Canada exporte des viandes et des produits de viande. Les exigences sont donc spécifiques à chaque pays en matière d'exportation. Par exemple, les exploitants qui exportent de la viande aux États-Unis doivent respecter les normes établies par la réglementation du Service de sécurité et d'inspection des aliments (FSIS) du Département de l'Agriculture des États-Unis (USDA) et ces mêmes directives sont utilisées lors de la réception pour déterminer la conformité des produits importés [47,48].

Messages clés

- Le Québec est le premier producteur de porc au Canada (40 % de 2 millions de tonnes de viandes produits en 2021)
- Malgré l'impact de la pandémie mondiale de la COVID-19 sur les marchés d'exportation (diminution de l'offre), le Québec est le principal exportateur de viande de porc du Canada vers la Chine, les États-Unis et le Japon
- Les transformateurs doivent respecter et répondre aux exigences liées aux procédures d'abattage et de transformation des animaux dont la viande est destinée à la consommation humaine établies par l'Agence canadienne d'inspection des aliments
- L'inspection *ante mortem* permet de déterminer la santé globale des animaux avant l'abattage, tandis que l'inspection *post mortem* permet de détecter les défauts ou des pathologies visibles des carcasses et des viscères
- Les principales étapes de transformation des animaux en viandes sont : étourdissement, saignée, échaudage, épilation, éviscération, fendage, parage, lavage à l'eau, refroidissement, découpe primaire et secondaire
- Il existe plusieurs types d'emballage des viandes et l'emballage sous vide ou sous atmosphère modifiée comparé aux « pré-emballé » permet d'augmenter la durée de vie et de conservation des viandes

2.2 Les différents types d'altérations de la viande

L'altération de la viande est un processus naturel entraînant des changements indésirables des caractéristiques sensorielles, telles que l'apparence, la texture, l'odeur et la saveur. La viande devient alors impropre à la consommation humaine. Différents types d'altération existent : physique, biochimique, chimique et biologique [49]. L'altération physique se caractérise par des changements physiques sur la texture de la viande pouvant être causés par des chocs, ou par une oxydation des pigments de la viande responsable de l'apparition de couleurs anormales lorsque l'emballage n'est plus conforme. L'altération biochimique est associée aux enzymes présentes naturellement dans les viandes et est responsable par exemple du brunissement enzymatique dû à la conversion des composés phénoliques en polymères colorés. L'altération chimique (oxydation des lipides) est principalement responsable de la production des odeurs (rancissement). Pour finir, l'altération biologique est provoquée par la prolifération et l'action de microorganismes tels que des bactéries, des champignons, ou via des substances libérées par ceux-ci. L'altération microbienne est la cause la plus fréquente des modifications de la qualité des

aliments (odeurs désagréables, saveurs désagréables, formation de boue visqueuse appelée slime), engendrant des pertes économiques non négligeables et participant à l'augmentation massive du gaspillage alimentaire [4,7]. Il a été estimé que plus de 25 % de la nourriture produite dans le monde est gaspillée avant la distribution chez le consommateur en raison de l'altération microbienne [8,50].

2.3 Les bactéries responsables de l'altération

La viande représente l'une des denrées alimentaires les plus périssables [4]. Sa forte teneur en nutriments et en eau libre la rend favorable pour la croissance d'une grande variété de bactéries [4,9]. La durée de conservation des viandes et des produits de viandes est la période pendant laquelle les aliments conservent leurs caractéristiques qualitatives, jusqu'à l'apparition visible de phénomènes d'altération, ou le dépassement de valeur de dénombrement de bactéries indicatrices (critères microbiologiques) [7,8,51]. L'altération microbienne de la viande crue est principalement due au développement microbien indésirable pendant l'entreposage. Le type de bactéries et leur concentration finale dépendent de la contamination initiale (juste avant l'emballage) de la viande [8]. Il est connu que les viandes sont initialement contaminées lors du processus d'abattage et de transformation des carcasses [6,23,26–28]. La croissance des bactéries retrouvées sur la surface de la viande est affectée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les paramètres intrinsèques de la viande qui affectent la croissance microbienne sont : la teneur en éléments nutritifs, la disponibilité en eau libre, le pH, la pression osmotique, le potentiel d'oxydoréduction et la présence d'agents antimicrobiens naturels tels que des enzymes [38]. Les paramètres extrinsèques des aliments ne dépendent pas de la viande. Ce sont les propriétés de l'environnement d'entreposage qui affectent à la fois les viandes et la croissance des bactéries, et correspondent à la durée et la température d'entreposage, l'humidité relative, et la composition de l'atmosphère de l'emballage. Parmi ces facteurs, la température d'entreposage est considérée comme l'un des facteurs les plus importants affectant la croissance des bactéries présentes sur la viande [4].

On retrouve à la surface de la viande un ensemble de bactéries composé principalement d'*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Brochothrix* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Psychrobacter* spp., *Moraxella* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., les bactéries lactiques (LAB) et différents genres de la famille des entérobactéries [4,6–9,52]. Toutes les bactéries initialement présentes ne contribuent pas nécessairement à l'altération des viandes. L'environnement exerce une pression de sélection sur la communauté microbienne, et les bactéries les mieux adaptées à l'environnement deviendront dominantes et atteindront un nombre élevé, contribuant ainsi à la détérioration de la viande. Ainsi, par exemple, la viande est considérée comme altérée lorsque la concentration des bactéries mésophiles aérobiques totales atteint 10^7 UFC/g [9].

Les bactéries responsables de l'altération des viandes sont capables de croître à des températures de réfrigération et sont essentiellement des bactéries psychrophiles, anaérobies facultatives (exclusives ou non), ou aérobies. Le processus d'altération se fait donc principalement à la surface des aliments. Selon la littérature, les principales bactéries associées à l'altération et majoritairement présentes sur la viande de porc sont : *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* (*Serratia*, *Hafnia*, *Enterobacter*), LAB (*Carnobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp.), *Brochothrix thermosphacta* et *Clostridium* spp [4,6–9,52]. Les caractéristiques de l'altération microbienne de la viande dépendent de la disponibilité des substrats tels que le glucose, l'acide lactique, les composés azotés et les acides aminés libres présents sur la viande. Ces substrats sont les principaux précurseurs des métabolismes microbiens responsables de l'altération [4,6–9,52].

2.3.1 Les bactéries associées à l'altération des viandes sous aérobiose

Sur la viande de porc fraîche emballée sous aérobiose, *Pseudomonas* spp. est la principale bactérie psychrotrophe responsable de l'altération. *Pseudomonas* est une bactérie bacille à Gram négatif, droite ou légèrement incurvée, de $1\mu\text{m}$ de diamètre sur $5\mu\text{m}$ de longueur, oxydase positive, non sporulée et mobile grâce à des flagelles. Cette bactérie est aérobienne stricte, c'est-à-dire qu'elle croît seulement en présence d'oxygène. Elle est également psychrotrophe, et donc capable de croître à des températures inférieures à 4°C , semblable à la température des réfrigérateurs chez les consommateurs [4,8,9]. Elle contribue majoritairement aux odeurs

nauséabondes lorsque sa concentration atteint 10^7 UFC/g [9]. *Pseudomonas* spp. est une bactérie protéolytique et est responsable de la putréfaction de la viande. *Pseudomonas* spp. croît rapidement en raison de son court temps de génération (environ 8, 10 et 46 minutes à 37°C, 25°C et 4°C, respectivement, à pH = 6 et $a_w = 0.97$ [53]) en utilisant d'abord le glucose comme source d'énergie. Lorsque le glucose est épuisé, *Pseudomonas* utilise les acides aminés comme substrat. Il y a alors production d'enzymes protéolytiques et formation des aminés libres et des composés azotés, tels que l'indole et le tryptophane qui sont responsables des odeurs nauséabondes. *Pseudomonas* spp. est également responsable des odeurs sulfuriques provenant de la formation d'un composé soufré, le sulfure de diméthyle. *P. fragi* est l'espèce de *Pseudomonas* la plus retrouvée sur des viandes altérées et entreposées à basse température en aérobiose, suivie de *P. lundensis* et *P. fluorescens*. *Pseudomonas fragi* peut également être retrouvé sur les viandes emballées sous vide ou sous atmosphère modifiée [4]. Récemment, une nouvelle espèce de *Pseudomonas*, *P. carnis*, a été isolée sur la viande de porc altérée et a été apparentée à 94 % des espèces *P. lactis* et *paralactis* [54].

Les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives, oxydase négatives et sont capables de fermenter le glucose. Certaines *Enterobacteriaceae* sont mobiles grâce à leurs flagelles péritriches. Parmi elles, les genres *Serratia*, *Enterobacter* et *Hafnia* contribuent principalement à la détérioration de la viande [6,9]. Les espèces de *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei* et *Enterobacter agglomerans* possèdent de forts potentiels d'altération car elles sont équipées d'enzymes protéolytiques efficaces. *E. agglomerans* peut être retrouvé sur la viande emballé en aérobiose, tandis qu'*H. alvei* est souvent retrouvé sur la viande emballée sous vide ou sous atmosphère modifiée et est responsable du verdissement de la viande. Les bactéries productrices de sulfure d'hydrogène (H_2S) sont responsables du verdissement en produisant des pigments verdâtres à partir de la myoglobine [38]. Le genre *Serratia* est le genre le plus couramment retrouvé sur la viande emballée sous atmosphère modifiée et il a été rapporté que *S. liquefaciens* est l'espèce dominante des entérobactéries retrouvée dans les produits de porc entreposés à des températures de refroidissement [4]. Les composés soufrés sont responsables des odeurs sulfuriques (provenant

du sulfure d'hydrogène formé par les entérobactéries). Elles sont également responsables des odeurs dites « de fromage » provoquées par la formation d'acétoïne, de diacétyl et de 3-méthylbutanol [7].

2.3.2 Les bactéries associées à l'altération des viandes emballées sous anaérobiose

Dans les produits emballés sous atmosphère modifiée ou sous vide, les agents responsables de l'altération vont être différents de ceux retrouvés sur la viande fraîche entreposée à l'air, en raison du changement de composition de l'atmosphère. Le passage d'une atmosphère riche en oxygène à une atmosphère n'en contenant pas, entraîne une transition des bactéries aérobies vers les espèces anaérobies facultatives [4]. Ainsi, dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux bactéries d'altération retrouvées sur les viandes emballées sous vide.

Les bactéries lactiques (LAB) et leurs espèces les plus impliquées dans l'altération des viandes emballées sous vide sont constituées des lactobacilles hétérofermentaires (*Lactobacillus* spp., principalement *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus curvatus*) ou homofermentaires, (*L.acidophilus*, *L.salivarius*), *Leuconostoc* spp. et *Carnobacterium* spp. (*C. maltaeomaticum* et *C. divergens*). Néanmoins, si elles peuvent aussi être retrouvées sur des viandes emballées dans des conditions aérobies, elles sont prédominantes dans les environnements où le potentiel d'oxydoréduction est négatif. Les LAB homofermentaires produisent exclusivement de l'acide lactique, tandis que les LAB hétérofermentaires produisent une quantité importante de métabolites indésirables dans la viande, tels que l'éthanol, l'acide acétique, l'acide butanoïque et l'acétoïne avec pour conséquence des odeurs désagréables et des changements de texture, comme la formation de slime et un verdissement de la viande [38]. *Lactobacillus* est le genre dominant le plus retrouvé sur la viande de porc emballée sous vide [4]. Il a été démontré que *Carnobacterium divergens* est une espèce prédominante sur la viande crue quelles que soient les conditions d'emballage, et elle est autant retrouvée sur des viandes emballées sous vide ou non. Il a également été démontré que *C. divergens* est couramment associée à la détérioration de la viande, tandis que le rôle de *C. maltaeomaticum* dans l'altération de la viande a été montré comme négligeable [55]. Dans les produits emballés sous vide, la dominance des LAB est

maintenue, même lorsque les températures d'entreposage à 4°C ne sont pas respectées. Il a été démontré que *Carnobacterium* domine sur la viande emballée sous vide à -1,5°C, alors que *Lactobacillus* domine à 4°C et 7°C [38].

Brochothrix thermosphacta est une autre bactérie d'altération importante retrouvée sur la viande fraîche de porc emballée sous vide [4,7,9,38]. Elle peut également être retrouvée sur la viande sous aérobiose [4,56]. *B. thermosphacta* utilise les acides aminés comme source d'énergie et contribue aux odeurs nauséabondes en raison de son métabolisme [38]. Contrairement à *Pseudomonas*, *Brochothrix thermosphacta* est plus impliquée dans l'acidification que dans la putréfaction [9]. Dans ce cas-là, l'altération des viandes causée par *Brochothrix thermosphacta* n'est pas protéolytique. Il a été rapporté que *Brochothrix thermosphacta* est capable de tolérer de fortes concentrations de sel et de croître à la fois à basse température en présence de peu d'oxygène (> 0.2 %) et une faible activité de l'eau [20]. Récemment, il a été démontré que l'apparition d'altération de la viande par *Brochothrix* nécessite une interaction avec d'autres espèces microbiennes, tel que *Photobacterium* [57].

Les odeurs « de fromage » provoquées par la formation d'acétoïne, de diacétylène et de 3-méthylbutanol sont également produites par les lactobacilles homofermentaires et *Brochothrix thermosphacta*. Les bactéries responsables du verdissement de la viande de porc sont *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus sakei* et *Hafnia alvei*, ainsi que *Shewanella putrefaciens* [38], en raison de leur capacité à produire du H₂S [4,58]. *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus curvatus* sont également responsables de la formation de boue visqueuse (slime) dans les produits emballés sous vide. La slime se caractérise comme de longues cordes de polysaccharides indésirables entre la surface du produit et l'emballage [38].

Il a été observé qu'*Acinetobacter* spp. et *Moraxella* spp. sont considérés comme des bactéries d'altération majoritairement présentes sur la viande dans une condition aérobie entreposée à différentes températures allant de -2 à 25°C [38]. Néanmoins, *Acinetobacter* spp. et *Moraxella* spp. ont été retrouvées dans les produits de viande emballés sous vide [58] ou sous atmosphère

modifiée [59]. *Moraxella* possède le même métabolisme d'altération que *Pseudomonas*, impliquant la production d'enzymes protéolytiques. Toutefois, il a été démontré que *Acinetobacter* possède un faible potentiel d'altération, car elle ne produit pas les acides aminés libres et composés azotés (NH₃, indole, tryptophane) associés aux odeurs nauséabondes [38].

Enfin, certaines espèces de *Clostridium* psychrotrophes telles que *Clostridium putrefaciens* ont été associées à la détérioration de la viande emballée sous vide. Ces bactéries utilisent préférentiellement le glucose comme substrat, avec une fermentation butyrique produisant de l'acide butyrique, du butanol, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène qui sont responsables de la décoloration de la viande [38]. *Clostridium* spp. est également responsable de la production d'une grande quantité de gaz et est principalement associée à ce que l'on appelle « l'emballage soufflé » [38]. Dans ce type d'altération, les LAB jouent aussi un rôle important dans la production de composés organiques volatiles présents dans l'espace libre de « l'emballage soufflé » de la viande altérée et donc responsables des odeurs nauséabondes [60].

Messages clés

- L'altération microbienne des viandes, caractérisée par des odeurs nauséabondes, verdissement ou par la formation de slime, diffère en fonction du : type de bactéries impliquées, de leurs conditions de croissance, de leurs concentrations et de leurs métabolismes d'altération, mais aussi de la température de l'entreposage et de la composition de l'atmosphère de l'emballage
- Les principales bactéries associées à l'altération majoritairement présentes sur la surface des viandes de porc « pré-emballées » sont : *Pseudomonas* spp. (lorsque sa concentration dépasse 10⁷ UFC/mL par exemple) et *Enterobacteriaceae* (*Serratia*, *Hafnia*, *Enterobacter*)
- Sur des viandes emballées sous vides (et donc sans oxygène), les principales bactéries responsables de l'altération sont des espèces anaérobies facultatives tels que : les bactéries lactiques (*Carnobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp.), *Brochothrix thermosphacta* et *Clostridium* spp

2.4 Les bactéries responsables des maladies d'origine alimentaire

2.4.1 Les maladies d'origine alimentaire

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a déclaré que plus de 600 millions de personnes, soit environ une personne sur 10 dans le monde, tombent malades chaque année après avoir consommé des aliments contaminés. Ainsi, les aliments impropres à la consommation représentent une menace pour la santé publique dans le monde. Plus de 420 000 décès et la perte de 33 millions d'années de vie en bonne santé (DALY) y sont également associés [61]. Au Canada, l'Agence de la santé publique a estimé annuellement qu'environ 4 millions de personnes, soit un Canadien sur huit, tombent malades en raison d'aliments contaminés consommés. Parmi ces cas, il y a environ 12 000 hospitalisations et 250 décès [62].

Les maladies zoonotiques, transmissibles de l'animal à l'humain, d'origine alimentaire se manifestent après la consommation d'aliments contaminés par des micro-organismes pathogènes, tels que des bactéries, des virus ou des parasites. Selon l'ACIA, les plus importants agents pathogènes bactériens d'origine alimentaire identifiés au Canada sont : *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* non typhique, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* producteur de shigatoxine non-O157 : H7 et *Listeria monocytogenes*. Les dernières estimations annuelles moyennes pour les maladies d'origine alimentaire au Canada remontent à 2016. Parmi toutes les maladies dont la cause a été reliée à des bactéries, parasites ou virus d'origine alimentaire, ce sont en moyenne et annuellement, plus de 1,6 million de personnes qui sont malades, 4 000 qui ont été hospitalisées et 105 décès qui ont rapportés [63]. Les pathogènes pénètrent l'organisme par le tractus gastro-intestinal, où se manifestent souvent les premiers symptômes. Ceux-ci peuvent être d'intensités variables et se traduisent notamment par la présence de crampes d'estomac, de nausées, de diarrhées pouvant être sanguinolentes, de vomissements, de fièvre et de maux de tête. En fonction des maladies d'origine alimentaire, certains groupes restreints parmi la population présentent un risque plus grand de tomber gravement malade (populations dites sensibles) et chez ces populations, ces maladies peuvent causer des problèmes de santé chroniques, voire mortels. Par exemple, chez les groupes plus à risque incluant les personnes immunodéprimées, les personnes âgées, les femmes enceintes et

les nourrissons, *Listeria monocytogenes* peut provoquer des septicémies ou des méningites, et être associée à un taux de mortalité élevé (15 à 20 %) parmi ces groupes [64,65]. Ces enjeux de santé publique sont également accompagnés d'enjeux sociaux et économiques, dû à la gestion et la maîtrise des malades chez l'humain (hospitalisations, traitements, arrêts de travail, séquelles et parfois décès) [66].

2.4.2 Les principales bactéries pathogènes pour l'humain et associées au porc

Les principales bactéries responsables des toxi-infections d'origine alimentaire se trouvent dans les intestins des animaux qui sont destinés à la consommation humaine. Le porc est un réservoir animal de souches pathogènes pour l'humain, telles que *Salmonella*, *Listeria* et *Yersinia*. Le tableau 1 résume les caractéristiques microbiologiques, la maladie associée, les sérotypes impliqués ainsi que les symptômes, les principaux réservoirs et sources d'infection de ces trois principales bactéries pathogènes responsables des toxi-infections alimentaires associées à la viande de porc.

Tableau 1. – Caractéristiques microbiologiques, symptômes, réservoirs et sources d'infection des principales bactéries pathogènes responsables de zoonoses d'origine alimentaire associées aux porcs.

	Salmonelles non-typhiques	Références
Caractéristiques microbiologiques	Bacille (0.7 - 1.5 µm x 2-5 µm) - Gram négatif - mobile - non sporulé - Aéro-anaérobie facultatif - Psychrotrophe - Croissance optimale à 35 – 37°C, pH 7 et aw = 0.99	[67]
Maladie associée	Salmonellose	[68]
Principaux sérotypes associés	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serotype Typhimurium et <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serotype Enteritidis	[68]

Symptômes	Fièvre, crampes abdominales, diarrhée, nausée, vomissements, frissons, déshydratation et maux de tête	
Délai d'apparition des symptômes	Habituellement de 6 heures à 72 heures	[67,69]
Dose infectieuse	10 ⁶ bactéries	[67]
Principaux réservoirs	Intestins des animaux (ubiquistes porc, bovins, volaille : poulet, dinde, oie, canard)	[67]
Principales sources d'infection	Œufs crus ou insuffisamment cuits Viande de porc, de volaille ou de bœuf crue ou insuffisamment cuite Produits contaminés par de la viande crue Fruits et légumes crus Lait et produits laitiers crus ou non pasteurisés	[67]
<i>Listeria monocytogenes</i>		
Caractéristiques microbiologiques	Bacille (0.5 - 2 µm x 0.5 µm) - Gram positif - mobile à 20 – 25°C - non sporulé - Aéro-anaérobie facultatif - Psychrotrophe - Croissance optimale à 30 – 37°C, pH 7 et aw = 0.99	[70]
Maladie associée	Listériose	[70]
Principaux sérotypes associés	4b, 1/2b et 1/2a (complexes clonaux cc1, 4 et 6)	[70]
Symptômes	Vomissements, nausées, fièvre, maux de tête, crampes, diarrhée et constipation	[70]
Délai d'apparition des symptômes	3 - 70 jours	[70]
Dose infectieuse	10 à 10 ⁸ bactéries	[70]
Principaux réservoirs	Intestins des animaux (porc, bœuf, volaille, agneau) Environnement : sol et l'eau	[70]
Principales sources d'infection	Lait et produits laitiers (fromages à pâte molle) non pasteurisés ou pasteurisés	[70]

Légumes crus
 Viande crue (porc, bœuf, volaille) ou poisson crus
 ou insuffisamment cuits
 Aliments prêt-à-manger

Yersinia enterocolitica

Caractéristiques microbiologiques	Bacille (0.5 - 0.8 µm x 1-3 µm) - Gram négatif - non mobile à 37°C - non sporulé - Aéro-anaérobie facultatif - Psychrotrophe - Croissance optimale à 25 – 30°C	[71]
Maladie	Yersiniose	[71]
Principaux sérogroupes associés	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9; O:3; O:8; O:5 et O:27	[72]
Symptômes	Fièvre, diarrhée (sanglante), douleurs abdominales	
Délai d'apparition des symptômes	3 - 7 jours	[71]
Dose infectieuse	10 ⁸ bactéries	[71]
Principaux réservoirs	Cavité orale des porcs (langue, amygdales, nœuds lymphatiques)	[24]
Principales sources d'infection	Viande de porc crue ou insuffisamment cuite Lait (pasteurisé ou non) Légumes crus, fruits de mer, eau	[73]

Salmonella est une des principales bactéries zoonotiques d'origine alimentaire associée à la production porcine [5]. Le genre *Salmonella* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* et comprend deux espèces : *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* est subdivisée en six sous-espèces désignées par des noms et des chiffres romains : *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) et *indica* (VI). La sous-espèce *enterica* de *Salmonella enterica* comprend plus de 2 700 sérotypes différenciés par leur caractéristiques antigéniques. La classification antigénique de *Salmonella* est basée sur la réaction d'anticorps avec trois types d'antigènes de surface : l'antigène flagellaire « H » (monophasique ou diphasique), l'antigène oligosaccharidique « O » présent sur la membrane externe du

lipopolysaccharide, et l'antigène polysaccharidique capsulaire « Vi » présent uniquement chez certains sérotypes, tels que *S. Typhi* et *S. Paratyphi*. Un sérotype de *Salmonella* est donc représenté par une formule antigénique déterminée par des combinaisons uniques de réactions d'antigènes de surface [74].

En Europe, les aliments identifiés à l'origine des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont dans 30 % des cas des viandes, dont 50 à 60 % sont attribuables à la viande de porc et essentiellement des produits de charcuterie préparés à partir de cette viande [75]. Dans l'ensemble, pour l'UE, la catégorie « viande de porc et de ses produits » se classe au troisième rang des vecteurs alimentaires les plus impliqués dans les éclosions de cas de salmonellose d'origine alimentaire. Le sérovar de *Salmonella* le plus couramment isolé de la viande de porc impliquée dans ces cas est Typhimurium, incluant son variant monophasique [76,77].

Au Canada, *Salmonella* est responsable d'une hospitalisation sur quatre parmi celles reliées à des intoxications alimentaires. En 2016, 87 500 personnes ont été malades après la consommation d'aliments contaminés à *Salmonella* non typhique, résultant en 925 hospitalisations et 17 décès [62]. Au Québec, de 2000 à 2017, il a été déclaré plus de 21 000 cas de salmonellose, soit en moyenne 1 200 cas par an [78]. De 2020 à 2021, il a été rapporté que dans 49 % des cas, les aliments étaient la principale source d'infection pour les salmonelloses humaines [79]. Cependant, au Canada, il n'y a pas de données disponibles sur le nombre de cas de maladies d'origine alimentaire associées à la consommation de viandes contaminées par *Salmonella*. Aux États-Unis, 72 éclosions de salmonellose attribuées à la viande de porc ont été rapportées, engendrant 2 215 hospitalisations et 276 décès entre 1998 et 2015 [11].

2.4.3 *Salmonella* spp. en filière porcine

Les salmonelles sont des bactéries ubiquitaires et sont principalement retrouvées dans l'intestin des animaux tels que le porc, mais sont également isolées des amygdales, des ganglions lymphatiques mésentériques et iléo-caecaux et dans les ganglions lymphatiques mandibulaires [80].

Au Canada, d'après le dernier rapport du Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) publié en 2019 [12], les trois principaux sérotypes de *Salmonella* retrouvés à la ferme chez les porcs entre 2015 et 2019 étaient Typhimurium, I:4,[5],12:i:- et Derby. Ce classement varie selon la province. Au Québec et en Ontario, ces trois sérotypes étaient les trois principaux retrouvés chez les porcs. À l'abattoir, en 2019, les quatre sérotypes les plus fréquemment retrouvés étaient Derby, Infantis, I :4,[5],12:i:- et Typhimurium.

Au niveau national, en 2019, la prévalence retrouvée chez les porcs à la ferme était de 26 %. Il s'agissait alors du plus haut taux de détection depuis 2006 (taux de 20 %). Si l'on compare les prévalences de *Salmonella* retrouvées chez les porcs à la ferme en fonction des provinces, le Québec présentait un haut taux de prévalence de 35 %, contre 16 % en 2006. À l'abattoir, en 2019, le pourcentage de détection chez les porcs était de 61 % et représentait le taux le plus élevé depuis 2002 (27 %). D'après le dernier rapport disponible de FoodNet Canada en 2018, le pourcentage d'échantillons de produits de porc (saucisses) positifs pour la présence de *Salmonella* spp. s'élevait à 5 % au Canada [81].

Les principales sources d'introduction des salmonelles et les facteurs de risque liés à leur présence dans les élevages de porcs sont connus et incluent : l'introduction de porcelets contaminés, l'utilisation d'aliments contaminés, les visiteurs, le matériel et les équipements introduits dans la ferme, les camions de transports, la présence de rongeurs, ainsi que l'application de protocoles de lavage, de désinfection, d'hygiène et de biosécurité insuffisants, inadéquats ou même manquants [10]. Le contrôle de ces facteurs de risque est primordial pour diminuer l'introduction de *Salmonella* dans les élevages. Chez le porc, la majorité des infections par *Salmonella* sont asymptomatiques, c'est-à-dire que les porcs sont infectés sans développer de signes cliniques et ils sont dits « porteurs sains ». Ces animaux contribuent fortement à l'amplification de la contamination par les salmonelles à la ferme, sachant que la principale voie de transmission des salmonelles est par voie féco-orale suite à l'exposition à des matières fécales contaminées. Certains sérotypes, comme Typhimurium et Choleraesuis rendent parfois malades les animaux et causent des diarrhées qui durent de trois à sept jours, de la fièvre et des pneumonies, surtout

chez les porcs âgés de 2 à 4 mois, et la mort chez le porc. Dans certains cas, les porcs peuvent rester porteurs sains, mais excréteurs jusqu'à cinq mois après la fin de la maladie. Ainsi, le risque de contamination des porcs via les matières fécales entre les troupeaux est accru.

Dans les établissements d'abattage, les facteurs de risques pour la contamination des carcasses par *Salmonella* sont associés à l'animal lui-même et/ou au procédé d'abattage, ainsi qu'à des défauts dans l'application des bonnes pratiques d'hygiène. Les porcs porteurs de *Salmonella*, lorsqu'ils quittent la ferme, constituent la source principale de contamination des carcasses et des viandes [10]. Les différents facteurs de risque, comme le stress lié au transport et l'exposition des porcs à *Salmonella* pendant le transport et l'attente, ainsi que les différentes sources de contamination durant le processus d'abattage et de transformation des viandes telles que l'éviscération et la contamination croisée entre les carcasses et les surfaces contaminées seront présentés ultérieurement dans cette thèse.

Messages clés

- Les principales bactéries zoonotiques d'origine alimentaire associées à la production porcine, et responsable de maladie d'origine alimentaire chez l'humain sont : *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* et les salmonelles non-typhiques
- *Salmonella* est responsable de salmonellose chez l'humain, et les principaux sérotypes associés sont *Salmonella enterica subsp. enterica* qui en comprend plus de 2 700 et sont différenciés par leurs caractéristiques antigéniques
- Contrairement à l'UE, il n'existe pas de donnée disponible au Canada sur le nombre de cas de salmonellose attribuable à la consommation de viande contaminée par cette bactérie
- Les porcs sont des porteurs asymptomatiques de *Salmonella* dans leur tube digestif, et se contaminent entre eux par voie féco-orale suite à l'exposition à des matières fécales contaminées (principale voie de transmission)
- Au Québec, en 2019, la prévalence de *Salmonella* (sérotypes Typhimurium, Derby) retrouvée chez les porcs était de 61 % à l'abattoir

2.5 La qualité microbiologique des carcasses et des viandes de porcs

Les connaissances de base sur les populations microbiennes se retrouvant à la surface des carcasses et se développant pendant l'entreposage des viandes ont été acquises dans le passé en utilisant des approches classiques de microbiologie [6].

2.5.1 Méthodes d'analyses des populations bactériennes par microbiologie classiques

Les méthodes mises au point par Robert Koch ou Louis Pasteur, du milieu des années 1800 au début des années 1900, sont encore largement utilisées aujourd'hui [82]. La méthode classique de culture sur milieu nutritif gélosé, appelé également méthode de culture dépendante, est la plus répandue. Cette technique permet de reproduire sur une gélose nutritive un environnement favorable à la croissance des bactéries dans le but de les dénombrer, les isoler puis les identifier. Ces méthodes de culture permettent de cibler des populations bactériennes d'intérêt sur des milieux gélosés spécifiques, sélectifs ou différentiels. Pour assurer leur croissance, les bactéries ont besoin d'eau, d'une source d'énergie, de carbone et d'azote et d'éléments minéraux tels que des sels inorganiques comme le phosphate et le potassium. Ces besoins élémentaires nutritifs sont suffisants pour favoriser la croissance des bactéries qualifiées de prototrophes. Certaines bactéries qualifiées d'auxotrophes ont besoin, en plus des éléments nutritifs, la présence de facteurs de croissance tels que des vitamines. De plus, les facteurs tels que la température, le pH et la concentration des gaz atmosphériques doivent être contrôlés et maintenus. Les milieux sélectifs contiennent des substances inhibitrices qui limitent la croissance d'autres bactéries non désirées, tout en permettant l'isolement de celles qui peuvent se développer en leur présence. Les méthodes de culture classique sont complémentées et suivies par une identification biochimique des bactéries au niveau du genre et de l'espèce. L'identification bactérienne repose sur l'utilisation de milieux différentiels qui contiennent des indicateurs permettant de visualiser les caractéristiques biochimiques des bactéries telles que l'aptitude à dégrader des substrats (glucides), la production de métabolites (indole), ou la présence directe d'enzymes comme l'uréase et la tryptophane désaminase. Les méthodes de culture classique sont simples et peu coûteuses, mais présentent des désavantages qui expliquent leur remplacement progressif par

des techniques de microbiologie moléculaire, selon les besoins. La durée des analyses microbiologiques sur les milieux de culture est conditionnée par le temps de croissance des bactéries. Lorsque les conditions de croissance sont optimales, la plupart des bactéries croissent en 24 à 48 heures. Dans le cas de microorganismes dits « fastidieux », qui ont des besoins nutritionnels spécifiques et qui se multiplient très difficilement sur les milieux de culture conventionnels, la durée de croissance bactérienne peut aller jusqu'à plusieurs semaines [82]. De plus, l'ensemble des bactéries dans un environnement ne peut pas être totalement caractérisé avec l'usage unique des techniques de microbiologie classique. Pour les bactéries se retrouvant à l'état viable non cultivable ou pour celles qui ne sont pas capables de se multiplier *in vitro*, les milieux de cultures sont souvent mal adaptés pour reproduire les conditions environnementales dont les bactéries ont besoin pour leur croissance.

2.5.2 Le contrôle de la qualité microbiologique des carcasses et des viandes de porc

Pour garantir la salubrité alimentaire des viandes, le contrôle de la qualité microbiologique est obligatoire. Pour chaque établissement d'abattage ou de transformation, des programmes d'analyses microbiologiques destinés à mesurer et de surveiller l'efficacité des mesures de contrôle d'hygiène des procédés intégrés dans les plans de contrôle préventifs sont mis en œuvre. Cependant, la recherche systématique de l'ensemble des microorganismes d'altération ou pathogènes est impossible à réaliser en utilisant les analyses microbiologiques de routine. En fonction des pays, des indicateurs microbiens de qualité microbiologique et leurs critères microbiologiques associés sont définis, de façon réglementaire ou non, pour les carcasses ainsi que certaines catégories d'aliments pour évaluer les conditions d'hygiène mises en place pendant le procédé de production.

2.5.2.1 Les critères microbiologiques

Les critères microbiologiques de sécurité et d'hygiène des procédés définissent « l'acceptabilité du produit, d'un lot de denrées alimentaires ou d'un procédé, sur la base de l'absence, de la présence ou du nombre de microorganismes, et/ou de la quantité de leurs toxines/métabolites, par unité(s) de masse, volume, surface ou lot » [83].

2.5.2.2 Établissement des critères microbiologiques en Europe

Dans les établissements d'abattage de porc de l'UE, les critères microbiologiques établies pour les carcasses porcines et les viandes crues sont encadrées par le règlement (CE) 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires [84]. Ce règlement mentionne entre autres les microorganismes à tester, le plan d'échantillonnage à utiliser (le nombre d'unités à tester, la fréquence etc.), les limites pour chaque unité d'échantillon testé, la méthode d'analyse de référence à privilégier, l'étape à laquelle le critère s'applique et les mesures en cas de résultats insatisfaisants pour les carcasses et catégories d'aliments. Deux différents types de critères sont définis. Les critères de sécurité définissent « l'acceptabilité d'un produit ou d'un lot de denrées alimentaires, applicable aux produits mis sur le marché ». Ces critères se basent généralement sur la détection des bactéries pathogènes, tandis que les critères d'hygiène du procédé définissent « l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production ». Leur dépassement exige des mesures correctives pour maintenir l'hygiène du procédé.

2.5.2.2.1 Critères applicables aux carcasses

Le règlement (CE) 2073/2005 désigne le dénombrement des bactéries aérobies mésophiles et des *Enterobacteriaceae* selon un plan d'échantillonnage à 3 classes (satisfaisant, acceptable et inacceptable) comme méthode d'analyse pour définir les critères d'hygiène des procédés pour les carcasses porcines. Les résultats sont classés comme satisfaisants, acceptables ou inacceptables lorsque le nombre de bactéries aérobies mésophiles se situe entre $< 4,0$, $4,0 - 5,0$ ou $> 5,0$ log moyen quotidien/cm², respectivement, et lorsque le nombre d'*Enterobacteriaceae* se situe entre $< 2,0$, $2,0 - 3,0$ ou $> 3,0$ log moyen quotidien/cm², respectivement. De plus, un nombre maximum de 3 carcasses positives à *Salmonella* pour 50 carcasses échantillonnées est défini comme un critère d'hygiène des procédés selon un plan d'échantillonnage à 2 classes (satisfaisant ou insatisfaisant). Les critères microbiologiques de l'UE sont établis pour évaluer l'efficacité des conditions d'hygiène globales uniquement après l'habillage des carcasses avant le refroidissement.

Les bactéries aérobies mésophiles ne constituent pas une famille bactérienne particulière. En effet, ces bactéries regroupent un ensemble de microorganismes capables de croître et de se multiplier en aérobiose, à des températures optimales de croissance situées entre 25 et 45°C (conditions mésophiles), sur un milieu de culture non sélectif. Le dénombrement des bactéries mésophiles aérobies permet d'avoir une estimation de la charge globale microbienne des carcasses et sa concentration au-delà des critères microbiologiques signifient des défauts d'hygiène et donc, de mauvaise pratique quant aux procédés lors du processus de production de viande. Les *Enterobacteriaceae* constituent des indicateurs de l'état d'hygiène du procédé des carcasses et indiquent une contamination fécale. Les coliformes sont des microorganismes faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ces microorganismes renseignent sur les conditions hygiéniques de l'abattage. La présence des coliformes fécaux suggère une contamination fécale, tandis que les coliformes totaux comprennent aussi bien des microorganismes d'origine fécale qu'environnementale. Les *E. coli* non pathogènes, dit génériques, sont des coliformes présents dans le tube digestif des animaux et de l'humain. C'est la seule bactérie du groupe des coliformes à être exclusivement d'origine fécale [83].

2.5.2.2.2 Critères applicables aux viandes

Le règlement (CE) 2073/2005 désigne également les critères microbiologiques en fonction de la catégorie d'aliments. Ainsi, pour la viande, les différentes catégories réfèrent à la viande hachée, la préparation de viande d'autre espèces que les volailles destinées à être consommées crues ou cuites, aux viandes séparées mécaniquement ou aux produits à base de viande destinés à être consommés crus. Le seul critère microbiologique de sécurité des denrées alimentaires est l'absence de détection de *Salmonella* dans 10 ou 25 grammes de viande, en fonction des catégories, dans 5 échantillons testés. En ce qui concerne les critères d'hygiène des procédés, la qualité des viandes séparées mécaniquement est classée comme satisfaisante, acceptable ou inacceptable lorsque le nombre de bactéries aérobies mésophiles se situe entre $< 5,0 \times 10^5$, $5,0 \times 10^5 - 5,0 \times 10^6$ ou $> 5,0 \times 10^5$ UFC/g, respectivement, et lorsque le nombre d'*E. coli* se situe entre < 50 , $50 - 500$ ou > 500 UFC/g, respectivement.

La surveillance régulière de l'efficacité des bonnes pratiques d'hygiène dans les établissements d'abattage et de transformation est une procédure de vérification essentielle et permet de s'assurer que la qualité microbiologique est efficacement maîtrisée. Pour chacun des critères énoncés précédemment et applicables aux carcasses et aux viandes en Europe, l'utilisation de méthodes d'analyses de référence normalisées sont obligatoire. Parmi ces méthodes, nous retrouvons les normes telles que :

- NF EN ISO 6579 « Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp. » [85]
- ISO 4833 « Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes — Partie 2: Comptage des colonies à 30°C par la technique d'ensemencement en surface » [86]
- ISO 21528-2 « Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Enterobacteriaceae* — Partie 2: Technique par comptage des colonies » [87]

Ainsi, les méthodes décrites sont des méthodes normalisées qui indiquent la description détaillée de toutes les étapes et garantissent la validité des résultats obtenus. Les méthodes de référence permettent de donner le résultat le plus spécifique et le plus sensible.

2.5.2.3 Établissement des critères microbiologiques au Québec et au Canada

Au Canada, les critères microbiologiques relatifs à la salubrité des viandes sont moins prescriptifs qu'en Europe. Au Québec, le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ) a publié en 2019 le recueil des critères microbiologiques des aliments qui constitue une référence pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire [83]. Ce recueil regroupe l'ensemble des lignes directrices qui permettent de déterminer la qualité et l'innocuité des aliments. Elles n'ont pas de caractère obligatoire et ne sont pas définies dans un règlement comme le sont les normes en Europe. Ces lignes directrices et normes pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire du MAPAQ mentionnent les micro-organismes à tester, le plan d'échantillonnage (le nombre d'unités à tester) et les limites pour chaque unité d'échantillon testée. De plus, différents termes de critères microbiologiques sont utilisés. Les critères de santé sont similaires aux critères de sécurité des denrées alimentaires

établis en Europe, tandis que les critères de bonne pratique de fabrication sont assimilés aux critères d'hygiène des procédés. Des critères d'altération sont également utilisés et le dépassement de ces derniers indique un processus d'altération microbologique de l'aliment. Dans ce cas, le dépassement n'entraîne pas de risque pour la santé humaine, mais reflète plutôt de mauvaises pratiques de fabrication. Le dépassement des critères d'altération n'entraîne toutefois pas automatiquement la présence de signes d'altération visibles sur l'aliment.

2.5.2.3.1 Critères applicables aux carcasses

Il n'existe pas de réglementation sur les critères microbiologiques appliqués aux carcasses de porc. Les établissements d'abattage et de transformation de porcs canadiens utilisent des critères microbiologiques du règlement du FSIS établis par l'USDA. L'ACIA a regroupé ces exigences dans l'« Annexe T-1 : Directive de Conformité – Exigences de Surveillance Microbologique des Procédés Dans les Abattoirs de Bétail et de Ratites » [88]. Cette annexe inclut les exigences relatives aux échantillonnages (sites d'échantillonnage, fréquence, sélection des carcasses, procédures de prélèvements), aux méthodes de référence qui doivent être utilisées, aux critères microbiologiques nommés « critères de rendement » et à l'interprétation des résultats de ces critères. Pour les établissements d'abattage de porcs, le FSIS recommande qu'un ou plusieurs indicateurs bactériens parmi les bactéries aérobies mésophiles, *Enterobacteriaceae*, *E. coli* générique et les coliformes soient choisis pour évaluer la maîtrise des procédés. Parmi ceux-ci, le FSIS recommande de choisir le dénombrement des bactéries aérobies mésophiles pour les carcasses de porc. Les critères de rendement représentent la moyenne des charges microbiennes les plus élevées attendues sur les carcasses lorsque le procédé d'abattage est bien maîtrisé (Tableau 2). Les critères de rendement sont établis pour évaluer l'efficacité des conditions d'hygiène globales avant l'éviscération, ainsi qu'après le refroidissement. Le FSIS-USDA a également élaboré des lignes directrices résumant les points de contrôles relatifs à *Salmonella* à l'abattoir et ont établi un nombre maximal de 6 tests positifs sur 55 échantillons à analyser.

Tableau 2. – Critères de rendement (exprimé en UFC/cm²) relatifs aux organismes indicateurs pour les carcasses de porc établis par le FSIS-USDA et rapportés par l’ACIA [88].

	Bactéries totales	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>
Avant l’éviscération	4,2 x 10 ⁶	8,3 x10 ⁴	5,5 x10 ⁴	3,8 x10 ⁴
Après le refroidissement	7,9 x 10 ²	1,1 x 10 ²	35	30

2.5.2.3.2 Critères applicables aux viandes

Au Québec, les critères microbiologiques appliqués pour les coupes de viandes qui seront cuites avant d’être consommées sont présentés dans le tableau 3. Les critères relatifs aux bactéries lactiques reliés à l’altération sont principalement appliqués aux produits emballés sous vide. Concernant *Salmonella*, un critère microbiologique est établi seulement pour la catégorie des préparations de viandes crues prêtes à manger, telles que les tartares (absence de détection de la bactérie dans 25 grammes de viandes dans 5 échantillons testés). Au Québec, le MAPAQ préconise l’emploi de méthodes de référence validées et reconnues à l’international [83].

Tableau 3. – Critères microbiologiques des coupes de viandes (exprimés en UCF/g) qui seront cuites avant d’être consommées d’après les lignes directrices et normes pour l’interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire du MAPAQ publiées en 2019 [83].

	Plan d’échantillonnage		Critères	
	n	c	m	M
Bactéries aérobies mésophiles	5	3	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁷
<i>E. coli</i>	5	3	1 x 10 ²	1 x 10 ³
Bactéries lactiques	5	3	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁷

n : représente le nombre d’échantillons

c : représente le nombre d’échantillons maximum ne pouvant pas dépasser la valeur « m » pour que le lot ne soit pas rejeté

m : représente les concentrations acceptables de microorganismes

M : représente la limite d’acceptabilité du nombre de microorganismes

Les résultats sont jugés comment étant de qualité acceptable, médiocre ou inacceptable lorsque le nombre de microorganismes est < « m », entre « m » et « M », ou > « M » respectivement.

Messages clés

- Le contrôle de la qualité microbiologique est primordial pour s’assurer de la salubrité alimentaire des viandes et permet d’évaluer les conditions d’hygiène mises en place pendant le procédé de transformation des viandes
- Le contrôle de la qualité microbiologique est réalisé en utilisant des approches classiques de microbiologie (dénombrement de groupes de bactéries, appelées indicateurs microbiens, cultivés sur des milieux de culture)
- Contrairement aux normes établies en Europe, il n’existe pas de réglementation stricte sur les indicateurs microbiens et leurs critères microbiologiques associés aux carcasses de porcs au Canada
- Au Québec, il existe des lignes directrices et normes, mais non règlementées, incluant les critères relatifs aux bactéries aérobies mésophiles, *E.coli*, les bactéries lactiques et à *Salmonella* applicables aux coupes de viandes pour évaluer la maîtrise des procédés

2.6 La contamination des carcasses et des viandes de porc

La contamination initiale des carcasses est un point-clé qui influence la dynamique d'altération et la présence des bactéries pathogènes des viandes [4]. Les sources de contamination des carcasses et des produits finis par les bactéries sont très variées et de nombreux facteurs entrent en jeu de la ferme à la table. Les bactéries proviennent généralement des animaux eux-mêmes, leurs poils, tube digestif, peau et matières fécales étant des sources importantes reconnues. La contamination des carcasses par des bactéries associées à l'altération ou des bactéries pathogènes peut également être d'origine environnementale, et ces bactéries peuvent alors provenir de l'eau, des équipements, des matériaux ou des surfaces comme les convoyeurs entrant en contact avec les carcasses et la viande. Durant le processus d'abattage et de transformation des aliments, la contamination microbienne survient le plus souvent lorsque l'application des bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication ne sont pas optimales ou manquantes. De plus, la manipulation des carcasses ou des viandes par les travailleurs peut contribuer à leur contamination. Ainsi, tout ce qui peut entrer en contact direct ou indirect avec les carcasses ou la viande représente une source de contamination microbienne et contribue potentiellement à la composition bactérienne et à la charge initiale de la viande avant l'entreposage [8,26–28,34,89]. La contamination microbienne initiale de cette viande dépend également de l'état physiologique des animaux au moment de l'abattage et de la propagation de la contamination dans les abattoirs et usines de transformation.

2.6.1 Évolution de la contamination par les indicateurs microbiens à l'abattoir

2.6.1.1 Évolution de la contamination des carcasses de porc

Jusqu'à aujourd'hui encore, de nombreuses études ont rapporté les niveaux de contamination microbienne des bactéries aérobies mésophiles totales et des entérobactéries à la surface des carcasses de porc en utilisant des approches de microbiologie classique. La plupart des études ont été réalisées dans des abattoirs de porcs en Europe, particulièrement en Italie [25], en Irlande [22,28,90,91], au Portugal [92], en Espagne [26], en Belgique [80], en Autriche [34] et en Suisse [27,29,93]. Quelques études ont aussi été conduites aux États-Unis [94], en Corée [95], et au Canada [96]. Ces études avaient plusieurs buts communs qui étaient entre autres d'évaluer

l'impact des différentes étapes d'abattage et de transformation sur le nombre de bactéries indicatrices retrouvées sur les carcasses de porc, et de vérifier si les données microbiologiques étaient conformes aux critères microbiologiques. Dans ces études, les niveaux de contamination des bactéries indicatrices (bactéries aérobies mésophiles totales et entérobactéries) sur plusieurs sites distincts de la carcasse (poitrine, jambon, dos, cou) après les étapes clés de la transformation, à savoir l'étourdissement, la saignée, l'échaudage, le flambage, le polissage, l'éviscération et le refroidissement des carcasses ont été rapportés. D'autres études se sont également intéressées à surveiller et évaluer la contamination microbienne des carcasses de porc dans des abattoirs de l'UE pendant des périodes allant de 4 à 8 ans [89,97–99].

Il est important de noter que les carcasses sont échantillonnées aléatoirement dans des abattoirs différents. Ainsi, les différences observées entre les études reflètent l'influence de divers facteurs tels que des pratiques spécifiques, un nombre de porcs abattus qui diffère entre chaque abattoir et des influences temporelles caractéristiques de l'abattoir échantillonné. Cependant, la majorité des études conduites en Europe utilisent les mêmes méthodes pour dénombrer les bactéries, en se basant sur le règlement européen, facilitant la comparaison des données quant à cet aspect.

Lors de l'abattage, aux étapes d'étourdissement et de saignée, les auteurs Wheatley et *al.* ont observé que les comptes bactériens des bactéries aérobies mésophiles totales et des entérobactéries dans les échantillons de surface du jambon, du ventre et de la bajoue de 95 carcasses de porc échantillonnées dépassaient les niveaux acceptables des critères microbiologiques d'hygiène des procédés établis en Europe [28]. Ainsi, les moyennes des comptes bactériens dans les échantillons de jambon, du ventre et de la bajoue étaient toutes supérieures à 6,0 log UFC/cm² après l'étourdissement et la saignée pour les bactéries mésophiles totales. Les comptes bactériens moyens des entérobactéries étaient tous supérieurs à 3,0 log UFC/cm² après l'étourdissement et augmentaient significativement après la saignée (> 4,0 log UFC/cm²). Leurs résultats ont alors suggéré que les bonnes pratiques d'hygiène pendant le transport (nettoyage des camions de transport par exemple) inadéquates et/ou inefficaces peuvent expliquer les comptes élevés après l'étourdissement. Plusieurs études européennes ont obtenu des

conclusions similaires avec des comptes de bactéries mésophiles totales et des entérobactéries sur la surface du jambon, du ventre et du cou variant principalement de 5,0 à 7,0 log UFC/cm² et de 2,0 à 4,0 log UFC/cm², respectivement, après l'étape de la saignée [22,27,91,95,100]. Pour chacune de ces études, les comptes bactériens après l'étape de la saignée étaient les plus élevés par rapport à toutes les autres étapes de transformation des carcasses, allant de l'étourdissement au refroidissement. Par conséquent, l'absence ou l'inefficacité des mesures de lavage et de décontamination pendant le transport et la stabulation des porcs pouvaient expliquer les valeurs élevées des comptes des indicateurs bactériens après l'étourdissement. Il a été clairement démontré dans ces études que le manque de mesure d'hygiène à la ferme ou pendant le transport des animaux augmentait le risque de contamination des carcasses et impactait la qualité microbiologique de la viande future.

Il a été rapporté que l'étape d'échaudage contribue à une diminution de la charge microbienne des carcasses, avec une moyenne de comptes bactériens d'environ 3,0 log UFC/cm² pour les bactéries aérobies mésophiles totales et allant de < 1,0 à < 3,0 log UFC/cm² pour les entérobactéries sur les différents sites des carcasses échantillonnés (ventre, cou, bajoue) [26–28,33,91]. Par la suite, il a été démontré que l'épilation est considérée comme une source importante de contamination, augmentant significativement les comptes microbiens observés à la surface des carcasses de porc sur les différents sites échantillonnés par rapport aux étapes suivantes (> 4,0 log UFC/cm² pour les bactéries aérobies mésophiles totales et allant de 2,5 à > 4,0 log UFC/cm² pour les entérobactéries) [22,26,27,91,101]. L'augmentation de la contamination bactérienne après l'épilation a été attribuée à l'inefficacité du nettoyage et de la désinfection des machines à épiler. Il a été démontré que l'étape de flambage participait à la diminution de la charge microbienne et permettait de réduire cette charge à < 1,8 log UFC/cm² pour les bactéries mésophiles totales et à < 1,0 log UFC/cm² pour les entérobactéries [22,27,28]. Les parties « jambon » des carcasses présentaient les plus faibles résultats de comptes bactériens pour les bactéries mésophiles totales (0,7 log UFC/cm²) [27] et montraient une diminution de la charge bactérienne des entérobactéries de plus de 3,0 log UFC/cm², de l'étape de l'étourdissement jusqu'au flambage [27,28]. Quant à l'étude de Pearce *et al.* conduite en Europe, les auteurs ont

observé qu'après le flambage, les zones du jambon et du ventre ($2,2 \log \text{ UFC/cm}^2$) étaient plus contaminées lorsque comparées à la zone du cou ($1,8 \log \text{ UFC/cm}^2$) causé par le système de flambage utilisé (flamme provenant de la base de la machine entraînant une exposition inégale des carcasses aux flammes et ainsi un traitement thermique plus efficace dans les zones du cou) [91].

Il a été observé que la charge bactérienne réaugmentait après le passage des carcasses dans le tunnel de polissage [34]. Après cette étape, les carcasses de porc présentaient des comptes bactériens supérieurs à $3,5 \log \text{ UFC/cm}^2$ [27,28,91]. Les auteurs suggéraient alors que l'augmentation de la contamination microbienne était liée à des difficultés de désinfection du matériel de polissage entraînant une contamination croisée des carcasses lors de son utilisation et la formation de biofilms dans les équipements, ou éventuellement à des erreurs dans l'application des bonnes pratiques d'hygiène (lavage des équipements inadéquat/inefficace) [28]. Il a alors été démontré la nécessité d'un nettoyage régulier du tunnel de polissage [102].

La plupart des études surveillaient et évaluaient la contamination microbienne des carcasses de porc après l'éviscération et l'habillage, mais aussi avant le refroidissement. Les principales raisons sont que l'étape d'éviscération est considérée comme la plus importante source de contamination des carcasses à l'abattoir et que les critères microbiologiques ont été établis pour évaluer l'efficacité des conditions globales d'hygiène à cette étape, comme représentation de l'amont de la chaîne de production. L'étape d'éviscération participe le plus souvent à l'augmentation de la charge microbienne des carcasses par rapport aux précédentes étapes d'échaudage et de flambage qui participent à la diminution de ces mêmes charges [22,28,92], sans résulter nécessairement en un dépassement des critères microbiologiques. Des niveaux similaires pour les bactéries mésophiles totales d'environ $3,5 \log \text{ UFC/cm}^2$, et donc compris dans la fourchette des valeurs acceptables définies par le règlement UE 2073/2005, ont été trouvés à la surface des quatre sites des carcasses (ventre, jambon, bajoue, dos) après l'étape d'éviscération [22,26,28,29,80,90]. Au contraire, certaines études montraient des niveaux de contamination pouvant aller jusqu'à $6,0 \log \text{ UFC/cm}^2$ et ainsi dépassaient les limites acceptables

des critères microbiologiques européens [25,95]. De plus, l'étude de Wheatley *et al.* ainsi que celle de Rivas *et al.* et de Piras *et al.* ont toutes démontré que les bonnes pratiques d'hygiène aux étapes d'éviscération étaient parfois inadéquates ou inefficaces, montrant des comptes microbiens dépassant les niveaux acceptables ($> 3,0 \log \text{ UFC/cm}^2$ pour les entérobactéries) au regard des critères microbiologiques d'hygiène des procédés établis en Europe, et indiquaient alors une potentielle contamination croisée d'origine fécale pendant cette étape [25, 26, 28]. Les échantillons de bajoue et du ventre montraient ainsi une augmentation significative de la charge bactérienne des entérobactéries, tandis que la zone du jambon présentait une diminution de la contamination passant de 2,5 à 2,3 $\log \text{ UFC/cm}^2$ [28]. De plus, Pearce *et al.* ont également constaté qu'après l'éviscération, les bactéries mésophiles totales augmentaient significativement sur la zone du ventre par rapport à celle du cou et du jambon, avec une moyenne de 3,7 $\log \text{ UFC/cm}^2$ [91]. De plus, Moura-Alves *et al.* ont démontré que le niveau de contamination des carcasses par les entérobactéries était plus élevé après l'éviscération dans les zones lombaires et abdominales (1,0 $\log \text{ UFC/cm}^2$ additionnel) [92]. Au contraire, une étude menée dans deux abattoirs en Italie a démontré que les zones du jambon, du dos, de la bajoue et du ventre, avaient des niveaux de contamination similaire après l'étape d'éviscération entre ces zones avec une moyenne de 3,8 $\log \text{ UFC/cm}^2$ [103].

Globalement, les zones des carcasses les plus contaminées sont celles du cou, aussi bien avant [92] qu'après l'éviscération, et ce jusqu'au refroidissement des carcasses [27]. Les précédentes études citées se concentraient sur l'évaluation de la contamination microbienne des quatre zones de la carcasse, recommandées dans l'échantillonnage par le règlement de l'UE [84]. L'étude de Biasino *et al.* publiée en 2018 est la première étude donnant un aperçu complet de la distribution de la contamination bactérienne sur les carcasses de porc après l'éviscération pour laquelle neuf zones de carcasses ont été analysées séparément [80]. Les auteurs ont confirmé que les zones ventrales et les zones de la tête et du cou étaient plus contaminées avec des comptes bactériens dépassant régulièrement les critères microbiologiques pour les bactéries aérobies mésophiles et les entérobactéries lorsque comparées aux échantillons des zones du jambon et de la longe qui

étaient le moins contaminées et respectaient les valeurs acceptables des critères microbiologiques.

L'efficacité du lavage des carcasses à l'eau chaude est débattue dans la littérature. L'étude de Bolton *et al.* a montré que le niveau de contamination après l'étape de lavage n'était pas significativement différent de celui obtenu après l'étape d'éviscération, soit entre 3,6 et 4,0 log UFC/cm² [22]. Néanmoins, la concentration bactérienne augmentait de 1,0 log UFC/cm² après le lavage. À l'inverse, l'étude de Rivas *et al.* a montré que la charge microbienne en bactéries aérobies mésophiles totales diminuait, passant de 4,0 à 3,5 log UFC/cm² au cours du lavage, cet effet n'étant pas observé pour les entérobactéries [26]. De plus, le pourcentage de carcasses ayant une concentration bactérienne supérieure à 4,0 log UFC/cm² ne diminuait que de 12 % après l'étape de lavage. Dans une autre étude publiée en 2011, les auteurs ont observé une diminution de la concentration bactérienne des bactéries aérobies totales et des entérobactéries à la surface de carcasses de porc (au niveau du ventre) après le lavage des carcasses à l'eau chaude, allant jusqu'à une réduction de 3 log [104]. Alors que, l'étude de Spescha *et al.* a montré que l'étape du lavage entraînait une répartition plus uniforme de la charge bactérienne des bactéries mésophiles totales sur toute la surface des carcasses [27].

L'étape du refroidissement est reconnue pour diminuer la charge bactérienne sur les carcasses de porc [27,29,90,95,105], cette diminution pouvant aller jusqu'à des réductions de plus de 3 log par rapport aux comptes bactériens retrouvés après l'étape d'éviscération, tout juste avant le refroidissement [95]. Ainsi, les comptes des bactéries aérobies mésophiles totales rapportés sur les carcasses de porc après refroidissement varient entre 2,0 et 3,5 log UFC/cm². Au contraire, des études ont démontré une augmentation significative de la contamination microbienne des carcasses après l'étape de refroidissement [22,91]. Ainsi, Pearce *et al.* ont observé que la partie du cou des carcasses était plus contaminée par rapport au jambon et au ventre durant le refroidissement, avec des concentrations supérieures à 4,0 log UFC/cm² pour les bactéries aérobies mésophiles totales sur toute la surface des carcasses [22,91]. Dans une étude plus récente, les auteurs ont également observé que le refroidissement entraînait une augmentation

des comptes des bactéries mésophiles totales dans la zone de la bajoue de 0,5 log UFC/cm² (concentration de 3,2 log UFC/cm²), contrairement aux zones du jambon et du ventre. Il a également été démontré que l'augmentation de la charge des bactéries mésophiles totales était indépendante de la charge des entérobactéries, qui était significativement diminuée après l'étape de refroidissement pour atteindre une concentration bactérienne de 2,4, 2,7 et 2,0 log UFC/cm² pour les zones de la bajoue, du ventre et du jambon, respectivement [28].

Toutes ces études précédemment citées sont principalement réalisées sur des nombres restreints de carcasses de porc. De plus, ces études évaluent les conditions d'hygiène des procédés à un moment donné dans le temps. Récemment, il a été démontré que sur cinq semaines d'échantillonnage, les dix carcasses provenant du premier lot abattu le lundi présentaient des comptes bactériens d'entérobactéries moyen plus élevés que ceux des dix carcasses appartenant au dernier lot abattues le vendredi [100]. La différence était environ cinq fois plus grande entre le premier lot de carcasses abattues le lundi et le dernier lot abattu à la fin de la même semaine. Par ailleurs, des études à plus grande échelle, augmentant ainsi considérablement le nombre de carcasses échantillonnées, ont été réalisées sur plusieurs années. Ces études avaient pour but également d'évaluer et suivre les processus d'abattage du point de vue de l'hygiène et de surveiller à long terme la contamination microbienne des carcasses de porc pour valider les systèmes HACPP mis en place dans les abattoirs [89,97–99].

Messages clés

- La plupart des études décrivant la contamination microbienne (représentée par bactéries mésophiles totales et entérobactéries principalement) retrouvée à la surface des carcasses de porc ont été conduites en Europe et permettait d'évaluer l'impact des différentes étapes du processus
- Cette contamination microbienne évolue tout le long du processus d'abattage et d'habillage des carcasses
- Les étapes d'étourdissement, de la saignée, de l'épilation, du polissage et d'éviscération participent toutes à l'augmentation de la charge microbienne retrouvée à la surface des carcasses
- Les étapes d'échaudage, de flambage et de refroidissement, quant à elles, contribuent à une diminution de cette contamination
- L'étape d'éviscération est considérée comme la plus importante source de contamination des carcasses à l'abattoir, et les zones ventrales et celles du cou sont le plus généralement contaminées
- L'efficacité de l'étape de lavage à l'eau des surfaces des carcasses de porc n'a pas clairement été démontrée dans la littérature

2.6.1.2 Évolution de la contamination des viandes

Dans la littérature, de nombreuses études ont déterminé le niveau de contamination microbienne sur la viande de porc fraîche [106–109], les produits de porc transformés (viande hachée, saucisses, bacon etc.) [110–114], les produits dits « prêt-à-manger » (charcuterie) [115,116], ainsi que sur les viandes de porc fraîches [20,58,113,117,118] et les produits de porc emballés sous vide [119,120] ou sous atmosphère modifiée [20,112,113,120–125]. La plupart des études évaluaient la contamination microbienne des viandes en fonction des facteurs influençant la détérioration des viandes, à savoir la température et la durée d'entreposage, ainsi que la composition de l'atmosphère de l'emballage (sous-vide, sous atmosphère modifiée). Le principal but commun de ces études était d'évaluer l'effet de ces facteurs (température, durée, atmosphère) sur la détérioration de la viande et ainsi trouver des stratégies de conservation augmenter la durée de vie des produits. Les données microbiologiques associées à la détérioration des viandes fraîches et emballées sous vide sont le plus souvent acquises par des méthodes de culture classique et par le dénombrement des populations bactériennes suivantes : bactéries aérobies mésophiles, bactéries aérobies psychrophiles, les bactéries lactiques,

Brochrotrix spp., *Pseudomonas* spp. et les entérobactéries. Parmi ces études disponibles dans la littérature, les effets de ces facteurs sont difficiles à associer et à interpréter, car les conditions expérimentales et les matrices alimentaires diffèrent d'une étude à l'autre ou sont, dans la plupart des cas, non spécifiées et regroupées sous les termes de « viandes fraîches », « produits de viandes » ou encore « produits de découpes ». Ainsi, dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la contamination des viandes de porc fraîches et emballées sous vide, les deux sujets associés à cette thèse.

Il a été démontré que la charge microbienne des viandes fraîches entreposées à 4°C augmentait pendant la période d'entreposage [106,108,109,124]. Globalement, la concentration bactérienne des bactéries totales s'élevait jusqu'à 6,0 log UFC/g dès le troisième jour d'entreposage et atteignait des concentrations supérieures à 6,0 log UFC/g dès le cinquième jour, et supérieure à 7,0 log UFC/g au neuvième jour d'entreposage. Sur des filets de porc entreposés à 4°C pendant 11 jours [126], il a été observé que le niveau de contamination augmentait pour chaque population bactérienne dénombrée, entre le début et la fin de l'entreposage, passant de 4,7 à 7,2 log UFC/g pour les bactéries aérobies mésophile totales, de 2,6 à 5,3 log UFC/g pour les entérobactéries, de 2,7 à 5,7 log UFC/g pour *Pseudomonas*, de 2,3 à 3,5 log UFC/g pour *Brochrotrix* et de 3,6 à 5,1 log UFC/g pour les LAB. En règle générale, plus la viande est conservée à haute température, plus la croissance microbienne est rapide [127–130]. Il a clairement été démontré que les comptes bactériens des viandes augmentaient plus rapidement sur des viandes entreposées jusqu'à 20°C comparé à des viandes entreposées à 4°C. Toutefois, peu importe la température d'entreposage, à son issue, les *Pseudomonas* étaient les bactéries dominantes, suivies généralement de *Brochothrix*, des LAB et des entérobactéries. Dans une récente étude publiée en 2022, Zhao *et al.* ont étudié l'impact de la température d'entreposage allant de -2°C à 25°C sur la viande de porc fraîche [109]. La durée de conservation de la viande entreposée dans des conditions de réfrigération varie normalement de 3 à 14 jours. Le « superchilling » ou « sur-refroidissement » est un processus pour lequel la température d'entreposage est abaissée à 1 ou 2°C en-dessous du point de congélation. Ce processus permet de prolonger la durée de conservation de 1,5 à 4 fois par rapport à l'entreposage à 4°C [131–133]. Depuis peu, des études ont démontré que la concentration initiale de bactéries mésophiles totales était d'environ 4,0 log

UFC/g et atteignait une concentration supérieure à 6,0 log UFC/g après 20 jours d'entreposage à -1°C , et entre 25 et 35 jours pour la viande de porc entreposée à -2°C avec toutefois la présence de signes d'altérations visibles [109,134]. Pour des viandes entreposées à des températures supérieures à 0°C , les comptes bactériens atteignaient une concentration supérieure à 7,0 log UFC/g après 15 jours à 4°C , après 72 h à 10°C et après 15 h à 25°C [109,134]. Ces études ont démontré qu'une température plus basse, inférieure à 0°C , permettait d'inhiber la croissance des bactéries sur la viande de porc, et ainsi prolonger la durée de conservation avant d'atteindre un niveau des bactéries indicatrices inacceptables.

Il est connu que l'emballage sous vide permet de ralentir la croissance microbienne et augmente la durée de vie des viandes jusqu'à quatre fois plus par rapport à des produits entreposés à 4°C . En 2020, Luong et *al.* ont publié une revue systématique qui présente une analyse quantitative des données de la littérature sur l'altération des produits de viande fraîche réfrigérés, notamment sur les viandes de porc en fonction du temps d'apparition de l'altération et de la composition initiale de l'atmosphère de l'emballage [135]. Dans cette revue, plusieurs types de produits de viande fraîche de porc tels que des filets crus ou des saucisses, entreposés à des températures comprises entre 0 et 12°C , mais le plus souvent à 4°C , étaient inclus dans l'ensemble des données analysées et montraient que l'apparition des premiers signes de la détérioration des viandes variait entre 3 et 26 jours après l'emballage, avec un temps d'altération moyen estimé à 9 jours. Le temps d'apparition des signes de détérioration des produits de viande fraîche atteignait plus de 16 jours dans 13 % des cas. L'altération a été retardée dans 77 % des cas pour les produits emballés sous vide. Il est important de noter qu'il n'a jamais été démontré que l'emballage aérobique accélérât la détérioration de la viande et que le conditionnement sous vide garantissait nécessairement un retardement de l'altération des viandes.

Il a été rapporté que le nombre total de bactéries retrouvées à la surface des produits de viande de porc emballées sous vide augmentait continuellement pendant la période d'entreposage [20,58]. L'étude de Holley et *al.* a rapporté que pour une concentration bactérienne initiale au jour 0 qui s'élevait à 3,5 log UFC/g, la concentration augmentait jusqu'à 5,8 log UFC/g après 56

jours d'entreposage [20]. Au contraire, Zhao *et al.* ont observé sur des viandes de porc (coupe de jambon) que pour un nombre de bactéries au début de l'entreposage s'élevant à 4,0 log UFC/g, les limites acceptables en termes de concentrations (> 6,0 log UFC/g) étaient dépassées à partir du 21^{ème} jour d'entreposage avec la présence de signes visibles d'altération [58]. Dans des longes de porc emballées sous vide entreposées à 4°C, il a été rapporté que la concentration de *Pseudomonas* atteignait 10⁷ UFC/g après 20 jours d'entreposage [14,136]. Dans ce cas où *Pseudomonas* atteignait de fortes concentrations, l'efficacité de l'emballage sous vide était remise en cause. La concentration des LAB atteignait 7,5 log UFC/g après 23 jours d'entreposage, sachant que la concentration initiale était de 2,9 log UFC/g [117]. Une étude a rapporté des niveaux de contamination passant de 3,1 à 5,0 log UFC/g après 12 jours d'entreposage [18]. Comme pour les viandes fraîches, plus les viandes emballées sous vide sont entreposées à haute température, plus la croissance microbienne est rapide. Par exemple, il a été observé que la concentration des bactéries totales de coupes primaires de porc emballées sous vide excédait 4,0 log UFC/g après 30 jours d'entreposage à 4°C [36]. Cette étude a montré également que la charge microbienne des LAB atteignait une moyenne de 6,1 et 6,5 log UFC/g après 50 jours d'entreposage à 4°C. Il a été observé que *Brochothrix* était le premier à atteindre une charge de 10⁶ UFC/g dans des échantillons entreposés à 0, 5, 10 ou 15°C, respectivement après 48, 37, 10 et 7 jours d'entreposage [137].

Messages clés

- La contamination microbienne des viandes fraîches, « pré-emballées » et emballées sous vides, entreposées à 4°C est évaluée le plus généralement par le dénombrement des bactéries mésophiles aérobies totales, les entérobactéries, *Pseudomonas* et *Brochothrix*
- La charge microbienne augmente continuellement pendant l'entreposage et la croissance microbienne est plus rapide lorsque les produits (emballés sous vides ou non) sont entreposés à des températures supérieures à 4°C
- L'entreposage des produits à des températures de -2°C, ainsi que l'emballage sous vides, permet tous les deux de ralentir la croissance microbienne et ainsi de prolonger la durée de conservation jusqu'à quatre fois par rapport à l'entreposage à 4°C
- Dans l'ensemble, les limites acceptables relatives aux critères microbiologiques des viandes de porc emballées sous vides établis en Europe étaient dépassées en moyenne après 15 à 20 jours d'entreposage

2.6.2 La contamination des carcasses et des viandes par *Salmonella* spp.

La dynamique de contamination de la filière porcine par *Salmonella* est souvent rapportée en mettant l'accent sur la prévalence, le sérotype le plus fréquemment impliqué, l'origine et la corrélation avec la source animale pour le pathogène. De la ferme à l'abattoir, les conditions de transport et de stabulation des porcs sont reconnues comme un facteur de risque pour la contamination des carcasses par *Salmonella* à l'abattoir [10,68]. Le stress et le manque de nourriture sont des facteurs importants liés au transport qui peuvent favoriser l'excrétion de *Salmonella* par les porcs s'ils sont porteurs asymptomatiques [10,68]. Lorsque le temps en transport et dans les parcs d'attente est allongé (qui peut être dû à un arrêt de la chaîne d'abattage par exemple) ou encore lorsque les changements au niveau de l'environnement des animaux, y compris la température, ne sont pas pris en comptes, ces facteurs favorisent le stress des animaux et donc l'excrétion de *Salmonella* dans les matières fécales. De plus, le pourcentage élevé d'échantillons positifs à *Salmonella*, supérieur à 50 % après les procédures de lavage et de désinfection, ont démontré le plus souvent l'inefficacité de ces protocoles dans les installations (camions de transport) [138]. L'excrétion de *Salmonella* dans les fèces des animaux entraîne alors un risque accru de contamination croisée entre les troupeaux. Après le transport à l'abattoir, il a été démontré que la stabulation est l'un des principaux lieux affectant le statut final des porcs pour *Salmonella* [139]. Le temps passé en stabulation est variable et dépend de la logistique de l'abattoir et de la fréquence des transports. Les temps d'attente les plus courants sont de 1h à 6h, mais cette période est suffisamment longue pour que *Salmonella* colonise l'intestin de porcs naïfs. Une étude a démontré que 5 % des porcs étaient contaminés à *Salmonella* après le transport, tandis qu'après la stabulation, la prévalence atteignait plus de 80 % [140]. Il a également été démontré qu'après le transport et la stabulation des porcs, ces derniers étaient sept fois plus contaminés que les porcs restés à la ferme [141]. Ainsi, l'augmentation de la prévalence de *Salmonella* à l'abattoir a été largement associée à la contamination des porcs dans les parcs d'attente. Deux principales raisons de la criticité de cette étape vis à vis de la contamination ont été attribuées à la sensibilité à la contamination croisée des porcs et l'accumulation des salmonelles dans cet environnement lié à l'inefficacité des protocoles de nettoyage des stabulations, lorsqu'il y en a.

De nombreuses études ont rapporté la prévalence de *Salmonella* tout le long de la chaîne d'abattage et de transformation des porcs [10,25,32,96,100,142–148]. Ces études ne sont pas menées de manière uniforme entre les différents pays qui montrent entre autres des différences dans les protocoles d'analyse. En effet, la prévalence de *Salmonella* retrouvée sur les carcasses peut varier en fonction du point de la chaîne d'abattage où la carcasse est testée, de la méthode d'échantillonnage utilisée (méthodes destructives vs non destructives), de la surface de la carcasse échantillonnée, de la procédure de traitement des échantillons et de la sensibilité analytique des méthodes (méthode de culture classique, PCR). Ainsi, ces variations dans les protocoles peuvent entraîner des différences dans les résultats de prévalence rapportés. Par conséquent, il est important de prendre en compte qu'il est difficile de faire la comparaison entre les études publiant les prévalences de *Salmonella* retrouvées à la surface des carcasses et des viandes de porc.

À l'abattoir, deux sources de contamination des carcasses par *Salmonella* ont été identifiées : (i) l'introduction continue de *Salmonella* dans l'abattoir par des porcs contaminés et (ii) l'environnement abritant la bactérie déjà présente dans la chaîne d'abattage. Les souches de *Salmonella* déjà présentes dans l'environnement constituent une source de contamination pour les carcasses de porc entrantes, que l'animal soit porteur ou non de *Salmonella*. Il a été démontré que les salmonelles introduites par les porcs dans la chaîne d'abattage étaient les souches responsables de la majorité de la contamination des carcasses de porc [141]. Les auteurs Pesciaroli *et al.* ont observé en 2017 que la quantité de *Salmonella* dans l'intestin des porcs à l'abattoir exerçait une influence sur la contamination des carcasses [149]. Les auteurs ont observé que le nombre de carcasses contaminées lors d'une journée d'abattage était associé à la prévalence de porcs présentant une concentration fécale $> 3 \log/g$ pour de *Salmonella*, et non à la prévalence de porcs simplement porteurs de *Salmonella*. La réduction de la charge bactérienne pour *Salmonella* dans les intestins des porcs abattus entraînerait donc une diminution du nombre de carcasses contaminées à l'abattoir. À l'opposé, d'autres études ont démontré que, la contamination croisée est responsable du nombre final de carcasses positives à *Salmonella*.

Duggan *et al.* ont rapporté que la contamination croisée dans l'environnement de l'abattoir représentait jusqu'à 69 % de la contamination des carcasses par *Salmonella*, tandis que Botterlidoorn *et al.* ont estimé qu'elle contribuait à hauteur de 29 % [150].

L'étourdissement des animaux n'est pas considéré comme une étape qui contribue à une contamination par *Salmonella*. Malgré le manque de données concernant cette étape, une étude a montré que l'étourdissement au gaz (dioxyde de carbone), par opposition à l'étourdissement électrique, résultait en une augmentation de l'excrétion de *Salmonella* par les matières fécales à la suite du relâchement des muscles dont celui du sphincter rectal [10]. Les prévalences de *Salmonella* retrouvées à la surface des carcasses sont les plus élevées à l'étape de la saignée, allant jusqu'à plus de 60 % [100, 151] et la contamination cutanée se produit lorsque l'environnement de la stabulation est contaminé ou que les porcs excrètent la bactérie. L'étape d'échaudage est reconnue pour diminuer la contamination microbienne. L'étude de Pearce *et al.* a rapporté que *Salmonella* était détectée sur seulement 1 % des carcasses après l'échaudage et l'étude de Bolton *et al.* a rapporté qu'elle n'était plus détectée après la combinaison des étapes d'échaudage et d'épilation [22, 91]. L'étape d'échaudage représentait alors un point de contrôle critique, puisqu'une présence de *Salmonella* dans l'eau des réservoirs contribuerait à la contamination croisée entre les carcasses. En effet, l'eau est considérée comme une source importante de contamination croisée par *Salmonella* dès qu'elle contient de grandes quantités de matières organiques accumulées ou que la température est inférieure à 61°C. L'étude d'Arguello *et al.* a rapporté une prévalence de *Salmonella* allant de 7 % à 42 % entre différents abattoirs pour ce qui est de sa présence dans l'eau des réservoirs des cuves d'échaudage [152]. L'épilation constitue un point où les carcasses peuvent être à nouveau contaminées. Pearce *et al.* ont observé une augmentation de la prévalence de *Salmonella*, celle-ci passant de 1 % (après l'échaudage) à 7 % avant et après l'épilation [91]. Une étude plus récente parue en 2021 a observé que 100 % des carcasses de porc étaient contaminées après l'étape d'épilation, alors que seulement 17 % de ces carcasses étaient contaminées après la saignée [148]. L'accumulation de matières organiques, ainsi que la difficulté de nettoyage des équipements accentuent le risque de contamination à cette étape. L'équipement se trouvant colonisé par la bactérie ou l'eau recyclée dans le processus

d'épilation devenait la principale source de contamination des carcasses de porc par *Salmonella* à l'abattoir [148]. Le flambage semble être la seule étape permettant réellement d'éliminer *Salmonella* [10,22,91,152]. L'étude de Bolton *et al.* a montré une prévalence nulle après l'étape du flambage, alors que plus de 50 % des carcasses étaient contaminées après l'étourdissement [22]. De même, Pearce *et al.* ont observé que la prévalence était nulle après l'étape du flambage, passant de 7 % (après l'épilation) à 0 % [91]. Les auteurs de l'étude Rizzoto *et al.* ont également observé une diminution significative de la prévalence de *Salmonella*, passant de 60 % (après l'échaudage) à 3 % après le flambage [100]. L'étape de polissage ne semblait pas constituer un point important de recontamination. Semblable à l'étape d'échaudage et d'épilation, il existe tout de même un risque de contamination croisée entre l'équipement et les carcasses lors du polissage. Hald *et al.* ont estimé que la présence de *Salmonella* dans les bassins d'échaudage ou dans l'équipement de polissage augmentait de 2,5 à 5 le risque de retrouver *Salmonella* sur une carcasse à la fin de la ligne d'abattage et d'habillage [145].

Lors de l'éviscération, le déversement du contenu intestinal à la suite de la rupture accidentelle du tube digestif est l'une des principales sources de contamination des carcasses. Ainsi, la surface des carcasses contaminées peut propager *Salmonella* à d'autres carcasses ou même contaminer l'environnement, et représenter par la suite une source de contamination pour les carcasses exemptes de *Salmonella*. Les salmonelles présentes sur du matériel contaminé (par exemple les couteaux ainsi que les gants des travailleurs) peuvent être transférées à d'autres carcasses [10]. Il a été rapporté que l'étape du fendage de la carcasse participe au risque de contamination par *Salmonella*, due à l'origine de la rupture accidentelle du tube digestif lors de l'étape d'éviscération, et a été associée à une persistance de la bactérie dans l'environnement de l'établissement [10]. Une étude rapporte que la prévalence retrouvée sur la surface de la scie entre différents abattoirs varie entre 3 et 80 % [152]. La mise à jeun des porcs, c'est-à-dire le retrait de la nourriture pendant 12 à 18 heures avant l'abattage pour une période variant, permet de réduire le volume de contenu du tube digestif, et ainsi diminuer le risque de contamination des carcasses par ce même contenu au moment de l'éviscération [10]. La prévalence de *Salmonella* diminue après l'étape de refroidissement [10,150,153]. Par exemple, Duggan *et al.* et

Arguello *et al.* ont rapporté que la contamination par *Salmonella* a été réduite de 45 à 11 %, et de 15 à 3 % par le refroidissement, respectivement [150, 152].

De la même manière, lors de la découpe des carcasses, la contamination des produits de découpe par *Salmonella* résulte principalement de contaminations croisées. Les carcasses de porc contaminées introduites dans les chaînes de découpe et de transformation, les équipements entrant en contact avec la surface de ces carcasses, ainsi que les produits de découpe entrant en contact avec des surfaces communes telles que des convoyeurs, sont tous des sources de contamination. Plusieurs études ont rapporté des prévalences similaires retrouvées à la surface de convoyeurs en cours de production, prévalences se situant entre 21 % et 27 % [30,154,155]. Il a été démontré que *Salmonella* est capable de coloniser les surfaces de transformation (convoyeurs, couteaux, tables) de la viande porcine et d'y former des biofilms. Ces biofilms présentent une résistance accrue aux traitements antimicrobiens et les procédures standard de nettoyage et de désinfection peuvent ne pas être totalement efficaces pour les éliminer. La contamination croisée des viandes se produit alors lorsque les bactéries se détachent de la structure du biofilm une fois que les aliments passent sur ces surfaces contaminées [156].

Compte tenu de la grande quantité de sources potentielles de contamination des carcasses de porc pendant l'abattage, les niveaux de contamination sont susceptibles de varier entre les différentes parties de la carcasse et les produits de découpe. Biasoni *et al.* ont étudié la distribution de la contamination des carcasses de porc par *Salmonella* pour lesquelles neuf zones ont été analysées séparément, avec pour objectif d'introduire la notion de catégorisation des coupes de porc en fonction de leur risque pour la santé publique [80]. Ces auteurs ont rapporté que la prévalence de *Salmonella* variait considérablement entre les différentes zones sur une même carcasse, et les prévalences les plus élevées, soit jusqu'à 18 %, étaient observées sur les échantillons prélevés à partir des pattes avant, de la tête et de la gorge. Ainsi, la distribution de *Salmonella* en fonction de chaque zone pourrait être utilisée pour estimer le risque lié à la consommation de coupes de viande porc spécifiques.

Salmonella est capable de survivre à des températures inférieures à 4°C, autant sur les viandes de porc fraîches que sur celles emballées sous vide, selon les conditions d'entreposage [68]. Les études se contredisent sur l'efficacité de l'emballage sous vide pour réduire la quantité de *Salmonella* dans les viandes de porc. Par exemple, Djordjevic *et al.* ont observé que les dénombrements bactériens étaient réduits de 1,5 log UFC/g après 12 jours d'entreposage à 4°C, tandis qu'il a été observé que l'emballage sous vide pendant 28 jours n'avait pas d'impact [18]. En règle générale, plus la température d'entreposage est haute, plus le taux de contamination sera élevé. Il a été observé que la concentration de *Salmonella* dans des produits de porc non emballés, ainsi que dans des longes de porc emballées sous vide entreposées à 10°C augmentait d'environ 0,5 log UFC/g par rapport à des longes entreposées à 4°C après une dizaine de jours d'entreposage [18, 158].

Messages clés

- Les conditions de transport et de stabulation des porcs sont reconnues comme des facteurs de risque pour la contamination des carcasses par *Salmonella* à l'abattoir
- L'introduction continue de *Salmonella* par des porcs contaminés et l'environnement abritant la bactérie déjà présente dans la chaîne d'abattage représentent les deux plus importantes sources de contamination des surfaces des carcasses par *Salmonella*
- Seules les étapes d'échaudage et de flambage diminuent la prévalence retrouvée à la surface des carcasses de porc, alors que les étapes d'épilation constituent un point où elles peuvent être à nouveau contaminées
- La principale source de contamination des carcasses à l'abattoir par *Salmonella* est le déversement du contenu intestinal à la suite de la rupture accidentelle du tube digestif lors de l'éviscération
- En général, les surfaces correspondantes à la tête et à la gorge semblent plus contaminées par *Salmonella*
- L'étape de refroidissement des carcasses permet de réduire la prévalence de *Salmonella*
- *Salmonella* est capable de survivre à des températures d'entreposage à 4°C dans des produits emballés ou non sous vide, mais l'efficacité de l'emballage sous vide pour réduire la quantité de *Salmonella* n'est pas clairement démontrée

2.6.3 Le contrôle de la contamination microbienne des carcasses et des viandes de porc

Le contrôle de la contamination microbienne nécessite une approche intégrée impliquant tous les secteurs de la chaîne de la filière porcine, incluant les producteurs, les transporteurs d'animaux, les transformateurs, les distributeurs, les détaillants ainsi que les consommateurs. Les stratégies de gestion des risques microbiologiques incluent entre autres la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène et de biosécurité de la production animale à la ferme, un abattage et une transformation des carcasses et de la viande dans des installations correctement conçues et entretenues et dans des conditions sanitaires et hygiéniques de haut niveau complétés par une utilisation des stratégies de décontamination si elles sont nécessaires et approuvées. Les conditions d'emballage, de préparation et d'entreposage appropriées, finalement, assurent le maintien des conditions de la chaîne du froid jusqu'à la distribution. Ainsi, le contrôle de la contamination microbienne est principalement assuré par des approches préventives telles que la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène, de bonnes pratiques de fabrication, et par l'application des principes d'analyse des risques et maîtrise des points critiques (HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point). Le système HACCP est une approche d'identification et d'évaluation des dangers (chimiques, physiques, biologiques) associés aux différentes étapes d'une production dans le but de définir les moyens nécessaires à leur maîtrise et ainsi garantir la salubrité de l'aliment [22,27,101,159]. Au Canada, le Programme d'amélioration de la salubrité des aliments (PASA) de l'ACIA est un type de plan de contrôle préventif mis en œuvre dans les établissements d'abattage et de transformation de porcs. Ce programme repose sur les principes HACCP et permet de démontrer la capacité de l'exploitant à maîtriser les dangers associés aux aliments afin d'assurer la salubrité du produit pour le consommateur. Le PASA fait maintenant partie intégrante du Règlement sur la salubrité des aliments au Canada instauré depuis le 15 janvier 2019, règlement qui remplace les 14 anciennes lois et règlements décrivant les différentes mesures pour assurer la salubrité des aliments [160].

À l'abattoir, les stratégies du contrôle microbien des carcasses et des viandes reposent sur la mise en œuvre de mesures qui ont différentes visées : 1) empêcher ou minimiser l'introduction de

micro-organismes, 2) réduire la contamination en éliminant (décontamination) ou en inactivant les microorganismes présents, 3) empêcher, retarder ou ralentir la croissance des microorganismes, et 4) réduire le transfert de microorganismes des carcasses vers l'environnement de production, et ainsi éviter ou minimiser la contamination croisée. Les interventions visant le contrôle microbien sont des procédés, tels que le traitement thermique, le lavage à l'eau chaude, la pasteurisation à la vapeur, l'utilisation d'agents technologiques chimiques, les conditions d'emballage, qui inhibent la croissance des microorganismes et qui impliquent la mise en œuvre dans les établissements de procédures de nettoyage et de désinfection efficaces et contrôlées [161].

2.6.4 Limites du contrôle de la contamination microbienne des carcasses et des viandes de porc

La plus importante limite de l'utilisation des méthodes de culture classique pour le contrôle de la qualité microbiologique et de la contamination est que le dénombrement des bactéries aérobies mésophiles totales ne représente qu'une estimation de la charge globale bactérienne des bactéries qui sont cultivables, sous-estimant la véritable charge bactérienne [162]. La recherche de l'ensemble des bactéries pouvant contribuer à l'altération future de la viande ainsi que toutes les potentielles bactéries pathogènes est impossible à réaliser dans les analyses microbiologiques de surveillance dans les établissements d'abattage et de transformation. Les dénombrements des populations bactériennes sont primordiaux pour contrôler la qualité microbiologique et assurer que les produits respectent les critères microbiologiques établis. Toutefois, les données obtenues des analyses par dénombrements des bactéries aérobies mésophiles totales, des entérobactéries et des bactéries lactiques sont uniquement quantitatives et ne donnent pas d'indication sur la taxonomie des bactéries retrouvées [163]. Seules les techniques moléculaires peuvent fournir des informations sur la composition réelle des communautés microbiennes qui sont retrouvées à la surface des carcasses et des viandes.

2.7 Le microbiote des carcasses et des viandes de porc

2.7.1 Analyses de biologie moléculaire

Depuis les années 1980, des techniques moléculaires ciblées, indépendantes de la culture, ont permis de commencer à explorer des communautés microbiennes plus complexes et diversifiées [163,164]. Les techniques de biologie moléculaire ont évolué très rapidement, et permettent, par rapport aux techniques faisant appel à la microbiologie classique, un gain de temps, de sensibilité et de spécificité analytiques pour l'identification et la détection des genres bactériens [165,166]. L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) ainsi que la PCR en temps réel et la RT-PCR (Reverse Transcriptase - PCR) ont permis de détecter et de quantifier les bactéries même à l'état viable mais étant non cultivables [167]. Ces méthodes présentent leurs propres limites. Elles ciblent un microorganisme à la fois (ou plusieurs dans le cas de la PCR multiplex), utilisent des amorces spécifiques et nécessitent la multiplication des étapes afin d'analyser un grand nombre des bactéries composant un microbiote [166]. Les méthodes par PCR ont cependant évolué avec le développement d'amorces dites universelles, ciblant un gène commun à toutes les bactéries tel que le gène codant pour l'acide ribonucléique ribosomal 16S (ARNr 16S) qui code pour la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes. Initialement, les ARNr 16S étaient des molécules de choix pour l'analyse des phylogénies microbiennes à des fins taxonomiques [168]. D'autres gènes tels que les gènes *gyrB* codant pour la sous-unité bêta de l'ADN gyrase (ADN topoisomérase de type II), *rpoB* codant pour la sous-unité beta de l'ARN polymérase ou encore *cpn60* codant pour une protéine chaperonne peuvent également servir à l'étude des écosystèmes bactériens [169–171]. Une caractérisation unique de ces gènes non ribosomiques est d'être présents en une seule copie dans les génomes bactériens, contrairement au gène qui code pour l'ARNr 16S qui lui peut présenter entre 1 et 21 copies par génome [172,173]. De plus, comparé à l'ARNr 16S qui offre une description globale des écosystèmes bactériens, ces marqueurs permettent une assignation taxonomique plus fine, jusqu'à l'espèce [174,175]. Toutefois, ces marqueurs sont beaucoup moins utilisés dans les analyses des communautés microbiennes et le gène codant pour l'ARNr 16S est celui qui est le plus utilisé.

C'est seulement avec l'apparition des techniques de biologie moléculaires non ciblées, telles que le séquençage à haut débit, que le domaine de l'étude du microbiote s'est réellement développé. Les techniques de séquençage permettent de déterminer la succession des nucléotides, c'est-à-dire la séquence d'une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) et existent depuis les années 1970. La première méthode de séquençage direct de Sanger, dite de « première génération », a été mise au point en 1977 [176]. Elle a permis de séquencer le premier génome humain complet dès 2001 [177]. Cette technologie ne permet que le séquençage d'un brin d'ADN à la fois, rendant impossible l'étude de l'ensemble des bactéries présentes dans un environnement. C'est à partir des années 2000 et l'arrivée des méthodes de séquençage de nouvelle génération, regroupées sous l'acronyme NGS (*Next Generation Sequencing*) ou séquençage à haut débit, que le séquençage simultané de millions de molécules d'ADN a pu être réalisé et que l'étude et l'analyse du microbiote à l'échelle de l'écosystème se sont intensifiées [178].

2.7.1.1 Le gène codant pour l'ARNr 16S

La technique la plus fréquemment utilisée pour l'étude de la composition et de la diversité microbienne d'un écosystème repose sur l'utilisation du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et est également appelée « amplicon sequencing » ou « metabarcoding ». Ce gène, d'environ 1 500 pb, est composé de neuf régions hypervariables nommées V1 à V9, dont la composition est propre à une population bactérienne spécifique, voir même à une souche. Ces régions sont intercalées par des régions conservées ayant une très faible variation entre les espèces. Ainsi, les régions hypervariables sont ciblées pour identifier les microorganismes, tandis que les régions conservées sont ciblées pour la création d'amorces universelles [179,180]. Les régions V3 et V4, seules ou en combinaison, sont les plus fréquemment ciblées pour la détection des bactéries, compte tenu que le gène complet de 1 500 bp est trop long pour être séquencé efficacement avec les technologies les plus employées. Cependant, il a été démontré que le choix des régions hypervariables de l'ARNr 16S pour le séquençage peut modifier la mesure de la diversité microbienne, par la détection privilégiée de certains taxons bactériens, perturbant ainsi les valeurs de la mesure de la diversité [181]. Il est important de prendre en compte que les variations peuvent aussi s'expliquer par le choix des plateformes de séquençage et des méthodes servant

aux analyses bio-informatiques [182]. Les régions hypervariables V1-V3 et V3-V4 présentait des fortes similitudes lors de comparaison de communautés bactériennes définies dans des échantillons de microbiote humain (buccal) et environnemental (échantillons de sols) [183,184], tandis que les régions V2-V3, V4 et V4-V5 semblaient produire des résultats plus reproductibles lorsqu'amplifiées à partir d'échantillons environnementaux (échantillons marins) [181,185], alors que la région V4 en particulier permet une meilleure assignation taxonomique [186]. Il semble ainsi que le choix des régions hypervariables dépende de la nature de l'échantillon. À notre connaissance, aucune étude ne semble avoir été réalisée sur l'impact du choix de ces régions pour l'étude des bactéries retrouvées dans des échantillons de matrices alimentaires.

2.7.1.2 Le séquençage de deuxième génération

Le séquençage de deuxième génération regroupe plusieurs technologies qui permettent le séquençage simultané de millions de fragments d'ADN, obtenus par amplification, et qui sont connus sous le nom de lectures courtes ou « reads » [187]. Il existe plusieurs méthodes de séquençage : pyroséquençage (454 Life Sciences, Roche Diagnostics) (Tableau 4), séquençage par détection de la libération des ions H⁺ (Ion Torrent/ Thermofisher/Life Technologies) (Tableau 4) ou le séquençage par synthèse (Illumina). La première méthode de séquençage de nouvelle génération NGS était la méthode « 454 », lancée en 2005 par la société 454 Life Sciences. Ces premiers séquenceurs permettaient de produire moins d'un million de lectures courtes, contre des millions de lectures générées maintenant à l'aide des dernières technologies [188]. Cette méthode n'est plus commercialisée depuis 2013 et la technologie Illumina est maintenant la technologie la plus largement utilisée et domine pour réaliser le séquençage de l'ARNr 16S et est présentée en détails ultérieurement dans ce chapitre.

Tableau 4. – Principes majeurs du pyroséquençage et du séquençage par détection de la libération de ions H⁺.

Méthode	Principes majeurs	Références
Pyroséquençage	Les fragments d'ADN sont amplifiés sur des billes par PCR en émulsion (une seule molécule se fixe sur chaque bille). Dans un micro-puit, lorsqu'un nucléotide dNTP complémentaire à la séquence est incorporé par la polymérase, un pyrophosphate inorganique est libéré et détectée par une cascade de réactions enzymatiques (enzymes sulfurylase, luciférase présentes à la surface d'autre type de billes et ajoutées dans les micro-puits en début de réaction) aboutissant à l'émission de lumière par bioluminescence, capté par une caméra. Pour finir, l'ajout d'une apyrase permet de dégrader les nucléotides non incorporés et le cycle est répété.	[189]
Séquençage par détection de la libération ions H⁺	L'amplification des fragments d'ADN est réalisée par PCR en émulsion. Lorsque qu'un nucléotide dNTP (ajouté de façon séquentielle) complémentaire à la séquence est incorporé par la polymérase, un ion hydrogène est libéré. Au fond de chaque puit, un capteur d'ion détecte la variation de pH engendré par la libération de l'ion et permet d'identifier la base incorporée.	[190]

2.7.1.2.1 Préparation de la librairie de séquençage

Tout d'abord, la préparation d'une librairie de séquençage qui est l'ensemble des fragments d'ADN que l'on veut séquencer est réalisée. Deux méthodes sont possibles :

- Une méthode ciblée, où les fragments d'ADN désirés sont ciblés et amplifiés par PCR avec un couple d'amorces, par exemple. Dans ce cas de figure, toutes les séquences d'un même amplicon seront identiques, sauf dans le cas du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S où l'amplification conserve les séquences variables encadrées par les amorces universelles [191].

- Une méthode globale ou communément appelée la stratégie « shot gun », où l'ADN est aléatoirement fragmenté par sonication ou par l'utilisation d'enzyme de restriction ou transposase [192]. Cette méthode est largement utilisée lors : 1) du séquençage du génome entier qui permet de déterminer la séquence complète d'un génome d'intérêt; 2) du séquençage de l'ensemble du contenu génomique des communautés microbiennes, permettant la caractérisation taxonomique et fonctionnelle des génomes.

2.7.1.2.2 La technologie Illumina

La technologie Illumina existe depuis 2008. Le séquençage s'effectue sur une cellule de séquençage ou cellule de flux (flow cell), qui est une lame de verre. Après fragmentation du génome et amplification, l'ADN génomique à séquencer possède des adaptateurs aux extrémités 5' et 3'. Ce sont de petites séquences d'ADN qui permettent l'accrochage et l'amplification sur la cellule de flux. Sur cette cellule, deux différents types d'oligonucléotides sont fixés, ces nucléotides correspondent aux séquences complémentaires des adaptateurs ajoutés aux extrémités 5' et 3' des fragments d'ADN à séquencer. Des millions de fragments d'ADN sont ainsi amplifiés, puis séquencés en même temps sur une même cellule de séquençage.

Le séquençage d'un fragment ADN est présenté à la figure 1 et est réalisé de la façon suivante : un fragment d'ADN double brin est dénaturé. Un fragment simple brin d'ADN s'hybride à un oligonucléotide fixé de façon covalente à la cellule de flux. Il s'agit du brin matrice. Un brin complémentaire est synthétisé au brin matrice par une polymérase. Les deux brins (matrice et complémentaire) sont dénaturés en simple brin. Une étape de lavage est réalisée pour éliminer le brin matrice et permettre à l'extrémité libre du brin complémentaire de s'hybrider à un autre oligonucléotide en formant un pont. C'est la méthode « bridge amplification » (amplification en pont). La synthèse du brin complémentaire par une polymérase permet d'obtenir la même séquence que le brin matrice. Une nouvelle étape de dénaturation permet de séparer ces deux brins nouvellement synthétisés et les extrémités libres s'hybrident à nouveau à un autre oligonucléotide en formant un pont. Ces mêmes étapes se répètent pour former un « cluster » qui correspond au regroupement de millions de fragments d'ADN identiques au brin matrice. Sur la cellule de flux, d'autres clusters se forment, correspondant à l'amplification d'autres fragments

d'ADN dans l'échantillon à séquencer. Le séquençage des fragments d'ADN peut débuter quand tous les brins de tous les clusters se sont hybridés à des amorces de séquençage.

Le séquençage est cyclique. À chaque cycle, un seul nucléotide marqué d'une molécule fluorescente est incorporé sur la lame de verre. Ces nucléotides sont des terminateurs réversibles de la réaction de la synthèse de l'ADN. Ainsi, à chaque incorporation, la réaction de séquençage s'arrête. Le nucléotide marqué d'un fluorochrome, lorsqu'ajouté au brin en cours de synthèse, est excité et émet un signal après excitation à l'aide de deux lasers et permet d'indiquer quel nucléotide a été incorporé dans chaque cluster. La formation de clusters en amont permet d'obtenir un signal lumineux suffisamment important pour être détecté. Les nucléotides marqués non utilisés sont lavés, et la molécule fluorescente ainsi que la molécule bloquant la réaction d'amplification sont clivées pour permettre la suite de la synthèse de séquençage. Chaque cycle est répété et permet de déterminer la séquence d'ADN de chaque cluster. Il existe un séquençage « en paire » (*paired-end*) qui consiste à séquencer les deux extrémités (brins sens et anti-sens) des fragments d'ADN des clusters. Dans le cas du séquençage *paired-end*, après que le brin matrice ait été séquencé, une autre étape d'amplification en pont, telle que présentée précédemment, permet de resynthétiser le brin complémentaire. Les deux brins sont dénaturés. Les brins matrices sont éliminés et le séquençage du brin complémentaire s'effectue de la même manière que le brin matrice [193–195].

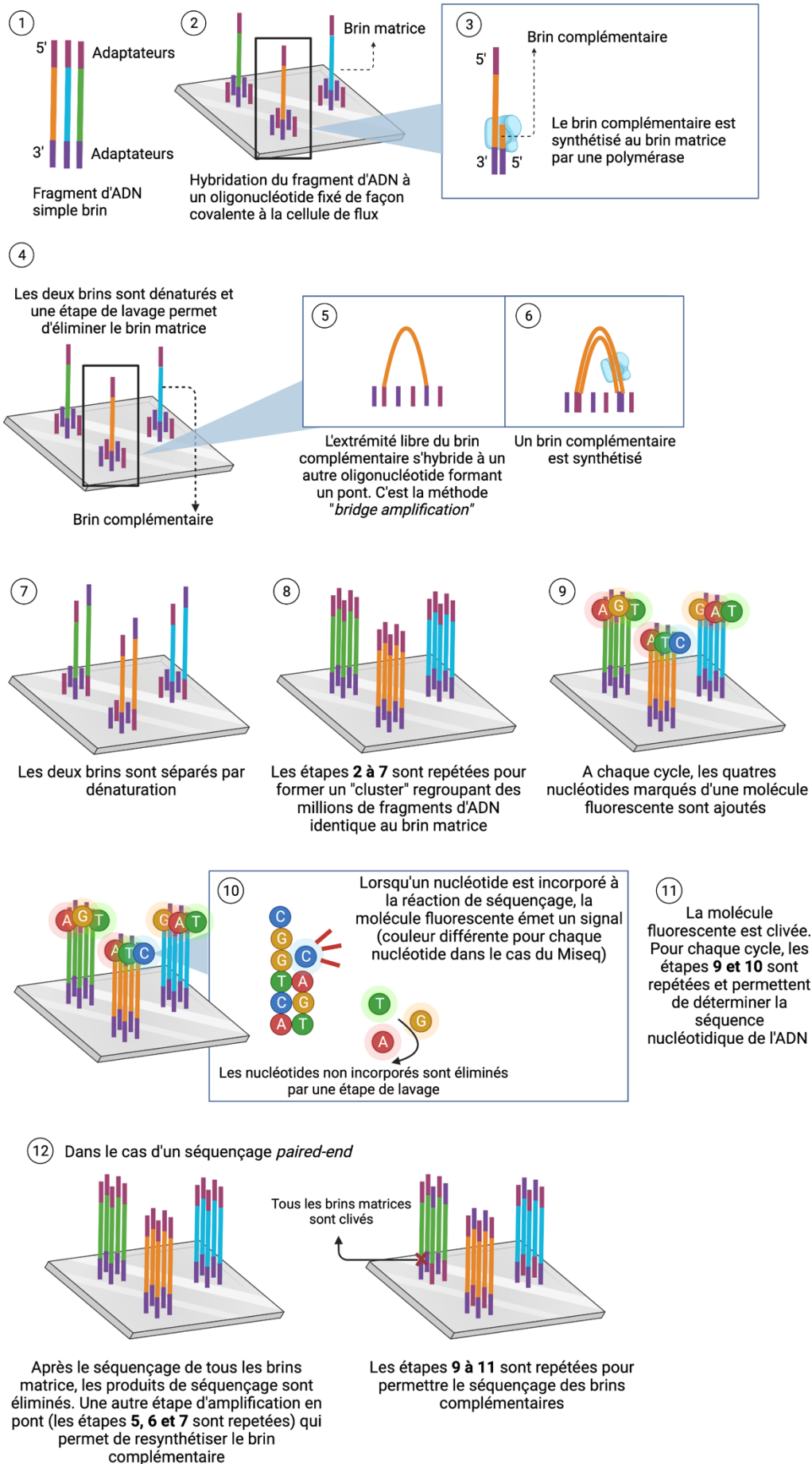


Figure 1. – Représentation schématique de la technologie d'Illumina (adaptée de l'exploration du principe présenté en 3D par Illumina [196], schéma réalisé avec BioRender).

Illumina présente plusieurs séquenceurs, dont les principales différences entre ceux-ci sont le nombre maximum de nucléotides à séquencer et la longueur des séquences produites. Le séquenceur Illumina Miseq peut séquencer des lectures d'une longueur allant jusqu'à 2 x 300 pb dans le cas du séquençage *paired-end* et permet alors le séquençage complet de la région V4 du gène codant de l'ARNr 16S. La technologie Illumina est la technologie la plus utilisée lors du séquençage de l'ARNr 16S en raison de son rendement et de sa précision qui est d'environ 8,5 giga bases par opération, en 39 heures, avec un taux d'erreur environ de 0,4 % pour la technologie Miseq [197,198].

2.7.1.3 Les analyses bio-informatiques

Les méthodes de séquençage à haut débit ont nécessité le développement d'outils d'analyses bio-informatiques spécifiques permettant la gestion et l'analyse des données de séquençage. Parmi les logiciels disponibles, Mothur [199] et QIIME 2 [200] sont les plus fréquemment utilisés pour le traitement des données de séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Pour chacun, les analyses bio-informatiques des données de séquençage ont pour but de nettoyer les séquences et de former des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) ou des variants de séquence d'amplicon exacts (ASV) pour aboutir à l'obtention d'une table d'abondance de ces séquences et une table de leur assignation taxonomique.

Dans le cadre d'un séquençage par la plateforme Illumina Miseq, les séquences des fragments, qui correspondent à des lectures courtes à cette étape, sont enregistrées dans un fichier au format unique FASTQ. Dans ce fichier, on retrouve la séquence nucléotidique, ainsi que le score de qualité associé à chacun de ces nucléotides, appelé « score Phred ». Ces scores de qualité sont assignés à chaque nucléotide issu d'un électrophorégramme de séquençage. Ils sont utilisés pour caractériser la qualité d'une séquence d'ADN sachant que les scores sont reliés de façon logarithmique à la probabilité d'erreur d'identification d'une base. Ainsi, si le score est de 10, la

probabilité que l'identification de la base soit incorrecte est de 1 sur 10, soit 90 % de chance que l'identification de la base soit correcte. Ce score de qualité est notamment utilisé pour repérer les erreurs les plus probables dans les séquences nucléotidiques obtenues [201].

En amont du séquençage, il existe différents biais associés aux procédures d'extraction d'ADN et de l'amplification des fragments d'ADN susceptible d'introduire des erreurs dans les séquences servant à la description d'un microbiote. Le tableau 5 regroupe ces possibles sources d'erreurs lors de ces deux étapes.

Tableau 5. – Potentielles sources d'introduction d'erreurs dans la caractérisation d'un microbiote lors des étapes de l'extraction de l'ADN et de l'amplification par PCR.

Étape	Possible sources d'erreurs	Références
Extraction d'ADN	Lyse cellulaire incomplète Perte de l'ADN aux différentes étapes du processus d'extraction Influence de la source d'échantillons (constitué d'une matrice microbienne complexe avec la présence d'inhibiteurs) Contaminations techniques	[202, 203]
Amplification par PCR	Erreur de la polymérase (non-utilisation d'une enzyme à haute-fidélité) Dégradation thermique de l'ADN matrice (en particulier lors de l'étape de dénaturation de l'ADN double brin en simple brin) Formation de chimères Présence d'inhibiteurs de la PCR (sels, lipides, glucides) Contamination par une RNAase Quantité de matériel (ADN) insuffisante Utilisation d'amorces non spécifique Influence du nombre du cycle d'amplification Contaminations techniques (lors du pipetage, du chargement des puits par exemple)	[203, 204]

2.7.1.3.1 *Étape de nettoyage des lectures*

La première étape des analyses bio-informatiques consiste en la suppression des erreurs de séquençage des lectures [205]. Dans le logiciel Mothur, la formation des contigs est tout d'abord réalisée et consiste en la combinaison des lectures sens et antisens. Après l'alignement des deux lectures, l'algorithme identifie toutes les positions où les deux lectures présentent un différend. Par exemple, dans le cas où un nucléotide n'est identifié que sur une seule lecture, le score de qualité du nucléotide doit être supérieur à 20 (taux d'erreur de 1 %) pour être considéré comme réel. Dans le cas d'un mauvais appariement d'une paire de bases, le paramètre définit l'écart autorisé entre les scores de qualité de la paire de bases mal appariée. Par défaut, cette valeur est fixée à 6. La lecture qui contient le nucléotide avec le score de qualité le plus haut sera considérée comme celle présentant le bon nucléotide [206].

Pendant la formation des contigs, d'autres paramètres permettent la suppression des lectures non désirables dans les cas suivants [206] :

- Si les lectures présentent des différences par rapport à la séquence des amorces. Par défaut, cette valeur est fixée à 0.
- Si les lectures présentent des nucléotides appelés « ambigus » qui apparaissent lorsque le séquenceur ne parvient pas à identifier le nucléotide. Par défaut, cette valeur est fixée à 0.
- Si les lectures présentent de longues séquences de nucléotides répétées. Il n'y a pas de valeur par défaut prédéfinie.
- Si la taille des lectures est trop longue ou trop courte par rapport à la taille théorique de la région ciblée.

Avant de poursuivre les analyses, l'algorithme de Mothur fusionne les lectures identiques pour un gain de temps de calcul. La suite des analyses est par conséquent réalisée sur les lectures uniques. Par la suite, l'alignement des lectures est réalisé par comparaison de celles-ci aux séquences de banques de référence connues de la région variable séquencée, les banques de référence SILVA ou RDP étant les plus connues. Les séquences qui ne peuvent pas s'aligner ou pour

lesquelles l'alignement n'est pas adéquat sont éliminées. Ensuite, les lectures ayant moins d'une différence pour 100 paires de bases sont regroupées. C'est ce que l'on appelle le « pre-cluster ». Enfin, les chimères qui correspondent à des séquences anormales issues de recombinaisons erronées lors de la PCR, sont éliminées. La présence de chimères se produit lorsque l'amplification d'un brin d'ADN est incomplète et qu'il se lie à un autre brin d'ADN. Si une lecture est considérée comme une chimère, elle est supprimée de tous les échantillons. L'étape de nettoyage des séquences se termine par la suppression de toutes les séquences qui n'appartiennent pas au domaine phylogénétique des bactéries. À ce stade des analyses, le taux d'erreur de séquençage peut être calculé si le séquençage d'une communauté bactérienne connue fictive a été réalisé en parallèle. Le taux d'erreur est défini comme la somme des non-concordances par rapport aux séquences de référence connues de la communauté bactérienne fictive, divisée par la somme des nucléotides séquencés de cette communauté [206].

À l'inverse, dans le logiciel QIIME2, plusieurs méthodes de nettoyage sont incluses, dont DADA2 est la plus utilisée [207]. DADA2 est un pipeline informatique qui permet de déduire les séquences réelles des échantillons, appelées variants de séquence d'amplicon exacts (ASV) [208]. Brièvement, le nettoyage des séquences est réalisé sur chacune des lectures séparées. Des étapes de filtrage permettent de tronquer et de filtrer les lectures suivant leur taille et leur qualité. Le nettoyage comprend par exemple la suppression des nucléotides de mauvaise qualité, des séquences contenant au moins une base « ambiguë » et des séquences qui dépassent le nombre maximum d'erreurs autorisé dans une lecture. L'étape suivante est l'étape d'apprentissage des taux d'erreurs. DADA2 utilise un modèle paramétrique pour évaluer les erreurs de séquençage. Le modèle d'erreur est calculé à partir des données en alternant l'estimation des taux d'erreur et la déduction de la composition de l'échantillon jusqu'à l'obtention de groupes homogènes. Une fois l'apprentissage effectué, les lectures filtrées et nettoyées sont corrigées à partir de ce modèle pour ainsi déduire les séquences exactes. C'est seulement après ces étapes que les lectures sens et antisens sont fusionnées. Par défaut, les séquences fusionnées ne sont gardées que si les lectures sens et antisens se chevauchent sur au moins 12 bases et sont identiques l'une à l'autre

dans la région de chevauchement. Pour finir, le pipeline DADA2 inclut directement la détection de chimère.

2.7.1.3.2 *Étape de clustering*

Les séquences peuvent être regroupées en fonction d'un seuil arbitraire déterminant la formation d'une OTU. En 1994, un seuil de 3 % de dissimilarité a été défini par Stackebrandt et Goebel qui ont déterminé qu'une souche est identifiée comme étant une nouvelle espèce lorsque les séquences du gène de l'ARNr 16S présentent moins de 97 % d'homologie [168, 209]. Cette méthode permet de réduire le nombre de séquences à traiter, et donc le temps de calcul, et ainsi simplifier les analyses ultérieures en regroupant les séquences similaires issues souvent de la même espèce. De plus, cette méthode permet de réduire davantage le nombre de lectures présentant encore des erreurs de séquençage. Une séquence contenant possiblement des erreurs et ayant moins de 3 % de dissimilarité sera regroupée dans l'OTU correspondante. Cependant, le clustering par OTU comporte le risque que plusieurs espèces similaires puissent être regroupées en une seule OTU, et que leur identification individuelle soit perdue. La méthode de clustering par OTU et le regroupement des séquences à plus de 97 % de similitude est la plus utilisée dans les analyses de séquençage de l'ARN 16S [210]. Dans la littérature, l'utilisation de ce seuil a été remise en cause [211]. En 2018, Edgar *et al.* ont estimé que le seuil d'identité standard, soit 97 %, était trop bas et que le seuil optimal pour le séquençage de la région V4 était de 100 % [211].

Trois approches sont connues pour former les OTUs [212]. La première méthode de clustering dite sans référence, ou appelée *de novo*, ne nécessite aucune base de données de référence et crée les OTUs entièrement à partir des lectures observées. En comparaison, les méthodes de clustering basées sur des références utilisent une base de données de séquences de taxons connus et comparent les lectures à celles-ci. La méthode de clustering basée sur des références présente l'avantage de comparer facilement les données entre les études utilisant les mêmes bases de données. Elle permet également de réduire les erreurs de séquençage. Dans le cas où des lectures contiendraient suffisamment d'erreurs pour empêcher le regroupement avec une

séquence de référence, ces lectures seraient supprimées. Cette approche présente comme inconvénient d'être dépendante de ces bases de données de référence. En effet, le risque d'éventuelles erreurs ou biais dans la base de données de référence est faible dans un type d'échantillon bien connu tels que les matières fécales, mais toute nouvelle OTU identifiée moins connus sera perdue. La troisième approche pour former les OTUs est le clustering de type « open-reference » qui est une combinaison des deux méthodes précédentes. Les OTUs sont formées par comparaison des lectures à une base de données de référence de séquences dans un premier temps, et lectures non-clusterisées sont regroupées via le clustering *de novo*.

2.7.1.3.3 Variant de séquence d'amplicon (ASV)

Alternativement à l'approche de clustering par OTUs, la méthode d'obtention de variant de séquence d'amplicon (ASV) consiste à considérer chaque séquence contenue dans l'échantillon après nettoyage comme un ASV. Ainsi, une seule différence de base dans la séquence se traduira par un ASV unique [208]. Comme mentionné précédemment, il est rapporté que le nombre de copies de gènes de l'ARNr 16S varie selon les micro-organismes, allant de 1 à 21 chez les bactéries, et ces copies peuvent avoir des séquences différentes au sein d'une même espèce, voire d'une même souche. Ainsi, l'abondance de certaines populations bactériennes peut être fortement surestimée par rapport à d'autres, contribuant ainsi à des erreurs de mesure de diversité, ainsi qu'à une mauvaise assignation taxonomique des séquences. Toutefois, puisqu'il ne s'agit pas d'un regroupement de séquences, il a été rapporté que l'utilisation de l'approche ASV permet de comparer facilement les études entre elles qui utilisent la même région ciblée pour le séquençage [213]. De plus, la séquence du gène cible générera toujours le même ASV, et pourra être comparée à une base de données de référence à une résolution plus élevée, jusqu'à l'espèce, contrairement à la méthode de clustering par OTU qui doit se limiter au genre [213].

2.7.1.3.4 L'assignation taxonomique

Une fois les OTUs formées ou les ASV obtenus, chacun d'entre eux sont assignés à un niveau taxonomique. L'assignation taxonomique est le plus souvent réalisée en comparant un ensemble de séquences assignées taxonomiquement dans un fichier FASTA approprié pour plusieurs bases de données de références populaires telles que SILVA ou RDP, à l'aide d'un algorithme de

classification bayésien naïf disponible sur Mothur et QIIME2, et permet l'assignation jusqu'au genre [206,214]. Le choix de la banque de données est important pour une bonne identification. Ainsi, la richesse et la précision de ces banques sont déterminantes [215]. Pour finir, pour chaque OTU/ASV assigné, l'abondance de chacun d'entre eux dans les échantillons est calculée et présentée dans une table. L'abondance d'une OTU/ASV est définie comme le nombre de séquences correspondant à cette OTU/ASV. L'abondance relative est calculée en rapportant le nombre de séquences d'une OTU/ASV au nombre total de séquences.

Les deux logiciels Mothur et QIIME2 proposent des procédures normalisées appelées « *Standard operation procedure* » (*SOP*) pour l'analyse du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S [200,206]. A ce jour, aucun choix parmi ces méthodes d'analyses bio-informatiques n'est défini pour effectuer ces analyses. L'utilisation des procédures standardisées permet une reproductibilité et une comparaison plus facile entre les études. En effet, le choix du logiciel, du pipeline, des paramètres, de la méthode de clustering et de la banque de données utilisées sont tous des facteurs pouvant affecter les résultats, conduisant à des écarts dans les estimations des mesures de la richesse bactérienne, et rendant la comparaison des études de diversité difficile entre elles [215,216].

2.7.1.4 La profondeur de séquençage

La profondeur de séquençage correspond au nombre de fois où chaque base est séquencée. La profondeur de séquençage varie donc en fonction du nombre de lectures obtenues pour chaque position. Plus la profondeur de séquençage est importante, plus le nombre de lectures sera grand. Cela permettra d'obtenir un plus grand nombre de lectures chevauchantes qui pourront être assemblées, et ainsi obtenir une grande couverture de séquençage. Le taux de couverture correspond à la longueur totale séquencée par rapport à la taille du gène ciblé. La profondeur de séquençage diffère également en fonction du nombre d'échantillons à séquencer. Plus le nombre d'échantillons à séquencer sera élevé, plus le nombre de séquences obtenu par échantillon sera faible. Ainsi, plus la profondeur de séquençage sera faible, plus le risque de perte de diversité augmente. La quantité de séquences nécessaire par échantillon pour garantir une profondeur de

séquençage suffisante et permettre ainsi le séquençage des espèces minoritaires est déterminée en traçant des courbes de raréfaction. Ces courbes estiment le nombre d'OTU ou d'ASV détectés en fonction du nombre de lectures dans un échantillon [217]. Idéalement, une profondeur de séquençage optimale pour décrire le microbiote est identifiée par l'apparition d'un plateau sur la courbe de raréfaction, qui indique que l'augmentation du nombre de lectures ne modifie plus le nombre d'OTU pouvant être déterminé. Cette valeur dépend du niveau de diversité dans chaque échantillon. Par exemple, dans le cas de la viande fraîche, on s'attend à ce que la diversité soit plus grande lorsque comparée à une viande altérée dans laquelle peu d'espèces microbiennes se développent et remplacent les bactéries initialement présentes. Ainsi, les échantillons de viande fraîche nécessiteront plus de séquences par échantillon pour obtenir une profondeur de lecture suffisante en comparaison à des échantillons de viande altérée.

2.7.1.5 Les analyses du microbiote

En premier lieu, il est important de prendre en compte la grande variabilité du nombre de séquences total obtenu entre les échantillons à la suite du séquençage. Cette variabilité est problématique puisqu'elle ne représente pas les réelles différences dans les communautés microbiennes. Ainsi, les échantillons qui possèdent un nombre de séquences plus élevé peuvent apparaître plus diversifiés simplement en raison de la présence d'un plus grand nombre de séquences. Des méthodes de raréfaction ont été proposées pour normaliser la profondeur du séquençage afin de permettre la comparaison d'échantillons sans biais associé à cette profondeur [218]. La raréfaction consiste à sous-échantillonner aléatoirement les données pour obtenir un nombre de séquences égal dans chacun des échantillons. Ce nombre de séquences est souvent égal au nombre de séquences dans l'échantillon qui en contient le moins et cela induit une variation artificielle dans les données en omettant un sous-ensemble aléatoire de séquences observées. De plus, la suppression aléatoire des séquences pour égaliser la profondeur d'échantillonnage pour tous les échantillons contribue à la suppression de séquences rares et donc, à une diminution de l'information des données de séquençage [219].

2.7.1.5.1 La diversité alpha

Différents indices permettent d'évaluer la diversité microbienne d'un microbiote. Un indice de diversité des espèces (OTU/ASV) désigne une mesure mathématique de la diversité des espèces dans une communauté. La première mesure de diversité est la caractérisation de la diversité alpha. Cette diversité est une mesure qui caractérise la diversité au sein d'un échantillon, en se basant sur la richesse spécifique et l'uniformité (*evenness* en anglais) [220]. La richesse spécifique représente le nombre d'espèces (OTUs ou ASVs) différentes observées dans un échantillon. L'uniformité représente la régularité de la distribution des espèces dans l'échantillon. Une espèce représentée abondamment n'apporte pas la même contribution dans la communauté. Ainsi, à nombre d'espèces égal, la présence d'espèces très dominantes entraîne la rareté de certaines autres. La diversité augmente à mesure que le nombre d'espèces augmente et que la répartition des individus entre les espèces devient uniforme. Les caractéristiques des indices de diversité alpha les plus couramment utilisés pour l'analyse de la diversité du microbiote sont présentés dans le tableau 3. Ces indices de diversité alpha sont utilisés de manière complémentaire dans les études de diversité du microbiote car selon l'indice, la considération ou l'influence de la richesse et de l'uniformité varie (Tableau 6) [220].

Tableau 6. – Caractéristiques des indices de diversité alpha les plus couramment utilisés pour l’analyse de la diversité du microbiote.

Indice	Caractéristiques de l’indice	Références
Observed	L’indice est un estimateur de la richesse spécifique. Il représente le nombre d’espèces (OTUs) différentes observées dans un échantillon, sans considérer l’uniformité de leur distribution.	[220]
Chao1	L’indice est un estimateur de la richesse basée sur l’abondance. Il estime le nombre d’espèces réel dans un environnement à partir du nombre d’espèces observées dans l’échantillon. Il donne plus de poids aux espèces aux faibles abondances. L’indice est calculé comme suit : $S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1 (F_1 - 1)}{2 (F_2 + 1)}$ <p>S_{obs} = Nombre d’OTUs observées dans un échantillon. F_1 = Nombre d’OTUs avec une seule séquence (singletons). F_2 = Nombre d’OTUs avec seulement deux séquences (doubletons)</p>	[220,221]
Abundance-based coverage estimator	L’indice est un estimateur de la richesse spécifique basé sur l’abondance et utilise le taux de couverture de l’échantillon, qui est défini comme la proportion des espèces observées. L’indice est calculé comme suit : $S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{F_1}{C_{ACE}} \gamma^2_{ACE}$ <p>S_{abund} = Nombre d’OTUs abondants (qui comptent plus de 10 OTUs dans l’échantillon). S_{rare} = Nombre d’OTUs rares (qui comptent moins de 10 OTUs dans l’échantillon). C_{ACE} = Estimateur de la couverture de l’abondance. F_1 = Nombre de singletons. γ^2_{ACE} = Coefficient de variation estimé pour les OTUs rares.</p>	[220,222]

Shannon L'indice dépend à la fois de la richesse spécifique et de l'uniformité. Il [220,223] accorde une plus grande importance à la richesse des espèces et est influencé par les espèces rares. Sa valeur augmente en même temps que la richesse et l'uniformité. L'indice est calculé comme suit :

$$H_{Shannon} = \sum_{i=1}^{S_{obs}} \left(\frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \right)$$

S_{obs} = Nombre d'OTUs observées dans un échantillon. n_i = Nombre de séquences dans l'OTU i dans un échantillon. N = Nombre total d'OTUs dans un échantillon

Simpson L'indice évalue à la fois la richesse et l'uniformité des espèces et [220,224] prend davantage en considération l'uniformité. Il donne ainsi plus d'importance aux espèces dominantes. Il mesure la probabilité que deux séquences choisies au hasard appartiennent à la même espèce. La valeur de l'indice varie de 0 à 1 et augmente lorsque la diversité diminue. L'indice est calculé comme suit :

$$D_{Simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)}$$

S_{obs} = Nombre d'OTUs observées dans un échantillon. n_i = Nombre de séquences dans l'OTU i dans un échantillon. N = Nombre total d'OTUs dans un échantillon.

Inverse de Simpson Il permet de faciliter l'interprétation des résultats en étant plus intuitif. Plus la valeur de l'indice est élevée (maximum 1), plus la diversité est grande. L'indice est calculé comme suit :

$$InvSimpson = \frac{1}{D_{Simpson}}$$

2.7.1.5.2 *La diversité bêta*

La deuxième mesure de diversité est la caractérisation de la diversité bêta des échantillons. Cette diversité mesure une distance correspondant à la différence ou la ressemblance entre différents échantillons ou groupes en s'appuyant sur la diversité des espèces qu'ils contiennent. Ceci signifie que la mesure de diversité bêta n'est pas fixe pour un échantillon, et diffère en fonction des groupes d'échantillons qui sont comparés entre eux. Il existe plusieurs indices de diversité bêta qui sont couramment utilisés lors de la même analyse de microbiote, encore une fois en raison des différences de pondération des composants. Le choix de l'indice dépend des objectifs de l'étude. Par exemple, l'Unifrac est une mesure de distance de la diversité bêta basée sur les distances phylogénétiques entre les micro-organismes. L'Unifrac pondérée est basée sur l'abondance des micro-organismes, tandis que l'Unifrac non pondérée ne considère que leur présence ou leur absence [225]. Au contraire, les indices de Jaccard et de Bray-Curtis, les plus populaires dans les études de microbiote, sont utilisés pour évaluer la dissimilarité entre les groupes et sont présentés dans le tableau 7 [226].

Tableau 7. – Caractéristiques des indices de diversité bêta les plus couramment utilisés pour l’analyse de la diversité du microbiote.

Indice	Caractéristiques de l’indice	Références
Indice de dissimilarité de Jaccard	<p>L’indice de dissimilarité de Jaccard ne tient compte que de la présence ou de l’absence des différentes espèces observées dans l’ensemble de la population. Il prend en compte le nombre d’espèces partagées entre deux échantillons et le nombre d’espèces trouvées dans chacun. La valeur de l’indice varie de 0 à 1. Si la valeur est de 0, les communautés microbiennes sont identiques entre les échantillons. À l’inverse, si la valeur est de 1, alors le microbiote est différent entre les échantillons. L’indice est calculé comme suit</p> $D_{Jaccard} = \frac{S_{AB}}{S_A + S_B - S_{AB}}$ <p>S_{AB} = Nombre d’OTUs partagées entre les communautés A et B. S_A = Nombre d’OTUs dans la communauté A. S_B = Nombre d’OTUs dans la communauté B.</p>	[227]
Indice de dissimilarité de Bray-Curtis	<p>L’indice de dissimilarité de Bray-Curtis décrit la dissemblance entre la structure de deux communautés et prend en compte autant la présence/absence des espèces que leur abondance. L’indice varie de 0 à 1. Si la valeur est de 0, alors l’abondance observée est la même pour chaque espèce. À l’inverse, si la valeur est de 1, les échantillons n’ont alors aucune espèce en commun. L’indice est calculé comme suit :</p> $D_{Bray-Curtis} = 1 - 2 \frac{\sum \min(S_{A,i}, S_{B,i})}{\sum S_{A,i} + S_{B,i}}$ <p>$S_{A,i}$ = Nombre de séquences d’une espèce i dans la communauté A. $S_{B,i}$ = Nombre de séquences d’une espèce i dans la communauté B.</p>	[227,228]

Le calcul des indices de diversité bêta pour chaque comparaison entre les groupes d'échantillons se traduit par une matrice de distance, indiquant l'abondance ou la présence d'espèces dans chaque échantillon ou groupe étudié et est utilisé pour l'ordination et l'analyse statistique des données du microbiote. Deux méthodes d'ordination, à savoir l'analyse en coordonnées principales (*Principal Coordinates Analysis (PCoA)*) [229] et le positionnement multidimensionnel non-métrique (*non-metric multidimensional scaling (NMDS)*) [230] sont les plus fréquemment utilisées afin de représenter graphiquement les relations entre les échantillons et les espèces dans un espace de faible dimension. La PCoA effectue une transformation linéaire de la matrice de distance pour produire de nouveaux axes principaux intégrant la majeure partie de la variation présente dans les données. Pour le NMDS, un algorithme déplace les points graduellement dans un nombre de dimensions prédéfini (généralement 2) afin de s'approcher le plus possible des distances réelles. Dans ces graphiques, chaque point représente un échantillon. Plus la distance entre deux points est grande, plus les communautés microbiennes qui composent ces échantillons sont différentes. Il est possible de mesurer statistiquement si les distances entre les échantillons au sein d'un groupe sont plus semblables entre elles qu'entre les échantillons des autres groupes à l'aide d'outils d'analyse de variance multivariée par permutation, connus sous le nom de PERMANOVA (pour *permutational multivariate analysis of variance*) [231]. Le test PERMANOVA est un test statistique multivarié non paramétrique. Il est utilisé pour comparer les groupes d'échantillons et tester l'hypothèse nulle selon laquelle les centroïdes et la dispersion dans les groupes tels que définis dans l'espace d'ordination sont équivalents pour tous les groupes.

2.7.1.5.3 Tests d'identification de biomarqueurs microbiens

Un premier test nommé LEfSe (pour *Linear discriminant analysis Effect Size*) établi en 2011 est un algorithme qui permet de déterminer des biomarqueurs qui identifient les caractéristiques génomiques (taxons, gènes, voies métaboliques) responsables des différences entre deux ou plusieurs conditions d'une variable [232]. Il peut permettre d'identifier les espèces dont l'abondance est statistiquement différente entre différents groupes d'échantillons. Des tests statistiques classiques tels que les analyses de la variance (ANOVA : *analysis of variance*) sont couplées à une analyse discriminante linéaire pour estimer la taille de l'effet des variations

significatives. Par défaut, seules les espèces dont le score d'analyse discriminante linéaire logarithmique est supérieur à 2 sont qualifiées de significativement différentes en termes d'abondance.

Pour permettre d'associer les caractéristiques des métadonnées aux mesures de la communauté microbienne, des analyses statistiques plus récentes ont été conçues qui combinent des méthodologies pour évaluer l'association multivariable des caractéristiques de la communauté microbienne avec des métadonnées complexes. L'analyse MaAslin2 conçu en 2021 (pour *Multivariate Association with Linear Models 2*) [233] permet d'identifier des espèces (OTU ou ASV) qui sont associées à des variations de composition du microbiote entre des échantillons. Ainsi, ces analyses permettent d'indiquer si une espèce est plus associée à un facteur ou à une condition et permet d'identifier potentiellement des biomarqueurs microbiens. L'analyse de MaAslin2 est calculée selon un modèle de régression linéaire multivariable pour tester l'association entre l'abondance relative des espèces microbiennes et les variables testées. L'intérêt de MaAslin2 est que l'analyse prend en compte les mesures répétées et les multiple covariables. MaAslin2 génère deux types de fichiers : les données et la visualisation. Une liste des associations, qu'elles soient positives ou négatives, est obtenue, déterminant le nom de la variable étant associée à un taxon microbien, ainsi que les valeurs statistiques de l'analyse. Pour chacune des associations significatives, MaAslin2 génère des graphiques après normalisation, filtrage et transformation automatique des données, soit sous forme de nuage de points pour les variables quantitatives, ou sous forme de boîtes à moustaches dans le cas des catégories des variables qualitatives.

Messages clés

- L'intérêt de l'utilisation des techniques moléculaires comble les désavantages des méthodes de culture classique
- Des techniques de biologie moléculaire non ciblées, telles que le séquençage à haut débit, permettent la caractérisation d'un grand nombre de bactérie composant un microbiote
- Le séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S via la plateforme Illumina est le plus fréquemment utilisé pour l'étude de la composition et de la diversité microbienne d'un écosystème
- Le traitement des données de séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S est le plus généralement effectué à l'aide de logiciels informatique connus, tel que Mothur ou QIIME 2, et proposent des procédures normalisées incluant : nettoyage des séquences, la formation des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) ou des variants de séquence d'amplicon (ASV), la création d'une table d'abondance de ces séquences et une table de leur assignation taxonomique
- La diversité microbienne d'un microbiote est évaluée selon les mesures des indices de diversité alpha (caractéristique de la diversité au sein d'un échantillon) et bêta (distance correspondant à la différence ou la ressemblance entre différents échantillons ou groupes en s'appuyant sur la diversité des espèces qu'ils contiennent)

2.7.2 Application générale des méthodes de séquençage de nouvelle génération en microbiologie alimentaire

Les techniques de séquençage de nouvelle génération ont largement été utilisées pour l'analyse du microbiote de l'écosystème des animaux destinés à la consommation humaine à la ferme, tels que le microbiote de l'environnement (air, moulée) et celui de l'animal (système digestif, système respiratoire et cavité buccale) [234–237]. De nombreuses études à l'échelle internationale ont permis de déterminer les bactéries présentes dans le microbiote intestinal qui pourraient avoir des effets bénéfiques sur la santé et les performances zootechniques des animaux, ainsi que sur la qualité de leur viande. En effet, le microbiote intestinal joue un rôle important dans le métabolisme de l'hôte, dans le développement du système immunitaire et dans la résistance aux agents pathogènes. Plusieurs facteurs comme la génétique, l'alimentation (composition et présentation), l'âge, les traitements antibiotiques administrés ou encore la présence d'agents pathogènes peuvent influencer la composition du microbiote intestinal. Le microbiote intestinal

du porc est composé en majorité par les phyla des Firmicutes, les Bacteroidetes et les Proteobacteria. Cette composition varie à l'intérieur même du système digestif dans les différents segments du tractus-intestinal. Globalement, il est rapporté que les Proteobacteria dominent (50 - 75 %), suivies par les Firmicutes (20 %) dans le jejunum et l'ileum, tandis qu'au niveau du caecum et du côlon, les Firmicutes prédominent (> 75 %), suivi des Bacteroidetes et des Proteobacteria (15 - 50 %) [244,245]. Le genre *Prevotella* est connu pour être le plus abondant dans le caecum et le côlon, et se retrouve dans les matières fécales. Chez les porcs en finition, dans les fèces, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* et *Clostridia* font partie du microbiote dominant [246,247].

L'application et l'utilisation des techniques de séquençage de nouvelle génération en lien avec la salubrité alimentaire et l'amélioration de la qualité des aliments n'en sont encore qu'à leurs débuts. Des mesures prometteuses et intéressantes pour prédire la présence ou l'émergence d'agents pathogènes, caractériser des microbiotes peu connus, identifier les voies de transmission et de nouvelles sources de contamination ont été démontrés par des études. Plus spécifiquement en lien avec la microbiologie des viandes, les premières études se sont principalement concentrées sur des échantillons de viande de bœuf [248]. En microbiologie alimentaire, le séquençage est principalement utilisé de trois manières :

- Le séquençage du génome entier, qui permet de déterminer la séquence complète du génome. Par exemple, dans les établissements de transformation de porc, des études ont identifié les principales voies d'entrée de *L. monocytogenes* dans des produits de porc prêt-à-manger dans le but d'identifier l'origine de la contamination et de faciliter la mise en œuvre ou la vérification des mesures de contrôle [249,250]. De plus, les méthodes de séquençage du génome entier ont également permis de caractériser le génome d'isolats de *L. monocytogenes* dans un abattoir porcin au Québec dans le but d'identifier les déterminants génétiques pouvant être associés à la persistance de ces isolats résistants aux composés d'ammonium quaternaire dans l'environnement d'abattage, qui sont couramment utilisés comme désinfectant dans les abattoirs [251].
- La métagénomique, où le séquençage de l'ensemble du contenu génomique des communautés microbiennes est effectué, qui permet la caractérisation taxonomique et

fonctionnelle des génomes. Par exemple, De Filippis *et al.* ont caractérisé le métagénome de viande de bœuf en fonction des conditions d’emballage [248]. Bien que *Pseudomonas* soit connu pour être dominant sur les viandes emballées à l’air, il a été démontré que plusieurs profils de souches de *P. fragi* sont également sélectionnés dans l’emballage sous vide. L’utilisation de la métagénomique a donc démontré que l’étude de la diversité des bactéries d’altération est nécessaire pour déterminer le rôle des communautés microbiennes retrouvées sur les viandes en fonction des conditions d’emballage.

- Le metabarcoding, où les technologies NGS sont utilisées pour identifier tous les micro-organismes présents dans un échantillon en utilisant des marqueurs de gènes, tels que l’ARNr 16S pour les bactéries. Malgré le fait que le metabarcoding ne permette pas d’assigner la taxonomie au-delà du genre, il reste une des méthodes s’appuyant sur le séquençage à haut débit les plus populaires dans le domaine alimentaire. D’après l’étude de Jagadeesan *et al.*, il a été rapporté que plus de 63 % des publications scientifiques parues entre 2011 et 2017 ont appliqué des techniques de nouvelle génération par metabarcoding pour évaluer le microbiote des aliments [252]. Ces méthodes permettent d’assurer une identification rapide de la majorité des micro-organismes présents dans les échantillons alimentaires.

2.7.3 Description du microbiote des carcasses de porcs

Ce n’est que récemment que le microbiote des carcasses de porc a été décrit à l’aide de technologies de séquençage à haut débit dans la littérature scientifique, ce qui a permis d’apporter une description plus détaillée de la diversité des populations bactériennes présentes sur celles-ci.

En utilisant des méthodes de séquençage à haut débit, ciblant le séquençage de l’ARNr 16S, nous savons maintenant que les principaux phyla et genres bactériens retrouvés à la surface des carcasses de porc sont principalement des Proterobacteria, Firmicutes, et les Bacteroidetes comprenant principalement les genres *Brochotrix*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Fusobacterium*, *Lactotoccus*, *Actonibacillus*, *Staphylococcus*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Escherichia* et *Chryseobacterium* [34,95,103,253].

Ces communautés bactériennes ont été rapportées dans l'étude conduite en 2019 par Jakobsen *et al.* dans un abattoir au Danemark. Ces auteurs ont identifié un transfert bactérien des amygdales et des fèces des porcs vers la surface de la carcasse pour dix carcasses échantillonnées juste avant l'étape de refroidissement, sur une même journée d'abattage [253]. Trois zones ont été échantillonnées sur les carcasses retenues, soit la longe centrale (1000 cm²), la gorge (400 cm²) et la zone autour du rectum (400 cm²), sur un même côté. Le microbiote a été caractérisé par la méthode de séquençage de l'ARNr 16S (régions V3-V4) sur la plateforme Illumina Miseq. Les auteurs ont rapporté que les communautés bactériennes des carcasses de la zone de la gorge étaient similaires, au niveau du phylum, aux communautés retrouvées sur les amygdales. Cette partie des carcasses était dominée par le phylum des Proteobacteria (50 %), la famille des *Enterobacteriaceae*, ainsi que les genres *Yersinia*, *Fusobacterium* et *Actinobacillus*, avec une abondance relative de 4 %, 6 % et 5 %, respectivement. Les zones du jambon et autour du rectum étaient elles aussi dominées par les Protéobactéries (environ 80 %), mais ne contenaient qu'une quantité minime (proche d'une abondance relative de 0) de *Fusobacterium* lorsque comparées aux zones de la gorge. Le microbiote de la zone du rectum était quant à elle plus dominée par *Escherichia et Shigella*. Les analyses de diversité bêta ont confirmé que les échantillons de la gorge se regroupaient plus près de ceux provenant des amygdales que ceux des autres zones de la carcasse, même si une différence significative était tout de même observée entre ces deux groupes et que 45 % des OTUs identifiées à partir des amygdales ont été également retrouvées à la surface des carcasses dans les zones de la gorge et du rectum. Les auteurs ont observé une abondance relative plus élevée des genres *Fusobacterium* et *Actinobacillus* sur la zone de gorge de la carcasse, ce qui indiquerait une contamination de la carcasse par les amygdales, tandis que la présence plus élevée de bactéries appartenant à la classe des Clostridia indiquerait une contamination des carcasses par les fèces. La source de contamination de la zone du rectum par les *Enterobacteriaceae* n'avait pas pu être entièrement attribuée sachant que les échantillons de fèces et d'amygdales ont montré une faible prévalence (données non fournies) pour cette famille bactérienne. Cette étude est la première qui a permis de prouver que l'utilisation du séquençage

à haut débit est nécessaire pour identifier les sources de contamination des bactéries spécifiques retrouvées sur les carcasses de porc.

Dans le même objectif, l'étude menée par Zwirzitz et *al.* en Autriche a permis décrire les communautés bactériennes des carcasses de porc et de l'environnement de l'abattoir représenté par les employés (gants) et les équipements (couteaux, scie à fendre, rail de classification, murs, eau, buses) afin d'identifier les sites possibles de transmission de la contamination aux carcasses dans le but de réduire le risque de contamination croisée [34]. Douze carcasses de porc provenant de trois fermes différentes ont alors été échantillonnées. Pour chaque carcasse, un seul échantillon au niveau du dos (100 cm²) a été prélevé par chiffonnage à l'aide de lingettes, aux différentes étapes de flambage, d'épilation, d'éviscération et dans le camion de transport des carcasses. Le séquençage de l'ARNr 16S (régions V3-V4) a été réalisé sur la plateforme Illumina, complété par de techniques de troisième génération (séquenceur PacBio). Parmi les 50 ASV les plus abondants retrouvés, *Bacillus*, *Chrysobacterium*, *Flavobacterium*, *Lactococcus*, *Microbacterium* et *Moraxella* ont été identifiés ayant un potentiel d'altération pour la viande. Ces genres représentaient plus de 50 % des séquences observées et leurs distributions étaient homogènes de l'étape de flambage jusqu'à l'arrivée des carcasses dans le camion de transport. Il a été observé qu'après l'étape de flambage, la diversité microbienne était significativement réduite et le genre *Anoxybacillus* dominait à la surface des carcasses, représentant plus de 50 % des séquences présentes. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la communauté microbienne retrouvée à la surface des viandes était différente de celle présente sur la peau des animaux à leur arrivée dans l'établissement d'abattage. Les auteurs ont pu rapporter que les principales sources de contamination contribuant à la communauté microbienne retrouvée sur les carcasses provenaient du tunnel de polissage, du rail de l'étape de classement et des gants des employés lors du classement et du chargement des carcasses dans les camions. Cette étude a permis d'identifier des taxons individuels liés à une niche spécifique, taxons qui n'auraient jamais pu être détectés en utilisant les méthodes de culture classique. Par exemple, les genres *Luteimonas* et *Helicobacter* n'ont été retrouvés que dans les échantillons de l'équipement du polissage et le genre *Spingomonas* uniquement sur les murs de la chambre de refroidissement. Cependant, il est

difficile de conclure sur l'orientation de la contamination croisée, mais les auteurs ont clairement démontré que la plupart des bactéries avaient été transférées par contact direct avec les surfaces et que la contribution de la contamination par l'environnement représenté par l'air ou les parois des chambres de refroidissement était faible.

Une autre étude de Peruzzy *et al.* publiée en 2021, a décrit le microbiote de huit carcasses de porc dans un petit abattoir (48 carcasses produites/jour) [103]. L'échantillonnage a été réalisé dans deux abattoirs en Italie, et a été visité deux fois, à une semaine d'intervalle. Pour chaque carcasse, quatre zones de 100 cm² (jambon, dos, bajoue et ventre) ont été échantillonnées. Pour chacune de ces zones, trois prélèvements à l'aide d'éponges ont été réalisés. Le séquençage de l'ARNr 16S (région V3-V4) a également été réalisé sur la plateforme Illumina Miseq. Les auteurs ont observé que les bactéries dominantes des huit carcasses pour chaque zone ciblée appartenaient au genre *Brochothrix* (23 %), suivi par *Pseudomonas* (8 %), *Rothia* (4 %) et *Acinetobacter* (4 %), et représentaient plus de 50 % du microbiote total. Différentes bactéries potentiellement liées à l'altération de la viande telles que *Psychrobacter* (4 %) et *Chryseobacterium* (2 %) ont également été identifiées. Les échantillons provenant de la bajoue présentaient la plus faible diversité bactérienne, basé sur l'indice Chao1, lorsque comparés aux échantillons provenant du ventre. Cette étude est la première donnant un portrait global et complet de la composition de la communauté bactérienne sur quatre zones de carcasses de porc et les auteurs ont conclu que les quatre zones de la surface de ces différentes carcasses étaient dominées par les mêmes communautés bactériennes, même si ce microbiote variait d'un abattoir à l'autre. Ainsi, l'abattoir A présentait des indices de diversité plus faibles et le microbiote des carcasses était principalement dominé par *Brochothrix*, tandis que l'abattoir B présentait des mesures de diversité plus élevées, sans la présence clairement définie d'un genre prédominant.

Enfin, en 2019, dans l'étude menée par Van Ba *et al.* et conduite en Corée les auteurs ont identifié les communautés microbiennes de 12 carcasses de porc après chacune des étapes de la saignée, de l'éviscération et du refroidissement, ainsi que sur 3 produits de découpes de porc (longe, jambon, épaule) associés à ces carcasses [95]. Un des principaux buts de l'article était d'évaluer

l'efficacité d'une pulvérisation d'acide lactique à différentes concentrations, autant sur les carcasses que sur les produits de découpe. Dans cette étude, il est important de noter que le séquençage de l'ARNr 16S a été réalisé à partir de colonies individuelles cultivées préalablement sur différents types de milieux gélosés (TSA, VRBG...). Les genres *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Acinetobacter* et *Corynebacterium* ont été identifiés sur les carcasses avant et après l'étape de refroidissement. *Staphylococcus*, *Acinetobacter* et *Corynebacterium* ont également été identifiés sur les produits de découpes et les auteurs suggéraient alors une transmission naturelle de la contamination des carcasses à leurs produits de découpes pendant la transformation. Par ailleurs, cette étude a également démontré que la pulvérisation d'acide lactique à 4 % permettait la réduction la plus significative des concentrations bactériennes obtenues par dénombrement de toutes les espèces bactériennes ciblées (*Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Enterococcus* et *Corynebacterium*) entre 0,4 et 1,40 log de réduction, lorsque comparée à une concentration d'acide lactique de 2 %. L'étude démontrait alors l'efficacité de cette méthode de décontamination afin de contrôler la contamination bactérienne et soulignait l'intérêt du séquençage à haut débit pour contribuer à l'amélioration de la qualité microbiologique des viandes.

Messages clés

- Les études portant sur la caractérisation du microbiote de surface des carcasses de porc sont limitées dans la littérature, mais apportent de nouvelles connaissances sur les taxons retrouvés à la surface de celles-ci
- Les principaux genres retrouvés sont : *Brochrotrix*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Fusobacterium*, *Lactotoccus*, *Actinobacillus*, *Staphylococcus*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Escherichia* et *Chryseobacterium*
- La diversité microbienne semble plus faible à la surface des zones de bajoue des carcasses lorsque comparée aux zones du ventre ou du jambon
- Les études se concentrent principalement sur l'identification de l'origine de la contamination (transfert bactérien des amygdales, des fèces, des équipements vers la surface des carcasses)
- Différents taxons ont été associés à une niche spécifique. Ainsi, la présence des genres *Fusobacterium* et *Actinobacillus*, *Luteimonas* et *Helicobacter*, *Spingomonas*, et les bactéries appartenant à la classe des Clostridia indiquerait une contamination de la carcasse par les amygdales, par l'équipement du polissage, dans les chambres de refroidissement et par les matières fécales, respectivement

2.7.4 Description du microbiote de viande emballée sous vide

Depuis les années 2000, les techniques moléculaires telles que la réaction en chaîne par polymérase et l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (PCR-DGGE) ont été appliquées pour explorer en détail les populations bactériennes des viandes de porc [117,254]. Ces techniques surmontent certaines limites des méthodes de culture classique, mais ce n'est qu'avec les méthodes de séquençage à haut débit qu'une vision plus globale des bactéries présentes peut être obtenue. Le tableau 8 passe brièvement en revue la liste des applications récentes des méthodes de séquençage de nouvelle génération appliquées aux viandes de porc fraîches et emballées sous vide.

Tableau 8. – Liste des applications récentes des méthodes de séquençage de nouvelle génération appliquées aux viandes de porc fraîches et emballées sous vide.

Applications	Type de produit	Méthodologie	Référence
Description de la diversité bactérienne	Coupe de jambon emballée sous vide entreposée à 0°C pendant 21 jours	Séquençage de l'ARNr 16S - Pyroséquençage (454)	[58]
	Coupe de jambon et de longe de porc	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina	[95]
	Viande de porc hachée	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina	[114]
	Pièce de viande de porc entreposée à 4°C pendant 9 jours	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina HiSeq	[106]
	Pièce de viande de porc	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina MiSeq	[108]
Impact de la température d'entreposage	Viande de porc fraîche entreposée de -2°C, 4°C, 10°C et 25°C	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina MiSeq	[109]
Impact de l'environnement de transformation	Pièce de viande de porc (au détail)	Séquençage de l'ARNr 16S - Pyroséquençage (454)	[107]
Impact de l'ajout d'agents technologiques	Pièce de jambon	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina MiSeq	[255]
Causes de l'altération de l'emballage soufflé	Coupe primaire emballée sous vide	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina MiSeq	[256]
Impact des réductions du sel	Coupe de ventre emballée sous vide entreposée à basse température et à température ambiante	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina MiSeq	[36]
	Pièce de longe de porc	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina	[257]
	Pièce de longe de porc	Séquençage de l'ARNr 16S - Illumina MiSeq	[258]

Sur les viandes fraîches entreposées à 4°C, il est rapporté que la richesse et la diversité bactérienne diminuent au fur et à mesure que la durée de l'entreposage augmente. Li *et al.* a démontré qu'au début de l'entreposage, les échantillons de viande de porc étaient similaires en termes de diversité et de composition [106]. Les phyla Proteobacteria et Firmicutes étaient les plus dominants, suivis des Bacteroidetes, Actinobacteria et Deinococcus-Thermus. Les genres *Acinetobacter* (48 %) et *Exiguobacterium* (30 %) prédominaient alors que ce dernier n'ait jamais été retrouvé sur des viandes fraîches. Le genre *Acinetobacter*, et plus particulièrement *Acinetobacter albensis*, a également été observé dans des coupes de jambon et de longes de porc [95]. Au fur et à mesure que le temps d'entreposage augmentait, l'abondance des Proteobacteria augmentait, passant de 50 % à 90 % des OTUs, tandis que l'abondance des Firmicutes diminuait, de 40 % à 5 %. De plus, les résultats de diversité bêta démontraient que les échantillons au début de l'entreposage étaient clairement distancés des échantillons en fin d'entreposage après neuf jours. À la fin de l'entreposage, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Photobacterium* (65 %) étaient les genres dominants, passant d'une abondance de 10 % à plus de 80 %, et de 48 % à plus de 70 % pour *Pseudomonas* et *Acinetobacter*, respectivement.

À notre connaissance, une seule étude a rapporté l'analyse du microbiote de longes de porc fraîches et altérées en fonction de la température d'entreposage [109]. L'étude a montré que la diversité microbienne de la viande de porc stockée à -2°C et 4°C et altérée apparaissait moins élevée que celle retrouvée sur la viande fraîche, alors que les viandes altérées entreposées à 10°C et 25°C présentaient des mesures de diversité microbienne plus élevées lorsque que celles de la viande fraîche. La composition microbienne était différente entre des viandes non altérées et altérées. Les phyla des Proteobacteria et des Bacteroidetes étaient les plus dominants sur la viande fraîche, tandis que les Proteobacteria et les Firmicutes étaient les plus dominants sur la viande altérée, quelle que soit la température d'entreposage. *Pseudomonas* et *Brochothrix* étaient les genres dominants sur la viande altérée entreposée à -2°C et 4°C, représentant plus de 90 % des genres identifiés. *Pseudomonas* était plus abondant que *Brochothrix* sur les viandes altérées entreposées à 4°C, et l'abondance relative de *Pseudomonas* augmentait pour les échantillons entreposés à -2°C. Sur les échantillons de viandes entreposés à 10°C et altérés, il a été observé que les genres dominants étaient ceux présents à la fois sur la viande stockée à basse

(-2°C) et haute (25°C) températures, indiquant alors qu'à une température d'entreposage de 10°C, la croissance à la fois des bactéries psychrophiles et mésophiles était favorisée. L'étude a pu mettre en évidence des marqueurs microbiens associés à l'altération de la viande en fonction de la température d'entreposage. Ainsi, *Acinetobacter*, *Myroides* et *Kurthia* ont été identifiés comme des marqueurs microbiens de la viande de porc altérée après un entreposage à 25°C, tandis que *Vibrionimonas* s'est avéré être un marqueur de fraîcheur de la viande de porc.

Enfin, l'étude conduite par Zhao *et al.* est la seule qui caractérise le microbiote des viandes de porc emballées sous vide. Le microbiote a été identifié sur des coupes de jambon emballées sous vide et entreposées à 0°C pendant 21 jours [58]. Les principales bactéries associées à la détérioration de la viande étaient, dans cette étude, les *Micrococcaceae*, les *Flavobacteriaceae*, les *Enterobacteriaceae*, les *Lactobacillaceae* et les *Carnobacteriaceae*. La communauté microbienne de la viande de porc emballée sous vide s'y était diversifiée au cours des sept premiers jours d'entreposage. Puis, à partir du septième jour et ce, jusqu'à la fin des 21 jours, la diversité bactérienne avait continuellement diminué. Au début de l'entreposage, *Micrococcaceae* (27 %) et *Flavobacteriaceae* (33 %) étaient les familles les plus prédominantes. Au septième jour, les *Rhodobacteraceae* (26 %), prédominaient, et l'abondance de *Flavobacteriaceae* (13 %) était encore élevée, pour ensuite continuellement diminué au fur et à mesure de l'entreposage. Dès le 14^{ème} jour et jusqu'à la fin de l'entreposage, la composition microbienne avait changé et les *Lactobacillaceae* (70 %), *Enterobacteriaceae* (7 %) et *Carnobacteriaceae* (4 %) prédominaient.

Messages clés

- Comparées aux surfaces de viandes de porc frais, les communautés microbiennes des viandes de porc emballées sous vides, identifiées à l'aide du séquençage de l'ARN16S, ont été peu caractérisées
- L'impact de la température d'entreposage, de l'environnement de transformation, de l'ajout d'agents technologiques ou celui de la réduction du sel ont été principalement étudiés
- Au début de l'entreposage de viandes fraîches à 4°C, le phylum des Firmicutes domine, laissant la place aux Proteobacteria (genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Photobacterium*) au fur et à mesure que le temps d'entreposage augmente
- Des taxons microbiens, tels que *Vibrionimonas*, ont pu être identifiés comme marqueur de fraîcheur de la viande de porc entreposé à 4°C
- Sur des viandes de porc emballées sous vides, la diversité microbienne diminue continuellement lors de l'entreposage, passant des genres appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, *Flavobacteriaceae* à ceux appartenant aux *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, et *Carnobacteriaceae*
- Cette diversité microbienne est apparue plus faible sur des produits entreposés à des températures inférieures à 4°C comparés à ceux entreposés à 10°C

Chapitre 3 – Problématique, hypothèse et objectifs

L'un des principaux buts des établissements d'abattage et de transformation alimentaire est de produire des viandes salubres, en maîtrisant les différents procédés pour satisfaire les critères microbiologiques, obtenant ainsi des charges bactériennes et des taux de contamination microbienne à la surface des carcasses et produits de viandes les plus faibles possibles. La qualité microbiologique des carcasses et des viandes est fréquemment évaluée en utilisant des techniques dépendantes de la culture bactérienne. Cependant, les dénombrements des indicateurs microbiens ne permettent pas de refléter une vision globale de la contamination microbienne. Aujourd'hui, il est possible d'étudier des microbiotes diversifiés, sans avoir à passer par l'étape de la culture, grâce aux technologies de pointe en caractérisation moléculaire, comme le séquençage à haut débit. Ces technologies nous permettent d'avoir un portrait détaillé de la microbiologie de la carcasse et de la viande. Très peu d'études disponibles dans la littérature scientifique se sont focalisées sur l'analyse de la composition et de la diversité de ces microbiotes. De plus, au Canada, aucune étude n'a décrit l'ensemble des communautés microbiennes des carcasses et des viandes qui y sont produites et exportées. Par conséquent, il y a un manque général d'informations disponibles sur la variation du microbiote des carcasses et des viandes de porc destinées à l'exportation dans de réelles conditions de transformation et d'entreposage. L'hypothèse de cette thèse est que le microbiote de surface des carcasses et des produits finis de porc peut être utilisé pour identifier des indicateurs de la salubrité alimentaire.

Ainsi, le premier objectif de cette étude a été de décrire la variabilité du microbiote de surface des carcasses de porc à l'abattoir en utilisant une approche de séquençage à haut débit en fonction de la provenance des animaux. Le but était de déterminer si ce microbiote variait et dans quelle mesure il pouvait être associé à la ferme d'origine des animaux une fois l'abattage des porcs et l'habillage des carcasses complétés. Le deuxième objectif était de décrire la variation du microbiote des carcasses de porc pendant quatre semaines après le processus d'habillage et d'étudier l'impact du refroidissement sur ce microbiote. Enfin, le troisième objectif était de décrire sur une période de plusieurs semaines l'évolution du microbiote de produits finis de porc

(longes) emballés sous vide et entreposé à des températures imitant l'exportation outre-mer. Il s'agissait de déterminer la variation de ce microbiote entre les produits provenant de différents lots de porcs abattus, et de déterminer l'impact de différents écarts de température d'entreposage sur ce microbiote. Le but était de déterminer si le microbiote de surface de la viande de porc peut être utilisé comme signature de la perte de contrôle sanitaire au cours de la chaîne de distribution.

Chapitre 4 – Similar carcass surface microbiota observed following primary processing of different pig batches

Charlotte Braley^{1,2*}, Philippe Fravallo^{3,4}, Marie-Lou Gaucher^{1,2,3,5}, Guillaume Larivière-Gauthier⁴, Fanie Shedleur-Bourguignon^{1,2}, Jessie Longpré^{5,6}, Alexandre Thibodeau^{1,2,3,5}

¹Chaire de Recherche en Salubrité des Viandes (CRSV), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

²Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

³Groupe de Recherche et d'Enseignement en Salubrité Alimentaire (GRESA), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

⁴Le Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM), Paris, France.

⁵Center de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole (CRIPA), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

⁶F. Ménard, Division d'Olymel s.e.c., Ange-Gardien, QC, Canada.

*Correspondence

Charlotte Braley

braley.braley@umontreal.ca

Cet article a été publié le 27 mai 2022 dans le journal *Frontiers in Microbiology*.

Author Contributions :

CB: methodology, software, visualization, writing—original draft, and writing—review and editing. PF: conceptualization, supervision, writing—review and editing, and funding acquisition. M-LG: writing—reviewing and editing the manuscript. GL-G: resources, software, and writing—review and editing. FS-B: resources, software, and writing—review and editing. JL: resources, project administration, and writing—review and editing. AT: conceptualization, methodology, validation, supervision, project administration, resources, and writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Abstract

Bacterial contamination during meat processing is a concern for both food safety and for the shelf life of pork meat products. The gut microbiota of meat-producing animals is one of the most important sources of surface contamination of processed carcasses. This microbiota is recognized to vary between pigs from different farms and could thus be reflected on the bacterial contamination of carcasses at time of processing. In this study, the microbiota of 26 carcasses of pigs originating from different farms (i.e., batches) were compared to determine if an association could be observed between carcass surface microbiota (top and bottom) and the origin of slaughtered animals. The microbiota of the top and bottom carcass surface areas was analyzed by culturing classical indicator microorganisms (mesophilic aerobic bacteria, Enterobacteria, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, and lactic bacteria), by the detection of *Salmonella*, and by 16S rRNA gene sequencing. Culture results showed higher Enterobacteria, *E. coli*, and lactic bacteria counts for the bottom areas of the carcasses (neck/chest/shoulder) when compared to the top areas. *Salmonella* was not detected in any samples. Globally, 16S rRNA gene sequencing showed a similar composition and diversity between the top and bottom carcass areas. Despite the presence of some genera associated with fecal contamination such as *Terrisporobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Turicibacter*, *Clostridium sensu stricto*1, and *Streptococcus* on the carcass surface, sequencing analysis suggested that there was no difference between the different batches of samples from the top and bottom areas of the carcasses. The primary processing therefore appears to cause a uniformization of the carcass global surface microbiota, with some specific bacteria being different depending on the carcass area sampled.

Keywords : pig slaughterhouse, pork carcass, farm influence, microbiota, primary processing

Introduction

The production of proteins derived from animal sources is an important part of the food chain for humans. Pork products are a growing part of the world economy. Since 1961, the world pork production has increased by four to five times, reaching 112 million tons in 2014 (Ritchie and Roser, 2017). Moreover, consumers are demanding premium food commodities, forcing producers to further reduce bacterial contamination on pig carcasses to improve the quality of the final pork meat products. Bacteria from different sources such as the skin and the digestive tract of the animals, the slaughterhouse environment and equipment contribute to the constitution of the carcass microbiota (Biasino et al., 2018; Zwirzitz et al., 2020) during processing. In pig meat processing, evisceration is universally recognized as a critical step that often results in carcass contamination by bacterial populations, particularly when the application of good practices is either lacking or sub-optimal (Rivas et al., 2000). Therefore, the gut microbial community is thought to be the most important source of carcass contamination by both non-pathogenic and pathogenic bacteria during the pigs meat processing in commercial conditions (Wheatley et al., 2014). The presence of these microorganisms can speed-up meat spoilage, a process that ultimately leads to products that are not suitable for human consumption, in turn leading to economic losses and food waste (Gram et al., 2002). This also impacts the microbial safety of pork meat products, raising concerns over associated foodborne diseases (Borch et al., 1996).

Salmonella is one of the most common foodborne pathogens, and contaminated pork meat products are a major source of human foodborne infections, especially in Europe and in the United States (US) (Martínez-Avilés et al., 2019). For example, in the United States, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimated that *Salmonella* caused 35% of the illnesses linked to pork meat (Self et al., 2017). In European countries, the prevalence of *Salmonella* on pig carcass surfaces ranged from 0.35% to 17.41% (Pala et al., 2019). The most effective interventions that are recognized to contribute to lowering the presence of *Salmonella* on pig carcasses at the slaughterhouse plant level are the rigorous application of good hygiene practices as well as the slaughter of *Salmonella*-free animals [Bonardi, 2017; Regulation (EC) No 2073/2005, 2005].

Indeed, *Salmonella* is often found within the pig intestinal microbiota without causing any clinical signs in the colonized animals.

The presence of foodborne pathogens on carcasses is routinely accompanied by spoilage microorganisms. Spoilage is defined as unfavorable changes of the organoleptic properties of the meat—such as off-flavors, texture, and poor taste (Casaburi et al., 2015)—rendering the meat unsuitable for human consumption. The initial number and type of microorganisms directly influence the time needed to reach a sufficient level to cause these changes (Gram et al., 2002; Wheatley et al., 2014). Psychrotrophic aerobes and facultative anaerobes such as members of the Enterobacteria, *Pseudomonas spp.*, and lactic acid bacteria (Pothakos et al., 2015) are examples of spoilage microorganisms that originate from the food processing environment and the intestinal microbiota of the animals (Wheatley et al., 2014).

The swine gut microbiota is dominated by Firmicutes, Bacteroidetes, and Proteobacteria at the phylum level (Wang et al., 2019). This gut microbiota plays important roles in the animal host metabolism, immune system development, and resistance to pathogens (Fouhse et al., 2016). Several factors can influence the composition of the gut microbiota: genetics, diet, age of the host, antibiotic treatments, and the presence of foodborne pathogens such as *Salmonella* (Hasan and Yang, 2019). The gut microbiota has also been shown to vary between pigs originating from different farms (Yang et al., 2018).

Until now, most studies conducted on carcass microbiological quality at slaughterhouses focused on the transmission of gut bacteria to the pig carcass surface using culture-dependent methods such as the counting of fecal indicator bacteria that indicate the microbial quality of the final meat product. Studies showed that these fecal indicators were not uniformly distributed on the pig carcass surface, that the level of contamination was higher on the bottom (neck) area, and that this contamination varied between carcasses (Wheatley et al., 2014; Biasino et al., 2018). However, results generated using these culture-based approaches allow for the study of a small fraction of the bacterial communities present. The introduction of high-throughput sequencing technologies has profoundly contributed to the advancement of knowledge in this field, permitting the simultaneous detection of hundreds of bacterial genera for which culturing is not

always suitable. A limited number of studies describing the microbiota of pig carcasses using high-throughput sequencing technologies have already revealed the usefulness of this approach and have shed new light on the diversity of the bacterial populations present on pig carcasses. For example, a study by Jakobsen et al. (2019) described the bacterial community transfer from pig tonsils to carcass surface and identified specific bacterial groups that were indicative of a bacterial transfer between these two anatomical regions. Another study by Peruzy et al. (2021) showed that various areas (ham, belly, back and jowl) of the surface of different pig carcasses were dominated by the same bacterial communities, though this microbiota varied between slaughterhouses.

To the best of our knowledge, no study has looked at the influence of the animal origin on the carcass surface microbiota following primary processing of pigs slaughtered in commercial conditions on the same day. Indeed, intestinal microbiota greatly varies between animals originating from different farms (Yang et al., 2018), and on-farm intestinal microbiota manipulation is being applied to increase animal health and lower the incidence of foodborne pathogens. It is therefore important to assess if the farm origin impacts carcass microbiota to gain insight into whether different on-farm interventions might also affect the microbiota of pork products. Therefore, the main objective of this study was to observe if pig carcass surface microbiota could be associated with the origin (batch) of animals. A comparison of carcass surface microbiota between samples of top and bottom areas from different batches was therefore carried out using both culture-dependent and high-throughput sequencing.

Materials and methods

Slaughterhouse

Carcass surface samples were collected at a pig slaughterhouse in Québec, Canada. Before slaughtering, pigs were kept in separate lairage pens for 3 h. The animals were rendered unconscious by carbon dioxide stunning. After bleeding, the carcasses were scalded for 7 min in hot water (temperature varied between 59.5°C and 64°C). Carcasses were then scraped, dehaired, and buckled before being pre-washed with clean water and inspected by a veterinarian.

Carcasses were then eviscerated and washed again before cooling (24 h). The processing time between stunning and the start of cooling was 32 min. The number of pigs slaughtered per hour was 649.

Sampling and sample preparation

A total of 26 pig carcasses from 6 different batches were sampled at the end of carcass dressing, just before the final wash that precedes cooling. All steps until this final wash are considered in this study as primary processing. Throughout the manuscript, the term batch refers to animals raised in the same infrastructure (farm) at the same geographical address, of the same age and slaughtered at the same time. Being raised under a same integrated company, pigs from each farm were similar in terms of genetics and productivity and had been fed a similar diet. Batches were numbered 1–6, though pigs sampled in this study were not slaughtered in this order. For each batch, 4 carcasses were sampled, except for the first 2 batches where 5 carcasses were sampled. All samples were collected on the same day over 5 consecutive hours of production. During primary processing, pigs were hung by the back feet. For each carcass, one sample was collected from the top (thighs/buttock) and one sample from the bottom (neck/chest/shoulder). A total of 26 top carcass surface areas and 26 bottom carcass surface areas were sampled. Sterile wipes were first humidified with 10 mL of sterile PBS (ThermoFisher scientific, Ottawa, Canada) prior to sampling and put in a sterile bag. For each sample, an approximate 600 cm² area was firmly swabbed 10 times horizontally and 10 times vertically. Between each area samples, handler's gloves were changed. Three negative controls (wipes exposed to the atmosphere of the slaughterhouse without touching any surfaces) and three external slaughterhouse controls (wipes humidified with 10 mL of sterile PBS and used to swab the floor of the slaughterhouse) were also included during sampling. All samples were kept on ice until processing at the laboratory. Wipes were homogenized in 50 mL of cold buffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris–HCl, 8.5 g NaCl pH 8), homogenized using a stomacher Smasher™ AESAP1064 (Biomérieux, United States) for 1 min and kept on ice. From this volume, 5 mL was immediately used for bacterial enumeration while 30 mL was centrifuged for 20 min at 2,800 g (Sorvall legend X1R centrifuge, ThermoFisher scientific, United States). The supernatant was discarded and the dry pellet stored at –80°C until DNA extraction.

Bacterial enumeration and confirmation

For each microbial indicator, 100 µl from each sample were directly plated using a spiral seeder (Spiral Interscience, ThermoFisher scientific, United States) on the appropriate culture medium (Table 1).

Presumptive *Pseudomonas* colonies were confirmed by a positive oxidase test (Gordon-McLeod Reagent, Sigma-Aldrich). In parallel, control strains of each microbial indicator such as *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Lactobacillus salivarius* ATCC 1174 were used to validate the method and culture conditions used.

Detection of *Salmonella*

The detection of *Salmonella* was based on a previous study conducted by our group (Larivière-Gauthier et al., 2019, ISO 6579-1:2017). Briefly, 1 mL of samples were pre-enriched in buffered peptone water (1:10 w:v, 24 h, 37°C). Three drops of 100 µL were selectively enriched on Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar (MSRV) (Biokar diagnostic, Beauvais, France) (48 h, 42°C). Two selective media—Brilliant Green Sulfa (BGS) (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, United States) and Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) (Biokar diagnostic)—were inoculated from the migration front of each positive MSRV and incubated for 24 h at 37°C. When possible, two typical colonies from each culture medium were confirmed using triple sugar iron agar slants (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, United States), urea agar slants, and seroagglutination with Salmonella O antiserum Poly A-I C Vi performed on colonies previously purified on blood agar (Statens Serum Institute, Denmark).

DNA extraction

Total DNA was extracted from the pellets and kept at –80°C using a mechanical and chemical lysis followed by phenol/chloroform purification. For each sample, 500 µL of lysis buffer [500 mM Tris–HCl pH 8, 2 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl, and 1% SDS (w/v)] containing 1 g of 0.1 mm glass beads was added to each sample. Cells were mechanically lysed using FastPrep-24™ (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, United States) for 40 s at 6 m/s and kept on ice. Lysates were centrifuged for 15 min at 18,000 × *g* (Compact Micro Centrifuges, VWR International, United States) to remove beads and cell debris. For each sample, 300 µL of supernatant was mixed by

inversion for 5 min with 300 µL of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). After centrifugation (18,000 × g, 5 min) (VWR International), the aqueous phase was kept and added to 500 µL of chloroform/isoamyl alcohol (24:1). After centrifugation (18,000 × g, 10 min), 350 µL of supernatant was added to 117 µL ammonium acetate (0.1 g/mL) and 934 µL of 90% ethanol. DNA was precipitated overnight at –20°C. After centrifugation (18,000 × g, for 15 min), 250 µL of 70% ethanol was added to the pellet, samples were centrifuged, and the supernatant was removed. The DNA pellet was air dried for 30 min and 40 µL of dissolution solution (1 mM Tris–HCl pH 8, 0.1 mM EDTA pH 8) was added. Purified DNA samples were stored at –80°C. After extraction, the final DNA concentration was measured using the Qubit 3.0 broad range assay (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) on a Denovix (Wilmington, DE, United States) fluorometer. The purity of DNA was assessed using a Nanodrop (ThermoFisher Scientific, United States). In addition, a negative control was included during DNA extraction (water instead of a carcass swab sample) to assess potential cross-contamination during the extraction step.

16S rRNA sequencing

A 291 pb fragment of the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using the V4-reverse 5'ACACTGACGAACTGGTTCTACAAGTGCAGCMGCCGCG GTAA 3' and V4-forward 5'TACGGTAGCAGAGACTTGG TCTGGACTACHUGGGTWTCTAAT 3' (Caporaso et al., 2012) primers. The PCR reaction mix (30 µL) contained 5X SuperfiBuffer, 5X SuperfiGCenhancer, 2 U/µL Platinum Superfi DNA Polymerase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 10 mM dNTPmix (Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada), 20 µM of primer (Invitrogen), 20 mg/mL BSA (ThermoFisher scientific, Ottawa, Canada), 12.5 ng of DNA, and sterile water to reach final volume. The amplification was carried out for 25 cycles and included a denaturation step at 95°C for 30 s, an annealing step at 55°C for 30 s, and an elongation step at 72°C for 60 s in a Mastercycler® Nexus (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). These cycles were preceded by an initial denaturation of 5 min at 95°C and followed by a final elongation of 10 min at 72°C. A positive control containing DNA from eight known bacterial DNA with different 16S rRNA gene abundance (theoretical composition based on 16S sequencing: 18.4% *Lactobacillus*, 17.4% *Bacillus*, 15.5% *Staphylococcus*, 14.1% *Listeria*, 10.4% *Salmonella*, 10.1% *Escherichia*, 9.9% *Enterococcus*, and 4.2% *Pseudomonas*) was included

(ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard, Zymo Research, Irvine, CA, United States). A PCR negative control (water instead of DNA) was included to assess potential cross-contamination during the PCR step. PCR amplification was confirmed by migration on a 1.5% agarose gel. Amplicons were sent for sequencing (Illumina MiSeq, PE 250) to McGill University and Genome Québec Innovation Center, Montréal, Canada.

Sequencing data processing and analysis

Raw sequence reads were cleaned and analyzed using Mothur (Schloss et al., 2009) version 1.43 following the MiSeq standard operational procedure¹ with some modifications, as described in Kozich et al. (2013). The Deblur algorithm was used to complete preclustering. Sequences were aligned against SILVA 132 reference database² Chimeras were removed using VSEARCH (Rognes et al., 2016). The resulting sequences were classified against the SILVA 132 reference database (formatted for Mothur). Sequences were clustered into Operational Taxonomic Units with a unique method, therefore Amplicon Sequence Variants (ASV) were used for analysis. Taxonomic assignment was performed with the Ribosomal Database Project (RDP) trainset 16 database³ Alpha diversity indexes (Observed ASV, Shannon and Inverse Simpson) were calculated using the R package “phyloseq” (McMurdie and Holmes, 2013) Beta diversity was analyzed using Jaccard and Bray-Curtis dissimilarity indexes, and the microbiota structure was visualized using non-metric multidimensional scaling (NMDS) graphs in RStudio (version 1.4.1103).

Statistical analysis

Total bacterial counts were converted into log₁₀ CFU/600 cm² values. Statistical analysis was performed using Rstudio (version 1.4.1103). A t-test was used for the comparison of the mesophilic aerobic bacteria mean count between the top and bottom areas of the sampled carcass surfaces. An ANOVA test was conducted for the comparison of mesophilic aerobic counts between the six different batches for samples recovered from both the top and bottom of the carcasses sampled. Graphs were generated with GraphPad Prism 8.0.2. Since counts for some indicator microorganisms were below the detection limit for most samples, the number of positive carcasses for Enterobacteria, Escherichia coli, and lactic bacteria between the different

batches was analyzed by Fisher exact test. Salmonella prevalence was also analyzed by Fisher exact test. A $p < 0.05$ value was considered statistically significant.

Statistical tests related to sequencing data were performed in Rstudio according to our in-house Standard Operating Procedure (SOP) (Larivière-Gauthier et al., 2017). Data were first normalized according to the number of total counts in each sample using the lowest number of sequences found in a carcass sample. Alpha and beta diversity analyses were performed. A t-test was used to compare the alpha diversity measures identified from the top and bottom of the sampled carcasses. An Kruskal–Wallis test was performed to compare the alpha diversity measures from all top and bottom surfaces between the six batches sampled.

PERMANOVA tests were conducted using the ADONIS function in the vegan package (Oksanen et al., 2018) for the analysis of the microbiota structure to compare top and bottom carcass surfaces and to assess differences for each type of samples according to batch. Species abundance was compared between groups using Multivariate Association with Linear Models 2 (MaAsLin2) (Mallick et al., 2021) to identify biomarkers associated with sample type (top or bottom) or batches at the phylum, family, and genus levels [using the tax_glom function in the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013)] after grouping of the 6 batches without rarefaction of the sequences. All analysis in MaAslin2 were performed using default options and an association was considered significant at a p-value < 0.05 and q-value < 0.25 .

Results

Enumeration of bacterial populations

The bacterial communities present on pig carcass surfaces were investigated for 26 carcasses from 6 different batches. Both the top (thighs/buttock) and bottom (neck/chest/shoulder) areas of the pig carcass were sampled. The mean mesophilic aerobic bacteria concentration for the top and bottom areas of the carcass, regardless of the batch was 4.6 log₁₀ CFU/600 cm² and 5.3 log₁₀ CFU/600 cm², respectively. When comparing these same mesophilic aerobic bacteria counts obtained from the sampling of the bottom area to those of the top part of the carcass for each batch separately, a significant difference between top and bottom areas was found for 5 out

of the 6 batches sampled ($p < 0.05$) (Figure 1) When conducting this comparison at the batch level, no statistically significant difference could be observed for the mesophilic aerobic bacteria counts for both the top and bottom carcass surface areas among the six batches sampled ($p > 0.05$).

Bacterial counts for Enterobacteria, *Escherichia coli*, lactic acid bacteria, and *Pseudomonas* are presented in Table 2. For all of these bacterial populations, the percentage of positive carcasses sampled recovered from the bottom area was significantly higher than the proportion of positive samples identified for the top area of the carcass ($p < 0.05$) (Table 2).

Sequence quality

The V4 region of the 16S rRNA gene was sequenced from sixty-one samples (26 bottom carcasses, 26 top carcasses, 2 negatives controls (extraction and PCR), 3 negative wipe controls, 3 external slaughterhouse controls, and 1 DNA community). After reads processing, a total of 1,449,466 sequences were retained and assigned to 27 phyla, 58 classes, 106 orders, 225 families, and 663 genera. The average number of sequences per sample was 79.421. The total number of ASV was 22,920. The mock community corresponding to the positive control was composed of 17.5% *Salmonella*, 15.9% *Escherichia/Shigella*, 14.6% *Bacillus*, 12.6% *Staphylococcus*, 12.3% *Lactobacillus*, 11.4% *Listeria*, 8.2% *Pseudomonas*, and 6.4% *Enterococcus*. The negative controls used for the DNA extraction and PCR steps contained 798 and 29,980 sequences respectively, and no band was visible on gel electrophoresis.

Carcass surface microbiota description of the top and bottom areas of pig carcasses

First, we compared the microbiota structure between the carcass samples (top or bottom areas), the mock community, the negative controls, and the external slaughterhouse controls to investigate dissimilarities between each sample type (Figure 2). Two samples (1 top sample and 1 bottom sample from different batches) were significantly different from the overall carcass samples collected and relatively close to the negative control samples (Figure 2). These two samples were therefore removed from the subsequent analysis.

The microbiota general composition at the phylum, family, and genus levels is illustrated on Figure 3. Overall, regardless of the batch, the major phyla, families, and genus were the same for samples recovered from both the top and bottom areas (Figures 3B, C). In total, 663 genera were assigned from all the sequences analyzed, but only 9 genus had a relative abundance greater than 5% (Figure 3C).

Multivariate association using linear models (MaAslin2) was performed in order to determine which microbial taxa were preferentially associated with the bottom or the top carcass surface, regardless of the batch. Indeed, any microbial taxa were associated with one of the six batches sampled. Samples recovered from the top carcass areas were positively associated with Proteobacteria. Firmicutes were positively associated with samples collected from the bottom area. At the family level, the microbiota of the top area of the carcass was significantly associated with *Bradyrhizobiaceae*, *Caulobacteraceae*, and *Planctomycetaceae*, while families of *Halomonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, and *Aerococcaceae* were found to be significantly associated with its bottom counterpart. At the genus level, *Phenylobacterium* and *Bradyrhizobium* were found to be significantly associated with the top area of the carcass. The presence of *Halomonas*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, and *Corynebacterium* was significantly associated with samples collected from the bottom area. All significant results ($p < 0.05$) are available in the Supplementary Table 1.

Microbiota diversity of the pig carcass surface

Alpha diversity analysis, which describes the bacterial richness and distribution within a sample, was used to compare the surface microbiota between the top and bottom areas of the pig carcasses sampled. Plots representing the alpha diversity measures obtained are shown in Figure 4. No significant differences were observed (t-test $p > 0.05$) between the 26 top surface microbiota and the 26 surface microbiota bottom areas samples.

The alpha diversity measures from all top or bottom areas were compared between the six batches sampled and no significant differences between batches could be observed (Kruskal–Wallis test $p > 0.05$) (Supplementary Figures 1, 2). These measures were also compared within each carcass of a same batch. Only the samples collected from the fourth batch sampled showed

Observed number of ASVs (sequences of bacteria) and Inverse Simpson indices significantly higher for the top area of the carcass surface when compared to their bottom counterpart (Supplementary Figure 2).

Using Bray-Curtis and Jaccard distance matrices, results showed that the structure and membership of the bacterial community was similar (PERMANOVA $p > 0.05$) between the top and bottom areas of the pig carcasses sampled (Figure 5A). This same observation was made for the comparison of the top or bottom areas among the different batches sampled (Figures 5B, C).

Discussion

In this study, the microbiota of 26 pig carcass surfaces were analyzed by culture-dependent methods and high-throughput sequencing in order to describe the carcass surface microbiota composition and to determine if an association could be observed between the carcass surface microbiota (top and bottom) and the animal's origin (batch).

Mesophilic total bacteria, usually regarded as an indicator of the hygiene conditions of the entire meat production process, showed counts that were similar to those reported in previous studies, with values ranging from 3 to 6.4 log CFU/cm² (Martínez et al., 2010; Bohaychuk et al., 2011; Piras et al., 2014). In our study, significant differences between counts for the top and bottom areas of the pig carcasses were identified on the same day of slaughter in the slaughterhouse, regardless of the batch. Similar findings were reported in the literature but the samples were collected over the course of several visits (Spescha et al., 2006; Biasino et al., 2018). The impact of animal batch has been reported for pathogenic bacteria like *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* (Gonzales-Barron et al., 2013; Vanantwerpen et al., 2015) but, to the best of our knowledge, this is the first report for mesophilic total bacteria.

Our results showed similar levels of Enterobacteria and *E. coli*—usually used to assess fecal contamination—to those reported by other studies, with mean levels of 2 log CFU/cm². In several other studies, the bottom parts of the carcasses were reported to be more contaminated than the top after evisceration (Spescha et al., 2006; Zweifel et al., 2008; Martínez et al., 2010; Wheatley et al., 2014; Zweifel et al., 2008).

Lactic acid bacteria and *Pseudomonas* are psychotropic bacteria responsible for meat spoilage (Salifou et al., 2013). A recent study that characterized the pig carcass surface microbiota according to different areas (Peruzy et al., 2021) observed levels of lactic acid bacteria similar to those observed in the present study, around 3.61 log CFU/cm². *Pseudomonas* was not detected in any of our samples and the probable growth of this psychrotrophic bacteria had perhaps not started before the cooling process. Indeed, in many studies, *Pseudomonas* spp. was mainly found on refrigerated pork products after cooling (EFSA Panel on Biological Hazards [BIOHAZ], 2016; Stellato et al., 2016).

In the present study, none of the carcasses sampled was contaminated by *Salmonella*, preventing us from making any association between the presence of the pathogen and the microbiota composition. Other studies are reporting different prevalence levels for *Salmonella* according to meat processing. For example, Piras et al. (2014) and Biasino et al. (2018) reported 64% and 18% of *Salmonella*-positive carcasses after evisceration and immediately after cooling respectively. The application of good slaughtering practices combined with the absence of *Salmonella* in the intestines of pigs slaughtered on the sampling day could explain this negative *Salmonella* status.

Microbiota analysis using high-throughput sequencing revealed similar bacterial communities between the top and bottom areas of the pig carcasses at the phylum level, while comparison at family and genus level showed significant differences in the relative abundance between these two areas. No information pertaining to the difference of phylum and family relative abundances between the top and bottom areas of pork carcasses seems to be available in the scientific literature. However, according to Peruzy et al. (2021), the bacterial community on four carcass areas (jowl, belly, back, ham) was dominated by the same bacterial genera that were also observed in the current study, i.e., *Escherichia* and *Rothia*. These similarities are not surprising as these genera reside in the oral and intestinal microbiota of pigs as well as in slaughterhouse environments.

In our study, *Terrisporobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Turicibacter*, *Clostridium sensu stricto*, and *Streptococcus* represented the most abundant bacterial populations found on carcass surfaces, representing more than 90% of the microbiota analyzed. It has been reported that these

bacterial populations were present in the gut microbiota of pigs (Quan et al., 2018). Indeed, according to this study by Quan et al. (2018), *Escherichia-Shigella* (23.1%), *Terrisporobacter* (17.9%), and *Clostridium sensu stricto* (12.9%) were most prevalent in the pig ileum, and *Streptococcus* (8.0%) was one of the most prevalent genera in the colon of this animal species. *Turicibacter* was most present in the jejunum and ileum (Crespo-Piazuelo et al., 2018). In our study, *Terrisporobacter*, *Streptococcus*, and *Turicibacter* were only found on the top area of the sampled carcasses. It is worth noting that carcasses were sampled before washing and cooling in the current study. This could probably explain why fecal contaminants were found on the top surface area since washing usually involves water running down from the top to the bottom part of the carcass, creating a higher risk for contamination in this area (Bolton et al., 2002). Furthermore, several families (*Bradyrhizobiaceae*, *Caulobacteraceae*, *Planctomycetaceae*, *Halomonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Aerococcaceae*) and genus (*Phenylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Halomonas*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Corynebacterium*) have been observed and each of them were statistically associated with the top or the bottom carcass surface microbiota. These bacterial populations were all previously reported as members of the pig gut microbiota (Fan et al., 2017; Zwirzitz et al., 2019). The description of bacteria isolated from specific carcass areas allowed for a better understanding of the dispersion of bacteria on the carcass surface as well as for the identification of contamination origin.

The *Flavobacterium* family which is responsible for the occurrence of rancid odors causing meat spoilage—which has been suggested to originate from worker gloves during evisceration—was also present on the surface of pig carcasses sampled in the current study (Doulgeraki et al., 2012; Zwirzitz et al., 2020; Wu et al., 2021).

It is well known that the major source of contamination of the carcass surface is evisceration (Biasino et al., 2018), but the removal of tonsils, tongue, and gallbladder are other important contaminating steps during primary processing (Jakobsen et al., 2019). In the current study, the analysis of the carcass surface microbiota revealed the presence of bacteria such as *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, and *Rothia*. *Acinetobacter* was naturally found in the tonsils of

pigs (Jakobsen et al., 2019) and was associated with meat spoilage (Iulietto et al., 2015). According to Bridier et al. (2019), *Acinetobacter* was also found in the slaughterhouse environment, especially at the dehairing step, and *Enhydrobacter* was present in the neck clipper environment. In another study, *Acinetobacter* and *Rothia* were observed to be the most dominant genera of the carcass surface microbiota (Peruzy et al., 2021; Wu et al., 2021) and were both common inhabitants of the oral microbiota of pigs.

Finally, in our study, the richness and the structure of carcass surface microbiota appeared similar between the top and bottom areas and between the six different batches sampled. According to the study by Peruzy et al. (2021), alpha diversity indices were not different between the ham (corresponding to the top area in our study) and the jowl (bottom area). Despite bacterial count results that show a difference of the mesophilic aerobic bacteria between the top and bottom areas of the pig carcasses sampled during the current study, the beta diversity also seemed to be comparable between batches. This indicates that the differences in the intestinal microbiota reported in the literature between animals originating from different farms were not replicated on the carcass, suggesting that the primary processing, until the end of carcass dressing, globally standardized the pig carcass surface in terms of microbial diversity. This is important for pig farming as the modulation of gut microbiota to improve feed efficiency is being explored at the farm level. Based on our observations however, even with optimal primary processing practices, it seems that these attempts of gut microbiota modifications may not have any profound effects on carcass microbiota. This is also important for the control of bacterial carcass surface contamination at slaughterhouse as sources of contamination other than intestinal contents, such as processing line, slaughterhouse equipment or worker hands also contributes to the surface microbiota.

The results presented are specific to this study, which was conducted in a single slaughterhouse, on the same day, and at a single sampling point. This limits our ability to draw conclusions regarding the effect of farm origin in a universal manner. Differences may appear later in the processing, which deserves further attention. For example, during and after the cooling period, psychrotrophic bacteria are recognized to grow (Zwirzitz et al., 2020) and more differences may

be observed beyond this point. The stability and impact of pig origin on final meat cuts should therefore also be investigated.

Tables

Tableau 1. – Culture conditions for the enumeration of mesophilic aerobic bacteria, Enterobacteria, *Escherichia coli*, lactic bacteria, and *Pseudomonas*.

Microorganisms	Culture media	Culture conditions	According to the procedure derived from :
Mesophilic aerobic bacteria	Trypticase Soy Agar (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, United States)	30°C, 48h	ISO 4833-2:2013
Enterobacteria	Violet Red Bile Glucose Agar (BD Difco)	37°C, 48h	ISO 21528-2:2017
<i>Escherichia coli</i>	MacConkey Agar (BD Difco)	37°C, 48h	(MAPAQ, 2019)
Lactic bacteria	Man, Rogosa, Sharpe medium (BD Difco)	37°C, 48h (GazpakAnaeroGen Thermo Scientific™ Oxoid R)	(, 2019)
<i>Pseudomonas</i>	Cephalosporin-Fucidine-Cetrimide (Biokar diagnostic)	25°C, 48h	ISO 13720:2010

Tableau 2. – Percentage of positive carcasses and mean bacterial concentrations for Enterobacteria *Escherichia coli*, lactic acid bacteria, *Pseudomonas*, and *Salmonella* for the top and bottom areas of the carcass surface samples analyzed.

	Positive samples (%)		Mean bacterial concentration (\log_{10} CFU/600cm ² \pm σ)	
	Top	Bottom	Top	Bottom
Enterobacteria	3.8 ^a	38.5 ^b	1.6 \pm 0.2	2.4 \pm 1.3
<i>Escherichia coli</i>	7.7 ^a	34.6 ^b	1.6 \pm 0.4	2.5 \pm 1.2
Lactic acid bacteria	58.0 ^a	96.1 ^b	3.4 \pm 1.5	3.5 \pm 0.3
<i>Pseudomonas</i>	0	0	< 2.7	< 2.7
<i>Salmonella</i>	0	0	< 2.7	< 2.7

Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$). For *Pseudomonas* and *Salmonella*, the mean bacterial concentrations (\log_{10} CFU/600 cm²) were below the detection threshold for the method used. σ : Standard deviation. A sample is considered positive if a bacterial count could be performed.

Figures

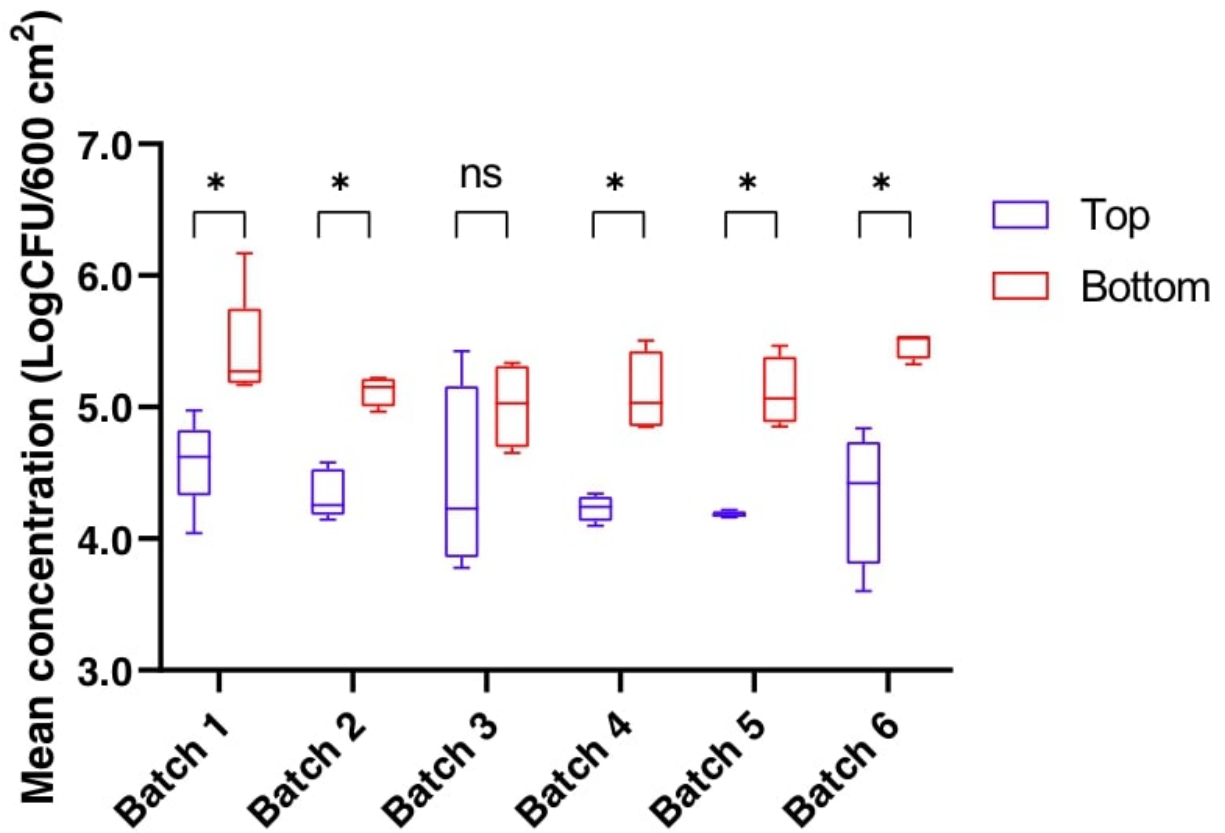


Figure 1. – Mean concentration (log CFU/600 cm²) for mesophilic aerobic bacteria counts for the top and the bottom areas of the pig carcass surface. *p < 0.05. ns, non-significant.

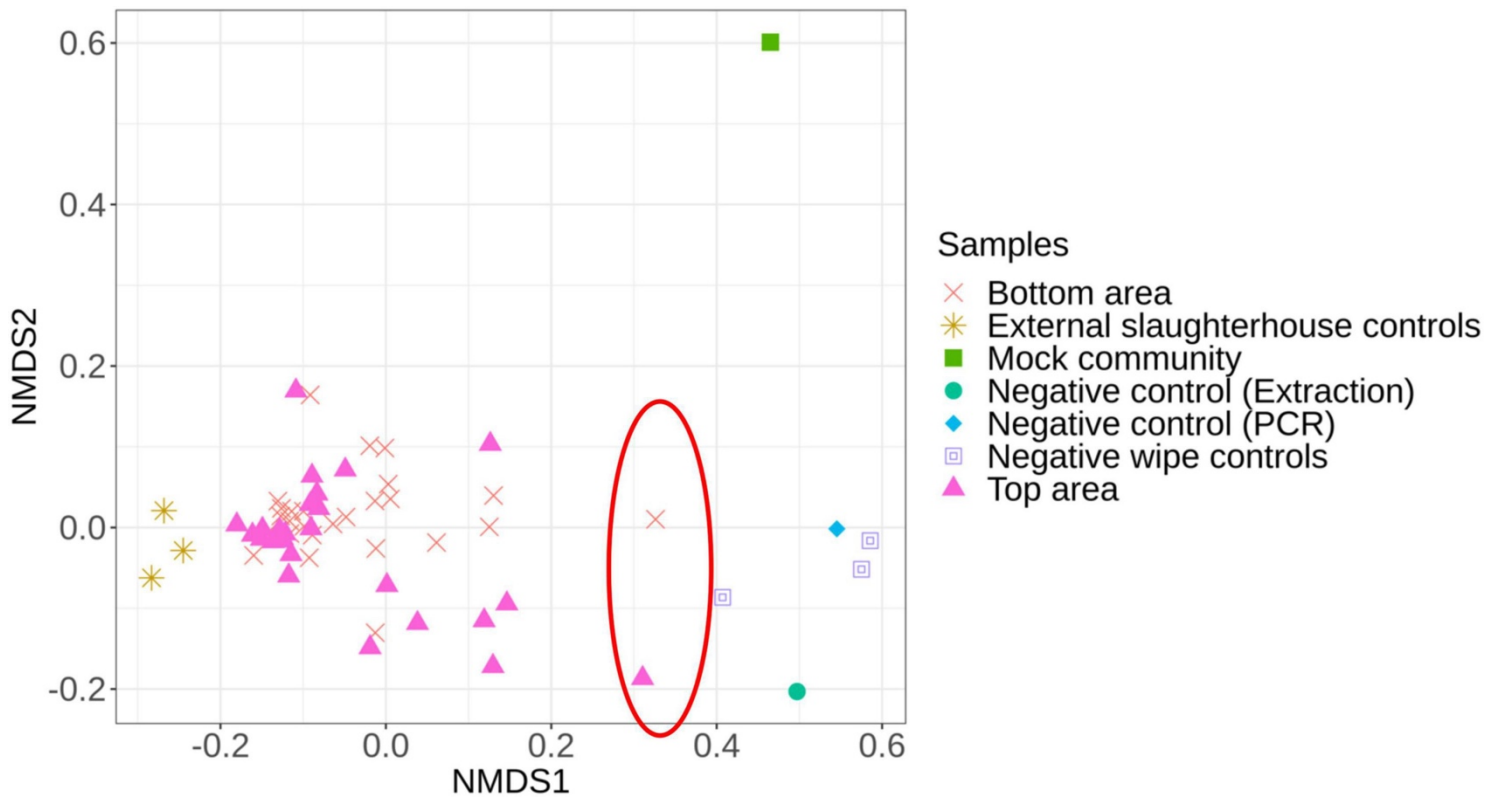


Figure 2. – Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure between all samples. The red circle identifies the samples removed from the analysis due to their proximity to the negative controls.

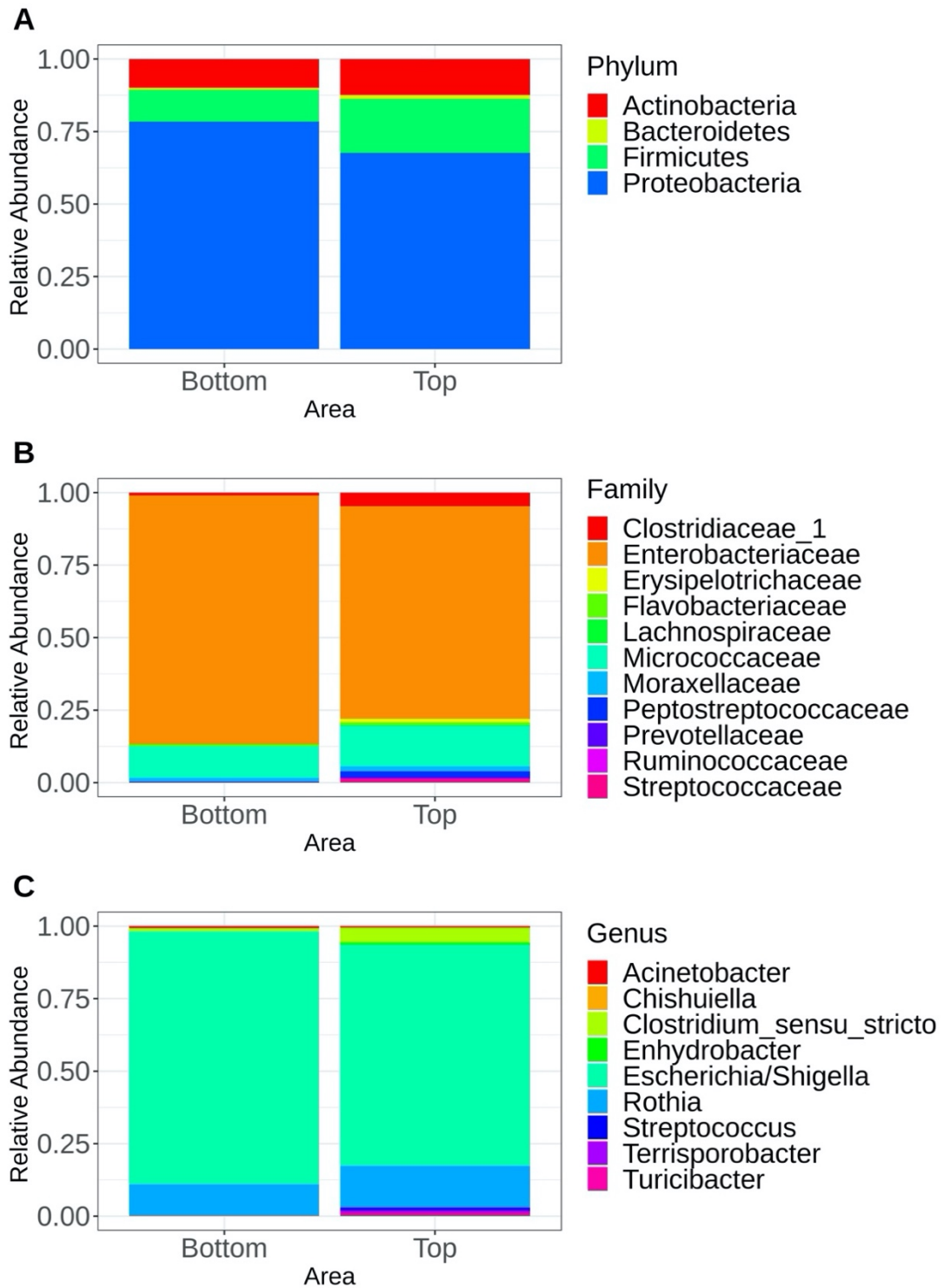


Figure 3. – Mean relative abundance of the major bacterial groups at the phylum level (A), family level (B), and genus level (C) identified in samples representing the top and bottom areas of the pig carcasses. Only bacterial communities representing at least 5% of carcass surface microbiota are shown.

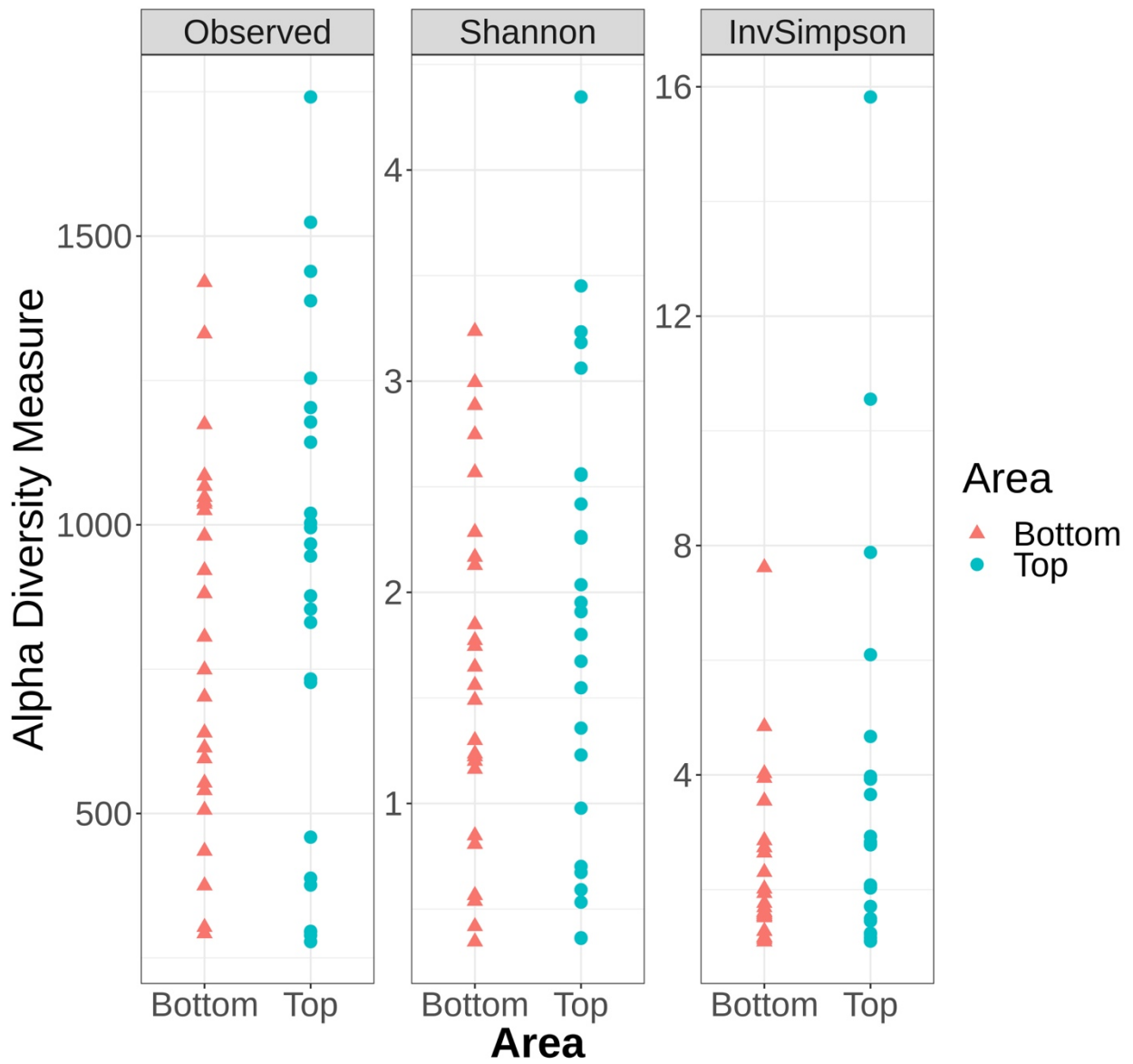


Figure 4. – Alpha diversity measures among the top and the bottom areas of the pig carcasses sampled using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices.

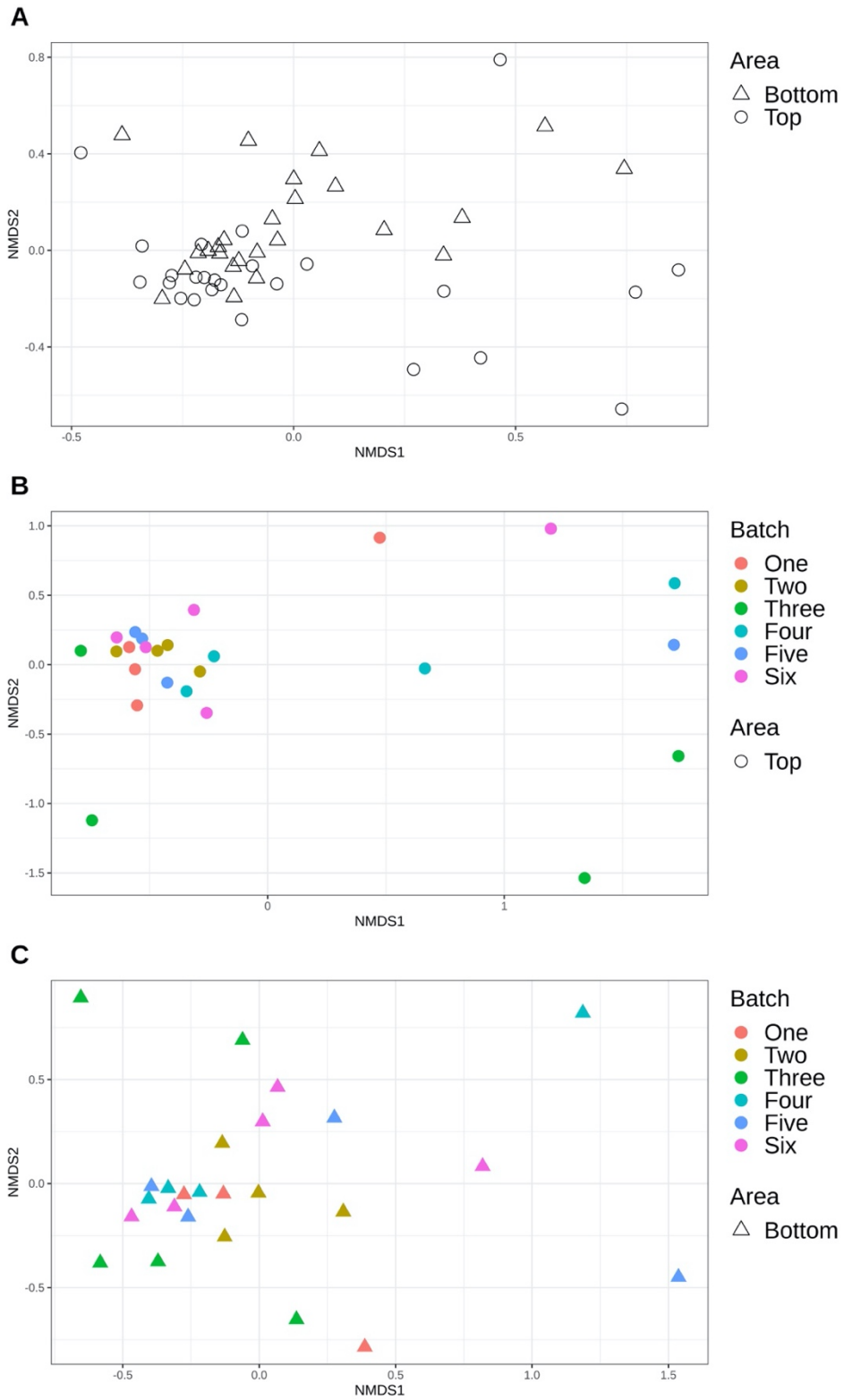


Figure 5. – Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiome structure of the pig carcass surface according to area (A), top area according to batch (B), and bottom area according to batch (C).

Supplementary material

Tableau 1. – (Supplementary) Complete list of significant associations between carcass area (top or bottom) and relative microbial abundance using Maaslin2.

Factor	Phylum	Family	Genus	Value	Coefficient	pval
Area	Proteobacteria	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Halomonas</i>	Bottom	8.91e-05	1.58e-08
Area	Proteobacteria	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Phenylobacterium</i>	Top	0.00075	2.36e-06
Area	Proteobacteria	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	Top	0.0010	1.16e-05
Area	Firmicutes	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	Bottom	0.00054	9.08e-06
Area	Firmicutes	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Bottom	0.00068	0.00015
Area	Actinobacteria	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	Bottom	0.001	0.00014
Area	Bacteroidetes	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Cloacibacterium</i>	Top	0.0003	0.0007
Area	Proteobacteria	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanella</i>	Bottom	3.21e-05	0.001
Area	Proteobacteria	<i>Labilitrichaceae</i>	<i>Labilitrix</i>	Top	4.89e-05	0.0015
Area	Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcaceae</i>	<i>Deinococcus</i>	Top	0.0011	0.0019
Area	Bacteroidetes	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Sediminibacterium</i>	Top	3.50e-05	0.0027
Area	Firmicutes	<i>Bacillales_Incertae_Sedis_XI</i>	<i>Gemella</i>	Bottom	0.0001	0.0033

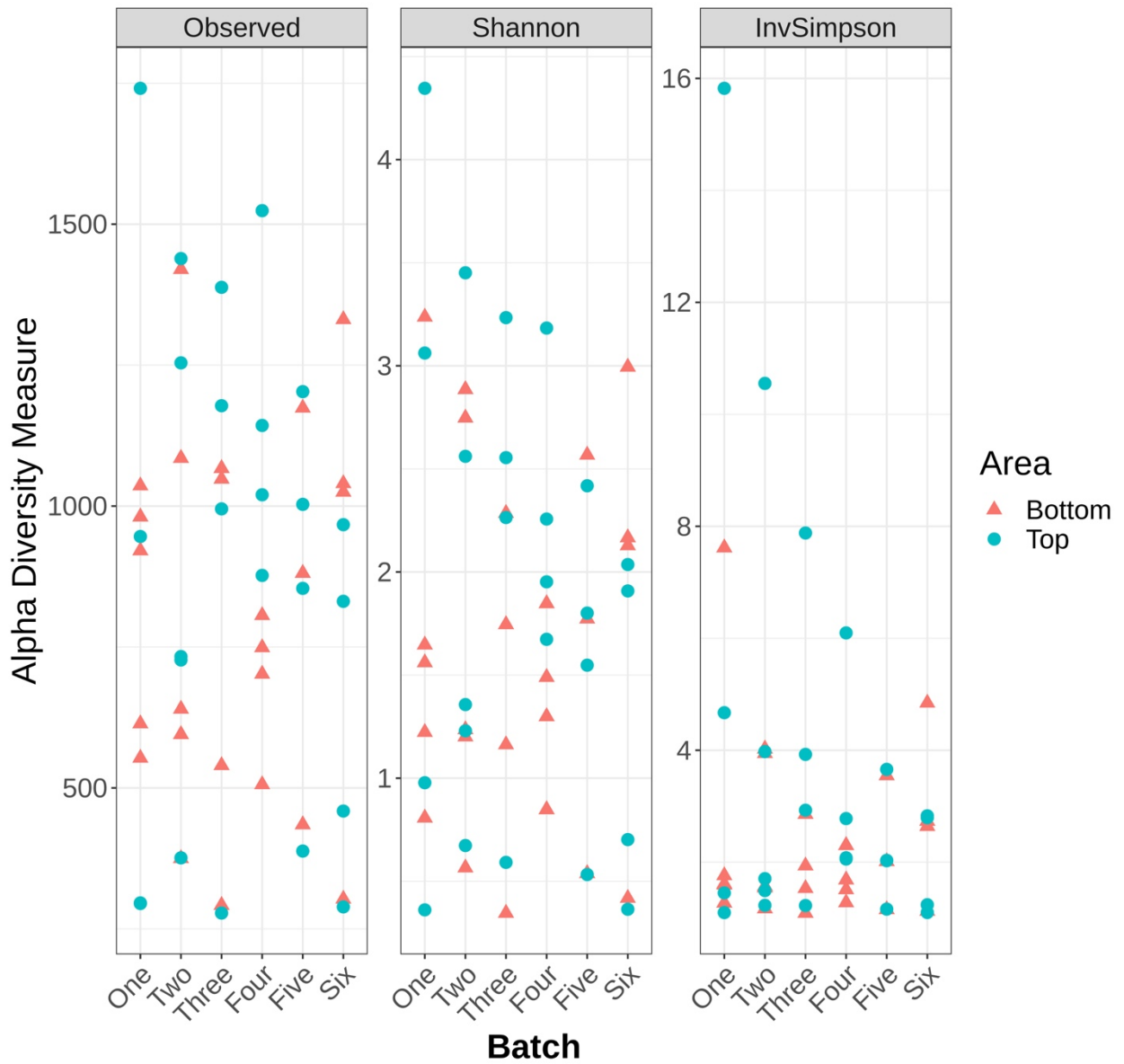


Figure 1. – (Supplementary) Alpha diversity analyses using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices between the top and the bottom areas of pigs from six different batches.

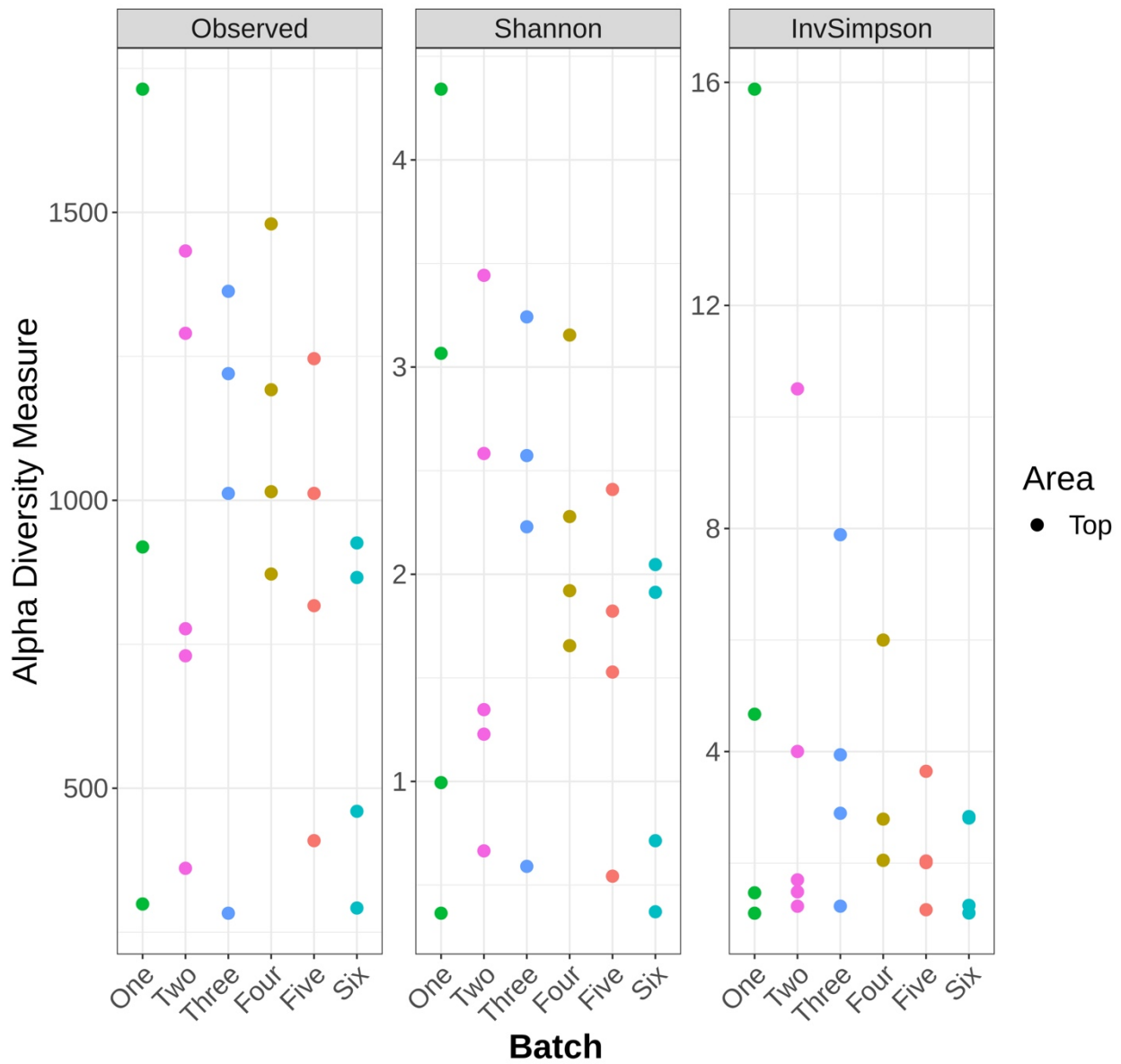


Figure 2. – (Supplementary) Alpha diversity analyses using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices between the six batches and the top carcass surface samples.

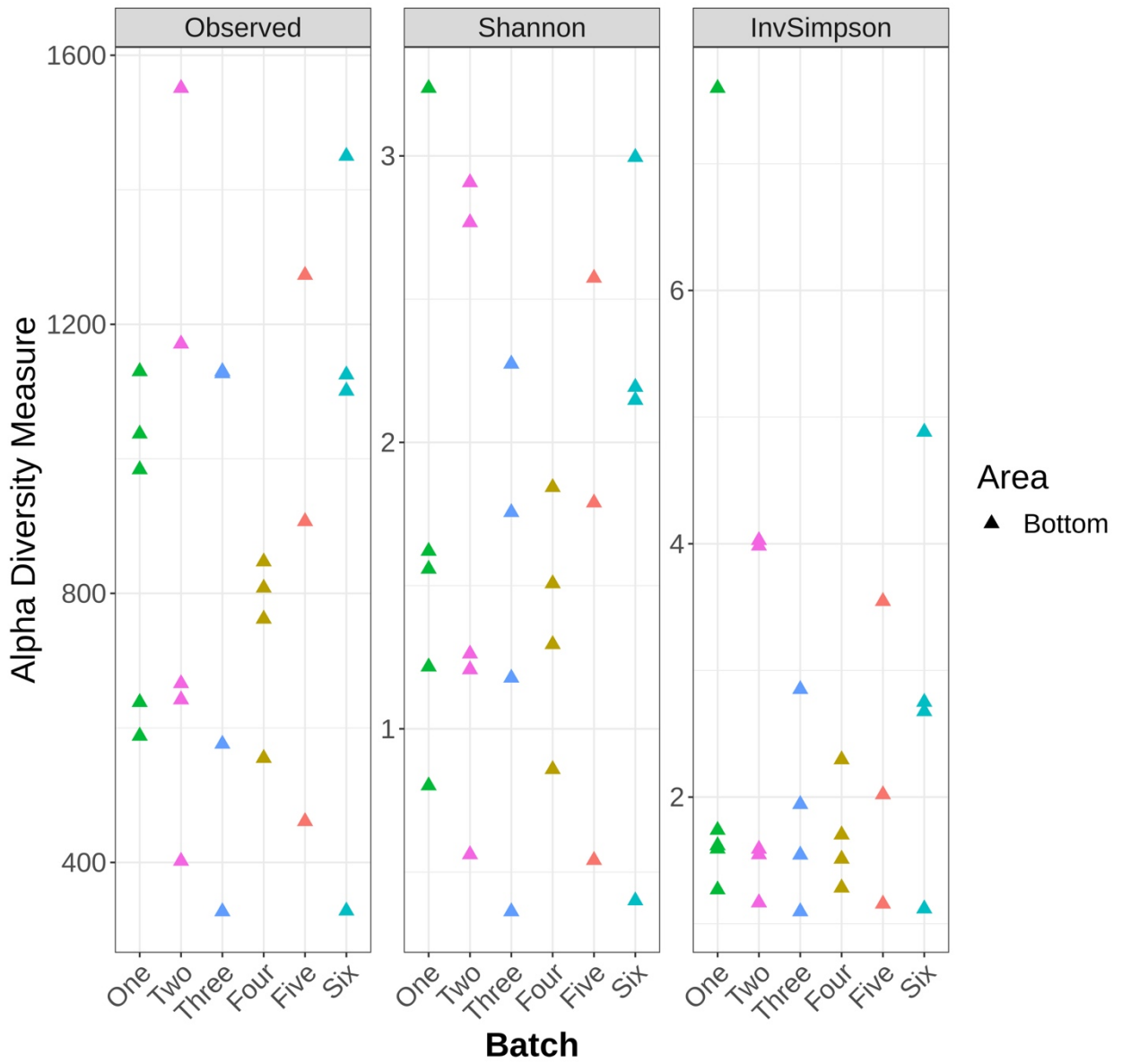


Figure 3. – (Supplementary) Alpha diversity analyses using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices between the six batches and the bottom carcass surface samples.

References

- Biasino, W., De Zutter, L., Mattheus, W., Bertrand, S., Uyttendaele, M., and Van Damme, I. (2018). Correlation between slaughter practices and the distribution of *Salmonella* and hygiene indicator bacteria on pig carcasses during slaughter. *Food Microbiol.* 70, 192–199. doi: 10.1016/j.fm.2017.10.003
- Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., and Barrios, P. R. (2011). Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *Can. Vet. J.* 52, 1095–1100.
- Bolton, D. J., Pearce, R. A., Sheridan, J. J., Blair, I. S., McDowell, D. A., and Harrington, D. (2002). Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *J. Appl. Microbiol.* 92, 893–902. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01599.x
- Bonardi, S. (2017). *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol. Infect.* 145, 1513–1526. doi: 10.1017/S095026881700036X
- Borch, E., Nesbakken, T., and Christensen, H. (1996). Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 9–25. doi: 10.1016/0168-1605(96)00988-9
- Bridier, A., Le Grandois, P., Moreau, M.-H., Prénom, C., Le Roux, A., Feurer, C., et al. (2019). Impact of cleaning and disinfection procedures on microbial ecology and *Salmonella* antimicrobial resistance in a pig slaughterhouse. *Sci. Rep.* 9:12947. doi: 10.1038/s41598-019-49464-8
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624. doi: 10.1038/ismej.2012.8
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., and Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiol.* 45, 83–102. doi: 10.1016/j.fm.2014.02.002
- Crespo-Piazuelo, D., Estellé, J., Revilla, M., Criado-Mesas, L., Ramayo-Caldas, Y., Óvilo, C., et al. (2018). Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions. *Sci. Rep.* 8:12727. doi: 10.1038/s41598-018-30932-6

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

EFSA Panel on Biological Hazards [BIOHAZ] (2016). Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. *EFSA J.* 14:4523. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4523

Fan, P., Liu, P., Song, P., Chen, X., and Ma, X. (2017). Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. *Sci. Rep.* 7:43412. doi: 10.1038/srep43412

Fouhse, J. M., Zijlstra, R. T., and Willing, B. P. (2016). The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Anim. Front.* 6, 30–36. doi: 10.2527/af.2016-0031

Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., Sheridan, J. J., and Butler, F. (2013). Modelling the effect of chilling on the occurrence of *Salmonella* on pig carcasses at study, abattoir and batch levels by meta-analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 101–113. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.006

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., and Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 79–97. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00233-7

Hasan, N., and Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ* 7:e7502. doi: 10.7717/peerj.7502

Iulietto, M. F., Sechi, P., Borgogni, E., and Cenci-Goga, B. T. (2015). Meat spoilage: a critical review of a neglected alteration due to rosy slime producing bacteria. *Ital. J. Anim. Sci.* 14:4011. doi: 10.4081/ijas.2015.4011

Jakobsen, A. M., Bahl, M. I., Buschhardt, T., Hansen, T. B., Al-Soud, W. A., Brejnrod, A. D., et al. (2019). Bacterial community analysis for investigating bacterial transfer from tonsils to the pig carcass. *Int. J. Food Microbiol.* 295, 8–18. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.003

Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., and Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13

Larivière-Gauthier, G., Thibodeau, A., and Fravallo, P. (2017). Reduction of *Salmonella* shedding by sows during gestation in relation to its fecal microbiome. *Front. Microbiol.* 8:2219. doi: 10.3389/fmicb.2017.02219

Larivière-Gauthier, G., Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É, and Fravallo, P. (2019). *Salmonella* shedding status of the sow affects the microbiota of their piglets at weaning. *J. Appl. Microbiol.* 126, 411–423. doi: 10.1111/jam.14139

Mallick, H., Rahnavard, A., McIver, L. J., Ma, S., Zhang, Y., Nguyen, L. H., et al. (2021). Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. *bioRxiv* [Preprint]. doi: 10.1101/2021.01.20.427420

MAPAQ (2019). Plan de Surveillance des Contaminants dans les Produits Alimentaires Vendus Au Québec Bilan 2011-2016.

Martínez, B., Celda, M. F., Anastasio, B., García, I., and López-Mendoza, M. C. (2010). Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing with three types of sponge or gauze. *J. Food Prot.* 73, 81–87. doi: 10.4315/0362-028X-73.1.81

Martínez-Avilés, M., Garrido-Esteba, M., Álvarez, J., and de la Torre, A. (2019). *Salmonella* surveillance systems in swine and humans in Spain: a review. *Vet. Sci.* 6:20. doi: 10.3390/vetsci6010020

McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217

Oksanen, J., Guillaume, Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., et al. (2018). *Vegan: Community Ecology Package. R Package.*

Pala, C., Tedde, T., Salza, S., Uda, M. T., Lollai, S., Carboni, V., et al. (2019). Epidemiological survey on the prevalence of *Salmonella* spp. in the Sardinian pig production chain, using real-time PCR screening method. *Ital. J. Food Saf.* 8:7843. doi: 10.4081/ijfs.2019.7843

Peruzy, M. F., Houf, K., Joossens, M., Yu, Z., Proroga, Y. T. R., and Murru, N. (2021). Evaluation of microbial contamination of different pork carcass areas through culture-dependent and independent methods in small-scale slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* 336:108902. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108902

Piras, F., Fois, F., Mazza, R., Putzolu, M., Delogu, M. L., Lochi, P. G., et al. (2014). *Salmonella* prevalence and microbiological contamination of pig carcasses and slaughterhouse environment. *Ital. J. Food Saf.* 3:4581. doi: 10.4081/ijfs.2014.4581

Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., and Ercolini, D. (2015). Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Sci.* 109, 66–74. doi: 10.1016/j.meatsci.2015.04.014

Quan, J., Cai, G., Ye, J., Yang, M., Ding, R., Wang, X., et al. (2018). A global comparison of the microbiome compositions of three gut locations in commercial pigs with extreme feed conversion ratios. *Sci. Rep.* 8:4536. doi: 10.1038/s41598-018-22692-0

Ritchie, H., and Roser, M. (2017). *Meat and Dairy Production*. *OurWorldInData.org*. Available online at: <https://ourworldindata.org/meat-production>

Rivas, T., Vizcaíno, J. A., and Herrera, F. J. (2000). Microbial contamination of carcasses and equipment from an Iberian pig Slaughterhouse. *J. Food Prot.* 63, 1670–1675. doi: 10.4315/0362-028X-63.12.1670

Regulation (EC) No 2073/2005 (2005). *Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs (Text with EEA Relevance)*. Off. J. Eur. Union.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584

Salifou, C., Boko, K., Ahounou, G., Tougan, P., Kassa, S., Houaga, I., et al. (2013). Diversité de la microflore initiale de la viande et sécurité sanitaire des consommateurs. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7, 1351–1369. doi: 10.4314/ijbcs.v7i3.41

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09

Self, J. L., Luna-Gierke, R. E., Fothergill, A., Holt, K. G., and Vieira, A. R. (2017). Outbreaks attributed to pork in the United States, 1998–2015. *Epidemiol. Infect.* 145, 2980–2990. doi: 10.1017/S0950268817002114

- Spescha, C., Stephan, R., and Zweifel, C. (2006). Microbiological contamination of pig carcasses at different stages of slaughter in two European Union–approved abattoirs. *J. Food Prot.* 69, 2568–2575. doi: 10.4315/0362-028X-69.11.2568
- Stellato, G., La Stora, A., De Filippis, F., Borriello, G., Villani, F., and Ercolini, D. (2016). Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4045–4054. doi: 10.1128/AEM.00793-16
- Vanantwerpen, G., Berkvens, D., Van Damme, I., De Zutter, L., and Houf, K. (2015). Assessment of risk factors for a high within-batch prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs based on microbiological analysis at slaughter. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 571–575. doi: 10.1089/fpd.2014.1897
- Wang, X., Tsai, T., Deng, F., Wei, X., Chai, J., Knapp, J., et al. (2019). Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome* 7:109. doi: 10.1186/s40168-019-0721-7
- Wheatley, P., Giotis, E. S., and McKeivitt, A. I. (2014). Effects of slaughtering operations on carcass contamination in an Irish pork production plant. *Ir. Vet. J.* 67:1. doi: 10.1186/2046-0481-67-1
- Wu, J., Li, R., Zhang, M., Shan, K., Jia, X., Zhao, D., et al. (2021). Microbiota changes on the surface of pig carcasses during refrigerated transportation and marketing. *Food Mater. Res.* 1:4. doi: 10.48130/FMR-2021-0004
- Yang, H., Xiao, Y., Wang, J., Xiang, Y., Gong, Y., Wen, X., et al. (2018). Core gut microbiota in Jinhua pigs and its correlation with strain, farm and weaning age. *J. Microbiol.* 56, 346–355. doi: 10.1007/s12275-018-7486-8
- Zweifel, C., Fischer, R., and Stephan, R. (2008). Microbiological contamination of pig and cattle carcasses in different small-scale Swiss abattoirs. *Meat Sci.* 78, 225–231. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.06.025
- Zwirzitz, B., Pinior, B., Metzler-Zebeli, B., Handler, M., Gense, K., Knecht, C., et al. (2019). Microbiota of the gut-lymph node axis: depletion of mucosa-associated segmented filamentous bacteria and enrichment of *Methanobrevibacter* by colistin sulfate and Linco-Spectin in pigs. *Front. Microbiol.* 10:599. doi: 10.3389/fmicb.2019.00599

Zwirzitz, B., Wetzels, S. U., Dixon, E. D., Stessl, B., Zaiser, A., Rabanser, I., et al. (2020). The sources and transmission routes of microbial populations throughout a meat processing facility. *NPJ Biofilms Microbiomes* 6:26. doi: 10.1038/s41522-020-0136-z

Chapitre 5 – Carcass surface microbiota analysis for investigating the evolution of bacterial communities during pig processing

Charlotte Braley^{1,2*}, Philippe Fravallo^{3,4}, Marie-Lou Gaucher^{1,2,3,5}, Fanie Shedleur-Bourguignon^{1,2}, Jessie Longpré⁶, Alexandre Thibodeau^{1,2,3,5}

¹Chaire de Recherche en Salubrité des Viandes (CRSV), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

²Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

³Groupe de Recherche et d'Enseignement en Salubrité Alimentaire (GRESA), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

⁴Le Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM), USC Metabiot, Ploufragan, France

⁵Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole (CRIPA), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

⁶F. Ménard, Division d'Olymel s.e.c., Ange-Gardien, QC, Canada

* Correspondence : braley.braley@umontreal.ca (C.B.); alexandre.thibodeau@umontreal.ca (A.T.)

Cet article est en préparation.

Author Contributions :

CB: methodology, software, visualization, writing—original draft, and writing—review and editing. PF: conceptualization, supervision, writing—review and editing, and funding acquisition.

M-LG: writing—reviewing and editing the manuscript. GL-G: resources, software, and writing—review and editing. FS-B: resources, software, and writing—review and editing. JL: resources,

project administration, and writing—review and editing. AT: conceptualization, methodology, validation, supervision, project administration, resources, and writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Abstract

The surveillance and control of microbial contamination during pig processing is typically performed by culturing traditional indicator microorganisms such as aerobic total bacteria or enterobacteria. Since culture-dependent methods do not reflect bacterial diversity, a culture-independent method was used in this study to investigate the surface microbiota of pig carcasses before and after cooling in a slaughterhouse in Canada (province of Québec). The surface microbiota of 64 pig carcasses sampled from 64 batches before and after cooling was characterized over a four-week period. The sampled microbiota from the top and bottom carcass surface areas were analyzed by 16S rRNA amplicon sequencing combined with traditional enumerations of bacterial indicators and a *Salmonella* spp. detection protocol. *Salmonella* spp. was detected on 11 pig carcass areas and no significant difference was observed between areas studied. For samples collected before cooling, results revealed higher levels of bacterial counts on bottom areas, while sequencing showed a higher bacterial diversity on top areas. During this conventional primary processing, bacterial richness – i.e. number of bacteria – appears similar on the top and bottom areas between visits, with some variation depending on work shift (start or end of slaughtering day). Ultimately, pig carcass surface microbiota composition and diversity evolved over time and were different according to the visits and between shifts. Cooling did not allow for a considerable reduction in bacterial counts on bottom areas but was associated with a decrease in the diversity of the microbiota on both the top and bottom areas.

Keywords : Pig carcass, Classical microbiology, High-throughput sequencing, Carcass microbiota, Bacterial diversity, Cooling

Introduction

Pork is one of the most widely consumed meats in the world. In 2022, the global pig meat production reached approximately 110,500 million tons, compared to 132,500 million tons for poultry and 70,500 million tons for beef [1]. As the consumption of pork meat increases [1], the production of high-quality meat and the control of its contamination by bacteria remain a major challenge for processors. Pork meat products can be contaminated by both pathogenic and spoilage bacteria that are responsible for human foodborne diseases and food product waste, respectively [2–4]. Previous studies have provided evidence that the skin of slaughtered animals, their intestinal tract, the equipment used, and slaughterhouse environment (including contact surfaces and slaughterhouse workers) can all act as sources of contamination during carcass processing [5–7]. The application of good production and hygiene practices is critical to reducing the risk of carcass surface contamination [8]. Therefore, a complete understanding of microbial composition and the evolution of pig carcass microbiota is required to optimize the control bacterial contamination.

It has been demonstrated that processing, and more specifically the evisceration step, plays an important role in the contamination of carcass surfaces by some pathogenic bacteria such as *Salmonella* [8]. *Salmonella* is a major zoonotic pathogen that causes foodborne infections in humans through the consumption of contaminated pork meat [9]. Pigs are generally healthy carriers of *Salmonella* or will become carriers after transport and/or during the lairage. Pesciaroli et al. [10] documented a positive correlation between high *Salmonella* cecal loads and carcass contamination in pigs. A recent study also showed that the contamination of pig carcasses by *Salmonella* was higher during the initial stages of primary processing, especially after scalding, and that this contamination significantly decreased as carcasses moved through the process [11]. Along this process, cross-contamination can also occur between carcasses due to direct contact with contaminated surfaces, equipment, and utensils [8,12]. The rate of *Salmonella* detection on pig carcasses at the slaughterplant level ranges from 0.29% to 64% depending on several factors, as slaughter process and hygiene practices and are country specific [6,8,13–18]. In North America, “Performance Standards for *Salmonella*”, which is based on microbial guidelines published by the

USDA, provide processors with microbiological standards for carcass contamination [19], including allowing a maximum of 6 *Salmonella*-positive carcass swab samples after cooling out of a set of 55 samples.

It has been demonstrated that pig carcasses can be easily contaminated with spoilage bacteria during processing [3]. Bacteria responsible for spoilage have a significant impact on the pork meat sector, as spoilage bacteria reduce meat shelf life and cause significant economic losses [3,4,20]. Indeed, in Canada, the total annual loss due to meat spoilage is estimated to be 1.28 million metric tons [21]. Growth and metabolic activity of spoilage bacteria are at the root of color, odor, texture, and taste defects appearing with storage time; these changes are related to the number and type of spoilage bacteria colonizing the surface of the products [3,4,22]. The initial level of carcass and meat contamination by spoilage bacteria is mainly assessed by the enumeration of bacterial indicators such as mesophilic total bacteria – which is used as an indicator of the hygiene conditions of the entire meat production process – and enterobacteria like *E. coli* – which are used as an indicator of possible fecal contamination [23,24]. In Canadian slaughterhouses, guidelines from the Food Safety Inspection Services [19,25] on the acceptable levels of total bacteria on a given pig carcass are followed, and processors can choose to enumerate one or more of the possible bacterial indicators.

Various studies described bacterial carcass contamination by spoilage bacteria at different steps of processing on several areas of pig carcasses using classical culture-based techniques [5,6,13,17,26–32]. Globally, it is well known that total aerobic bacteria counts as well as enterobacteria levels decrease after scalding and singeing, and that this contamination increases at dehairing, polishing, and evisceration. During and after cooling, low air temperature and drying reduce and even inhibit the growth of certain bacteria, such as total aerobic bacteria and enterobacteria populations. However, psychrotrophic aerobic bacteria such as *Pseudomonas* spp. constitute a permanent threat for pig carcass contamination [23]. Generally, during processing, the neck area presents a higher level of contamination for these indicator bacteria [13,26].

The major limitation of these studies is that they only documented the presence and levels of culturable bacteria or groups of indicators, overlooking the presence and role of bacterial genera or families that cannot be studied using these classical approaches. The application of molecular techniques, like PCR, have allowed for the identification of spoilage bacteria at the genus level such as *Brochothrix* spp., *Carnobacterium* spp., *Leuconoscoc* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Psychrobacter* spp., and lactic acid bacteria (LAB) spp [3,4,23,33]. However, PCR identification requires the isolation of bacteria and is therefore time and resource consuming. One way to circumvent these limitations is to rely on high throughput sequencing [34].

As of today, a limited number of studies have described the extended microbiota diversity and the modifications on pig carcasses at the slaughterhouse level using high-throughput sequencing technologies, with 16S rDNA amplicon sequencing being the most often reported [7,30–32,35]. This technique has revealed that the bacterial composition of pig carcasses mainly included *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Escherichia*, and *Chryseobacterium*. In one study, the authors showed that the bacterial communities from 8 carcasses slaughtered on the same day and sampled just after evisceration and before cooling were similar on the ham, back, jowl, and belly areas, but different between two slaughterhouses [30]. At the same step, before cooling, another study showed that the microbiota of pig carcasses sampled from the top and bottom areas appeared similar between 6 batches of pigs slaughtered on the same day in a single slaughterhouse [32]. Another study described that the same main genera were detected on the shoulder and ham of 12 carcasses after evisceration and were also present after 24 hours of cooling [31]. Most of these studies focused on the description of the pig carcass microbiota on the same day. Using a culture approach, only one study demonstrated that pig carcasses from the last batches slaughtered on Friday showed higher enterobacteria counts than the first batches slaughtered on the previous Monday, suggesting a temporal variation of carcass surface level contamination [11]. Therefore, there is a lack of available information on how globally the bacterial composition and diversity of pig carcass surfaces changes in time in a processing plant using high throughput sequencing methods.

The aims of the present study were to i) in a single slaughterhouse, describe and compare the microbiota of different pig carcass samples collected from the top and bottom areas; ii) describe the variation of the pig carcass microbiota composition and structure between samples collected during 16 visits performed over a four-week period and between samples collected during morning and afternoon shifts; and iii) study the impact of cooling on the pig carcass microbiota. To do so, an enumeration of traditional indicator microorganisms and a *Salmonella* detection protocol were combined with 16S rDNA amplicon sequencing.

Materials and Methods

Slaughterhouse operations and sampling

Carcass surface samples were collected in a pig slaughterhouse in Québec, Canada. In this slaughterhouse, 650 pigs were slaughtered per hour. After carbon dioxide stunning and bleeding, carcasses hanging by the back feet were scalded, scraped, dehaired, pre-washed, dressed including evisceration, inspected, and washed again before being cooled down for 24 hours at 0°C. In this study, a batch refers to a group of pigs that were both raised on the same farm and slaughtered on the same day. Sampling was conducted during 16 visits performed over a period of 4 weeks (Figure 1). During each week, four visits were conducted on four different days (Monday: #1; Tuesday: #2; Wednesday: #3; Thursday: #4). During each visit, 4 or 5 batches, depending on operation constraints, were sampled (Figure 1).

A total of 64 batches were sampled just before the final wash that preceded cooling (Figure 1). From these 64 batches, 32 batches were sampled during the morning shift and the remaining 32 were sampled during the afternoon shift (Figure 1). Finally, 16 batches from these 64 were re-sampled on the next day immediately after the cooling stage (Figure 1).

For each batch, six carcasses were randomly sampled. Three carcasses were sampled before the wash that precedes cooling, with one surface sample collected from the top left side and one surface sample from the bottom right side, as presented in Figure 2A. The alternate surface sides

were sampled for the remaining three carcasses (Figure 2B). After cooling, 16 batches were re-sampled the next day: 8 batches from the morning shift and 8 batches from the afternoon shift (Figure 1). For each batch, the sampling strategy used for both halves of each carcass collected before and after cooling is presented in Figure 2A and 2B. A total of 960 pig carcass surfaces were sampled (n= 80 batches (64 batches before cooling + 16 batches after cooling) x 6 carcasses (one batch = 6 carcasses) x 2 (one surface sample collected from the top and one surface sample collected from the bottom for each carcass)).

Sterile wipes were humidified with 10 mL of sterile Phosphate-buffered saline (PBS) (ThermoFisher scientific, Ottawa, Canada). The sampled area was firmly swabbed 10 times horizontally and 10 times vertically in order to sample approximately 600 cm² of surface area and put in a sterile bag. Between each sample, the handler's gloves were changed. During each visit, negative and an external experimental controls were included. The negative experimental control consisted of a humidified wipe with 10 mL of sterile PBS was exposed to the ambient air of the slaughterhouse for a few minutes without touching any surface. For the external experimental control, a wipe humidified with 10 mL of sterile PBS was used to swab the floor of the slaughterhouse. All samples were kept on ice until processing at the laboratory within 2 hours.

Sample preparation

Each wipe from samples collected from the top and bottom areas of one batch were homogenized in 50 mL of cold buffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 8.5 g NaCl pH 8) using a stomacher Smasher™ AESAP1064 (Biomérieux, United States) for 1 min, before being kept on ice. For samples collected from the top areas of one batch, as well as for samples collected from the bottom areas of one batch, 10 mL of each sample was pooled, for a total of 60 mL (6 wipe x 10 mL). From this volume, 5 mL were immediately used for bacterial enumeration and *Salmonella* detection, while 30 mL were centrifuged for 20 min at 2,800 x g (Sorvall legend X1R centrifuge, ThermoFisher scientific, United States). The supernatant was discarded and the dry pellet was stored at -80°C, until DNA extractions were performed.

Bacterial enumeration and confirmation

The enumerations of mesophilic aerobic bacteria, enterobacteria, *Escherichia coli*, lactic acid bacteria, and *Pseudomonas* were realized as previously described [32] and performed from the pool of the six wipes from samples collected from the top and bottom areas of one batch, respectively. Mesophilic aerobic bacteria were enumerated on trypticase soy agar (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, United States) after incubation at 30°C for 48h. Enterobacteria and *E. coli* were enumerated on Violet Red Bile Glucose Agar and MacConkey, respectively, after incubation at 37°C for 48h (BD Difco). Lactic acid bacteria were enumerated on Man Rogosa Sharpe medium (BD Difco) under anaerobic conditions (GazpakAnaeroGen, Thermo Scientific™ Oxoid R) after incubation at 25°C for 48h. Enumeration of *Pseudomonas* was performed on Cephalosporin-Fucidine-Cetrimide (Biokar diagnostic) after incubation at 25°C for 48h, and typical colonies were confirmed by a positive oxidase test (Gordon-McLeod Reagent, Sigma-Aldrich). Culture conditions were validated using control strains : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Lactobacillus salivarius* ATCC 1174.

Detection of *Salmonella* spp.

As previously described [32], detection of *Salmonella* spp. was performed on a pool of the six wipes from samples collected from the top and bottom areas of one batch, respectively. Briefly, 1 mL of sample was pre-enriched in buffered peptone water (1:10 w:v, 24 h, 37°C) and selectively enriched on Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar (MSRV) (Biokar diagnostic, Beauvais, France) (48 h, 42°C). Brilliant Green Sulfa (BGS) (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, United States) and Xylose-Lysine-Deoxycholate (XLD) (Biokar diagnostic) – two selective media – were inoculated with positive MSRV and incubated for 24 h at 37°C. When growth was observed, one colony per positive culture medium was confirmed as *Salmonella* using triple sugar iron and urea agar slants (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, United States) and using seroagglutination with *Salmonella* O antiserum Poly A-I C Vi (Statens Serum Institute, Denmark). Isolates were sent for serotyping to the Laboratoire de Santé Animale, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

DNA extraction and 16S rRNA sequencing

DNA extraction and 16S rRNA sequencing were performed as previously described [32]. The DNA extraction was performed using mechanical and chemical lysis, followed by a phenol/chloroform purification. Each pellet was resuspended in 500 μL of lysis buffer [500 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl, 1% SDS (w/v)] and 1 g of 0.1 mm glass beads. Cells were mechanically lysed using a FastPrep-24™ (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, United States) for 40 s at 6 m/s. After centrifugation (18,000 \times g, 5 min) (Compact Micro Centrifuges, VWR International, United States), 300 μL of supernatant was mixed by inversion for 5 min with 300 μL of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). Samples were centrifuged (18,000 \times g, 5 min) (VWR International) and 500 μL of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) was added to the aqueous phase. After another centrifugation step (18,000 \times g, 10 min), 117 μL of ammonium acetate (0.1 g/mL) and 934 μL of 90% ethanol were added to 350 μL of supernatant. The DNA was precipitated overnight at -20°C and after centrifugation (18,000 \times g, for 15 min), 250 μL of 70% ethanol was added to the pellet. A last centrifugation step was performed and the pellet was air dried. The purified DNA was resuspended by adding 40 μL of dissolution solution (1 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA pH 8) and stored at -80°C . Extracted DNA was quantified using Qubit 3.0 broad range assay (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) on a DeNovix (Wilmington, DE, United States) fluorometer. The purity of the DNA was measured using a Nanodrop (ThermoFisher Scientific, United States). The amplification of a 291 pb fragment of the V4 region of the 16S rRNA gene was carried out as described in a previous publication [32]. Also included was a negative control of the DNA extraction and PCR amplification (water instead of sample) and a positive control of the PCR containing eight known bacterial DNA with different 16S rRNA gene abundance (theoretical composition based on 16S sequencing : 18.4% *Lactobacillus*, 17.4% *Bacillus*, 15.5% *Staphylococcus*, 14.1% *Listeria*, 10.4% *Salmonella*, 10.1% *Escherichia*, 9.9% *Enterococcus*, and 4.2% *Pseudomonas*) (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard, Zymo Research, Irvine, CA, United States). A 1.5% agarose gel electrophoresis was performed to verify the PCR amplification and the size of amplicons. The Illumina MiSeq 2x1250 bp paired-end sequencing was performed at McGill University and Genome Québec Innovation Center, Montréal, Canada.

Sequencing data processing and analysis

Bioinformatics analysis was processed using Mothur [36] version 1.44.3 by following the MiSeq standard operational procedure with default settings (https://mothur.org/wiki/miseq_sop/) as previously described [32]. Paired-end reads were assembled into contigs. After reducing sequencing and PCR errors – including removing ambiguous nucleotides and sequences longer than 275 pb – identical sequences were merged. The unique sequences were aligned against the SILVA 132 reference database adapted for use in Mothur (https://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files) prior to preclustering sequences using the Deblur algorithm. VSEARCH was used to identify the chimeras, which were removed [37]. Sequences were classified against the SILVA 132 reference database and non-bacterial domains – chloroplast, eukaryote, mitochondria – were removed. The Amplicon Sequence Variant approach (ASV) was used for analysis. The remaining sequences were assigned into ASV using an approach based on a 0% dissimilarity threshold. Final taxonomic assignment of each ASV was performed with the Ribosomal Database Project (RDP) trainset 16 database adapted for use in Mothur (https://www.mothur.org/wiki/RDP_reference_files).

Prior to microbiota analysis, random subsampling of sequences corresponding to the lowest number of sequences found in the samples was performed. RStudio (version 1.4.1103) was used in the current study to perform alpha diversity analysis, which describes the bacterial richness and distribution (evenness) within a single sample, and perform beta diversity analysis, which measures the similarity or dissimilarity between samples. The alpha diversity measures were calculated using indices, including Observed (the average number of observed ASV), Shannon (the ASV evenness), and inverse of the Simpson index (the microbial diversity of ASV) using the `estimate_richness` function from the R package “Phyloseq” [38]. Beta diversity was assessed using Jaccard and Bray-Curtis dissimilarity indexes to measure community membership (based on the presence/absence of ASV) and community structure (based on the relative abundance of ASV), respectively. A 2D non-metric multidimensional scaling (NMDS) – generated using the `vegan` package – was used to visualize the microbial community structure.

Statistical analysis

Statistical tests and graphs related to bacterial enumeration and sequencing data were performed in RStudio and Microsoft Excel. For each microbial indicator, bacterial counts were converted into \log_{10} CFU/600 cm² values. The comparison of mesophilic aerobic bacteria, enterobacteria, *E. coli*, Lactic acid bacteria, and *Pseudomonas* mean counts was performed between samples collected from the top and bottom areas i) before cooling and, ii) between samples collected before and after cooling, using a Mann-Whitney test. A Wilcoxon-test was performed to compare bacterial counts from samples collected from the top areas before and after cooling., as well from samples collected from the bottom areas before and after cooling

For samples collected before cooling (n= 64 batches), the alpha and beta diversity indices were compared with samples collected from the top and bottom areas using a Mann-Whitney test and PERMANOVA test, respectively. Then, the comparison of indices was performed between samples collected from the top and bottom areas i) over four weeks of sampling, ii) over four different sampling visits, using a Kruskal-Wallis and PERMANOVA test, respectively. iii) and during morning and afternoon shifts using Mann-Whitney test and PERMANOVA test, respectively. The alpha and beta diversity indices were compared between samples collected from the top area between i) four weeks of sampling ii) four different visits of sampling, using a Kruskal-Wallis and PERMANOVA test, respectively iii) morning and afternoon work shifts using a Mann-Whitney test and PERMANOVA test, respectively. The same comparison was performed for samples collected from the bottom areas.

For samples collected before and after cooling (n= 16 batches), the comparison of alpha and beta diversity indices between samples collected from the top and bottom areas i) before cooling, ii) and after cooling, were performed using a Wilcoxon-test and PERMANOVA test. A Wilcoxon-test was also performed to compare alpha and beta diversity indices from samples collected from the top areas before and after cooling, as well from samples collected from the bottom areas before and after cooling. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was conducted

using the adonis function in the vegan package [39]. For all tests, a significance level of 0.05 was considered statistically significant.

Results

Enumeration of bacterial populations on pig carcass surfaces

Bacterial counts of samples collected from the top and bottom areas before cooling

All bacterial population counts are presented in Table 1. Mesophilic aerobic bacteria were identified as the dominant bacterial population observed for samples collected from the top and bottom areas, followed by lactic acid bacteria, enterobacteria, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas* (Table 1). Mean bacterial concentrations for mesophilic aerobic bacteria, enterobacteria, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, and lactic acid bacteria were slightly higher but significant for samples collected from the bottom areas (with increased values of $0.4 \log_{10}$ CFU/600 cm², $0.3 \log_{10}$ CFU/600 cm², $0.8 \log_{10}$ CFU/600 cm², $0.2 \log_{10}$ CFU/600 cm², and $0.2 \log_{10}$ CFU/600 cm², respectively) ($p < 0.05$ using a *t*-test) (Table 1).

Bacterial counts of samples collected from the top and bottom areas before and after cooling

All bacterial population counts are presented in Table 1. For all bacterial populations except for lactic acid bacteria and *Pseudomonas*, the mean bacterial counts in both areas were significantly lower for samples collected after cooling (with a decrease of $0.4 \log_{10}$ CFU/600 cm² for mesophilic aerobic bacteria, $0.8 \log_{10}$ CFU/600 cm² for enterobacteria, $1.2 \log_{10}$ CFU/600 cm² for *Escherichia coli*) ($p < 0.05$ using a Mann-Whitney test) (Table 1). Bacterial counts from samples collected from the top area were compared among those collected before and after cooling. Bacterial concentrations for mesophilic aerobic bacteria, enterobacteria, *Escherichia coli*, and lactic acid bacteria were significantly lower for samples collected after cooling (decrease of $0.6 \log_{10}$ CFU/600 cm², $1.0 \log_{10}$ CFU/600 cm², $1.0 \log_{10}$ CFU/600 cm², and $0.7 \log_{10}$ CFU/600 cm², respectively) ($p < 0.05$ using a Wilcoxon test) (Table 1). The same comparison was performed for samples collected from the bottom areas. Only bacterial concentrations for enterobacteria and *Escherichia coli* were significantly lower for samples collected after cooling (with a decrease

of 0.5 log₁₀ CFU/600 cm² for enterobacteria and 1.5 log₁₀ CFU/600 cm² for *Escherichia coli*) (p<0.05 using a Wilcoxon test) (Table 1).

Detection of *Salmonella* spp. on pig carcass surfaces

Out of the 960 samples collected in this study, 11 were found positive for *Salmonella*: 5 and 6 samples collected from the top and bottom areas, respectively, all recovered before cooling (Table 2). Three serotypes were detected : *Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Braenderup. Serotypes were not differently distributed according to carcass area. Only two *Salmonella* positives samples (Table 2) with the same serotype came from the same carcass (Table 2). Six *Salmonella* positive samples were recovered from only two visits (week 3/visit 3/morning shift and week 4/visit 4/morning shift).

Sequence quality

A total of 960 pig carcass areas were sampled and the six wipes from samples collected from the top or bottom areas of one batch were pooled. The V4 region of the 16S rRNA gene was sequenced from 160 samples : 64 pooled samples collected from the bottom area before cooling (n=64 batches x 6 individual bottom areas samples =384 samples collected from the bottom area); 64 pooled samples collected from the top area before cooling (384 samples collected from the top area); 16 pooled samples collected from the bottom area after cooling (n=16 batches x 6 individual bottom areas samples =96 samples collected from the bottom area); and 16 pooled samples collected from the top area after cooling (96 samples collected from the top area). In addition, 20 negative experimental controls (one per visit before and after cooling), 16 external experimental controls (one per visit before cooling), 1 DNA positive control, and 2 PCR and sequencing negative controls were added, for a total of 199 samples sequenced.

After reads processing, a total of 5,281,543 sequences were assigned to 28 phyla, 65 classes, 120 orders, 247 families, and 794 genera. The average number of sequences per sample was 28,018. The positive control, containing the eight known bacterial DNA with different 16S rRNA gene abundance, was composed of 22% *Lactobacillus*, 16.8% *Bacillus*, 16.2% *Salmonella*, 14.6%

Escherichia/Shigella, 14.6% *Staphylococcus*, 10.9% *Listeria*, 9.9% *Pseudomonas*, and 6 % *Enterococcus*, which is highly similar to the manufacturer product description. The negative controls used for the DNA extraction and PCR steps contained 6 and 20,997 sequences respectively, and no band was visible on gel after electrophoresis, just before sequencing.

Microbiota description and diversity of pig carcass surfaces sampled before cooling

Comparison of microbial composition and diversity between samples collected from the top and bottom areas before cooling

The microbiota composition and the relative abundance results of samples collected from the top and bottom areas before cooling at the phylum, family, and genus levels are presented in Figure 3.

Alpha diversity indices were used to measure and compare the microbial diversity between samples collected from the top and bottom areas before cooling (Figure 4A, Table 3). Results revealed a significant difference in alpha diversity only with the Observed index ($p < 0.05$ using a Mann-Whitney) (Table 3). Samples collected from the top area showed higher Observed index values than samples collected from the bottom area (Figure 4A).

Beta diversity of bacterial community structure based on Jaccard and Bray-Curtis distance matrix was used to evaluate the differences between samples collected from the top and bottom areas before cooling (Figure 4B). Graphically, carcass surface samples clearly clustered according to area (Figure 3B), and a statistically significant difference in the microbiota structure between samples collected from the top and bottom areas was confirmed ($p < 0.05$ using a PERMANOVA test).

Comparison of microbial composition and diversity of pig carcass samples collected before cooling according to week, visit, and shift

The microbiota general composition at the genus level according to week, visit, and shift are illustrated in Figure S1.

The current study compares the alpha and beta diversities of the carcass microbiota that were collected over the four weeks of sampling, before cooling, regardless of area. Significant differences were observed (Kruskal-Wallis test and PERMANOVA $p < 0.05$) (Figure S2A, S2B and Table 3). The same result was obtained for the analysis of the impact of visit (Figures S2C and S2D and Table 3) and shift (Figures S2E and 2F and Table 3) on sampling.

Alpha and beta diversity were also compared between samples collected from the top areas for the same factors : week of sampling (Figure S3A, Figure S3B, and Table 4), visit (Figure S3C, Figure S3D, and Table 4) and shift (Figure S3E, Figure S3F, and Table 4). The same comparison was performed for samples collected from the bottom areas (Figure S4 and Table 4).

The Shannon and inverse Simpson indices of samples collected from the top areas were found to be significantly different between sampling week and shift ($p < 0.05$ using a Kruskal-Wallis test). In contrast, the Shannon and inverse Simpson indices of samples collected from the bottom areas were found to be significantly different only between sampling weeks. Samples collected during the morning showed significantly higher alpha diversity indices. For beta diversity, results showed that the microbiota structure was significantly different between all groups (week, visit, and shift) for the samples collected from the top areas, as well as for samples collected from the bottom areas ($p < 0.05$ using a PERMANOVA test).

Carcass surface microbiota description and diversity before and after cooling

Microbiota description of samples collected from the top and bottom areas before and after cooling

Results pertaining to the microbiota composition and the relative abundance of 16 pooled samples collected from the top areas and 16 pooled samples collected from the bottom areas before and after cooling at genus level are presented in Figure 5

Comparison of microbiota diversity between samples collected from the top and bottom areas before and after cooling

Alpha and beta diversity indices were first compared between samples collected from the top and bottom areas before and after cooling from 16 batches (Figure S5, Figure 6, and Table 5). Significant differences were noted only for the Observed indices (Table 6). Samples collected from the top areas showed significantly higher alpha diversity values compared to samples collected from the bottom areas (Table 5). Beta diversity analysis revealed a significant difference in the microbiota structure between samples collected from the top and bottom areas before and after cooling respectively ($p < 0.05$ using a PERMANOVA test).

Alpha and beta diversity indices were also compared between samples collected before and after cooling for both top and bottom areas (Figure S4, Figure 6, and Table 6). Results revealed a significant difference in alpha diversity for all groups compared, except for samples collected from the bottom areas that showed no significant difference in the Inverse Simpson index calculated from samples collected before and after cooling. Samples collected before cooling showed alpha diversity indices significantly higher compared to samples that were collected after this step. For beta diversity, a significant difference was observed between samples collected before and after cooling, between samples collected from the top area before and after cooling, and between samples collected from the bottom areas ($p < 0.05$ using a PERMANOVA test).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study that uses high throughput sequencing to give a complete overview of the evolution of pig carcass surface microbiota according to different sampling time points and processing stages.

Results revealed that samples collected from the top and bottom areas of the pig carcasses sampled before cooling showed differences in bacterial counts, with the bottom areas being slightly more contaminated. This is in accordance with both the Wheatley et al. [29] and Biasino et al. [13] studies that showed that sampling area on pig carcasses significantly impacted

mesophilic aerobic bacteria, *E. coli*, and enterobacteria counts. For example, jowl and foreleg areas – corresponding to the bottom area in the present study – showed higher bacterial counts when compared to the ham or the belly areas (top areas) immediately after evisceration. The difference of bacterial counts observed between areas was also similar to results from this study [13,29]. The study of Peruzý et al. [30], it is worth mentioning, did not observe differences in counts according to carcass area. As expected, the bottom area can be more exposed to sources of contamination, as the intestinal tract is suspended above the head before complete removal and the floor is in close proximity when pigs are hung by the feet. In the current study, total mesophilic aerobic bacteria, enterobacteria, and *Escherichia coli* contamination slightly decreased following cooling. These results agree with several studies reporting a reduction in these bacterial indicators after 24 hours of cooling [26,27,29,31,40–42]. The level of contamination reduction is divergent between studies; this could be explained by different chilling parameters in place at the different plants, including air speed, size, temperature, humidity of the cooling room, and occasions of contact between carcasses. For example, differences in the contact area between the cold wind and pig carcasses will impact carcass chilling efficiency. In the present study, only enterobacteria and *Escherichia coli* counts measured after cooling were higher on samples collected from the bottom areas when compared to samples collected from the top areas. This is in accordance with Pearce et al. [43] and Wheatley et al. [29] who reported that the neck area was more contaminated than the ham and the belly after cooling, with bacterial counts increasing by approximately 0.5 log₁₀ CFU/ cm² for total bacteria and enterobacteria counts decreasing from 3 to 2.4 log₁₀ CFU/ cm². Moreover, in this study, the cooling step evaluated comprised a shower. One might expect that the washing step applied just before cooling would spread the microbial contamination all over the carcasses, as observed by Spescha et al. [26]. But, in fact, the water running down from the top to the bottom of the carcass actually seemed to increase the bottom area's contamination compared to the top [13]. Moreover, the effectiveness of carcass washing to decrease bacterial contamination is controversial in the literature. A Bolton et al. [28] study observed that the level of contamination after the washing step was slightly increased but similar to that obtained after the evisceration, with bacterial counts around 4 log₁₀ CFU/ cm², while Rivas et al. [5] showed that the microbial

load of total mesophilic bacteria decreased after carcasses washing with a significant bacterial counts reduction of 0.5 log₁₀ CFU/ cm².

Before cooling, results from the current study showed that bacterial counts for *Pseudomonas* and LAB populations were significantly higher on samples collected from the bottom areas than from top areas. Similarly, it has been shown that the jowl pig carcass area was most contaminated with *Pseudomonas* before cooling (with bacterial counts around 2.5 log₁₀ CFU/ cm²) [30]. However, in a previous study conducted in the same slaughterhouse, *Pseudomonas* was not detected when using culture on pig carcasses before cooling [32]. In the present study, results showed that *Pseudomonas* was similar between carcasses sampled before and after cooling, on both top and bottom areas, and only LAB counts established from the sampling of the top areas were significantly higher after cooling. Results revealed that *Pseudomonas* and LAB can be present at the end of dressing, just before the last shower, as well as before and after cooling, suggesting a higher risk for pig carcass and pork meat spoilage. Indeed, *Pseudomonas* is considered to be a major spoilage source for refrigerated meat products in aerobic conditions [23], and its presence was expected.

In total, *Salmonella* could be isolated from 11 carcass areas sampled and all positive samples were recovered before cooling. The percentage of *Salmonella*-positive carcass samples collected from the top and the bottom areas was 7.8 % and 9.4 %, respectively. Previous studies investigating *Salmonella* contamination on pig carcasses reported a large interval of measured prevalence, ranging from 0.29% to 64% [6,8,13–18]. These different contamination levels could be explained by variations in the application of good slaughtering practices at the evisceration step. In addition to evisceration techniques, different environmental cleaning and disinfection procedures of slaughterhouse applied and also varying *Salmonella* status for pigs entering the slaughterhouse can affect contamination levels. These different factors could also explain why half of *Salmonella*-positive carcass samples were recovered from only two visits in this study. Indeed, results suggest there is not a persistent contamination of *Salmonella* at this pig slaughterhouse during the sampled period, which might suggest that *Salmonella* contamination can be related to occasional

and unusual circumstances (inadequate cleaning and disinfection procedures for example). When Biasino et al. [13] and Peruzzy et al. [30] looked at the presence of *Salmonella* on pig carcasses before cooling, it was observed that samples collected from the neck area (about 88%) were also more contaminated than ham areas (about 50%). In the current study, the majority of *Salmonella* isolates belonged to the serovar *S. Thyphimurium*, followed by *S. Derby* and then *S. Braenderup*, all serotypes that are commonly associated with pigs and pork meat and that are among the most prevalent serotypes associated with pig production [44,45]. Other studies observed that *Salmonella* *Thyphimurium* was the most prevalent serotype observed on pig carcasses [14,30]. However, in contrast with the study from Peruzzy et al. [30], our results showed that the same serotypes were not always present on both areas of the same carcass. It is reasonable to suspect that a possible cross-contamination between carcasses occurred or that pigs were contaminated by more than one serotype [13]. However, the low contamination level prevents us from drawing conclusions as to a potential association between the presence of *Salmonella* and a particular visit.

Overall, the bacterial community composition observed in the present study was similar to what was reported by Peruzzy et al. [30] and Braley et al. [32] in the sense that most genera observed on the carcasses sampled are known to be residents of pig gut and oral cavity microbiota. Among the identified bacterial populations, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, and *Moraxella* are commonly associated with food spoilage [3,33]. Results showed that normal members found in the gut microbiota as well as in oral (tonsils) and nasal cavities of healthy pigs were found on the pig carcass surface microbiota, including both the top and bottom areas. Among these, *Acinetobacter* was identified and *Rothia* was the dominant genus, revealing that bacterial members that could be originating from the oral and nasal cavities were present on samples collected from the bottom areas, such as *Enhydrobacter*. Indeed, other genera, such as *Gallicola* and *Escherichia/Shigella*, known to be normal constituent members of the gut microbiota of healthy pigs, were identified only from the samples collected from the bottom areas [46]. In addition, *Moraxella* genus, a prominent meat spoilage bacterium [47], was only identified from samples collected from the bottom areas and was identified in previous studies in the nasal

cavities of pigs [35,48]. However, the identification of contamination origin and the description of bacterial population flows are complex in food processing [7]. It has been reported that bacterial populations such as spoilage-associated microbiota found in the slaughterhouse environment are initially originating from pig carcasses and then contaminating and becoming a resident microbiota in the food production environment [7,29,49,50]. Indeed, two studies by Zwirtzith et al. [7] and Bridier et al. [51] observed that the dehairing area and the area close to where the incision is made for carcass opening was dominated by *Moraxella*, *Lactobacillus*, and *Acinetobacter*. Zwirtzith et al. [7] revealed that *Lactobacillus* and *Moraxella* were most likely transferred from gloves of employees during evisceration as well as from the polishing tunnel whips and the railing at the classification step, respectively. And Bridier et al. [51] showed that the neck clipper area was overall dominated by the *Enhydrobacter* genus.

In this study, results suggest that only bacterial richness, i.e. number of different bacteria, tended to be higher on top samples when compared to bottom samples collected before cooling. As carcasses were hung by one foot with the head facing the floor, the opposite could be expected. In addition, the results obtained indicated that the microbiota structure observed on the pig carcasses sampled, based on the presence/absence and abundance of bacteria, was different between the top and bottom areas before cooling. The fact that pig carcasses are not equally exposed to bacterial contamination during processing could explain why the top areas can be exposed to a higher risk of cross-contamination during primary processing, which can occur between carcasses and direct contact with workers' hands or the equipment during carcass opening, for example [7,29,50,52].

To the best of our knowledge, this is the first report investigating the pig carcass microbiota according to sampling time points (week, visit, work shift) on bacterial composition, diversity, and structure using 16s rDNA amplicon sequencing. Therefore, there is no available data in the literature to allow for a comparison of the results obtained. In the current study, the richness and structure of the carcass microbiota were different between several of the sampling times (week, visit, work shift), regardless of the carcass areas sampled. Nevertheless, results suggest that

during normal primary processing, the bacterial richness of the pig carcasses over different visits between the top areas and between the bottom areas was similar. In the present study, beta diversity analysis revealed that the structure of the carcass microbiota was different between several of the sampling times (week, visit, work shift) and between samples collected from the top and bottom areas. During a previous study conducted by our group [32], it was observed that carcass surface diversity was similar between carcasses originating from different farms and slaughtered the same day. As the primary processing for each carcass was the same, a persistent contamination of the slaughterhouse by the bacteria found on pig carcasses is plausible and could have influenced the carcass surface microbiota structure during visits. It has been reported that the survival of bacteria in food processing environments is mostly related to their ability to form biofilms on surfaces, allowing them to persist even after washing and disinfection [53]. Indeed, Bridier et al. [51] revealed that cleaning and disinfection tended to reduce bacterial diversity but favored some genera – such as *Rothia* – in slaughterhouse environments, the dominant genus found on pig carcasses in this study. Thus, given the differences between carcass microbiota structures according to sampling time (week, visit, work shift) that were observed in the present study, further dedicated studies regarding the impact of cleaning and disinfection on the survival of specific bacteria is warranted.

In this study, samples collected from the top areas during the morning shift showed a higher bacterial diversity than samples collected during the afternoon shift, while samples collected from the bottom areas presented similar richness and distribution of bacteria regardless of the shift from which they were collected. It is reasonable to assume that contamination from the slaughterhouse environment would increase as the volume of animals slaughtered throughout the day increases, resulting in a higher risk of cross contamination from the environment to all carcass surfaces and thus a higher bacterial diversity on samples collected in the afternoon. The study of Rizzotto et al. [11], for example, found this contamination increase over time to be the case, demonstrating that pig carcasses from the last batches slaughtered on a Friday showed higher bacterial contamination than the first batches slaughtered on the Monday of that same week. The divergence from expected results observed between shifts in our study might be

related, as mentioned above, to inadequate application of good hygiene practices performed during particular shifts.

In the present study, the highest bacterial richness was on samples collected before cooling compared to samples collected after cooling. The difference of carcass surface microbiota structure between these samples was expected due to the low temperature to which carcasses are exposed during cooling, which reduces the growth of bacteria [28,29,40,42,54]. However, similar to the results of this study, Van Ba et al. [31] showed that most genera present on carcasses before cooling were also detected after 24 hours of cooling. In the present study, the majority of the bacteria that were identified after cooling are known residents of the gastrointestinal tract of healthy pigs. These results indicate that during normal commercial primary processing, most bacteria detected on samples collected from the top and bottom areas before cooling – such as *Rothia*, *Clostridium_senso_stricto*, *Enhydrobacter*, *Lactobacillus*, and *Streptococcus* genera – remain after this step. In addition, in the current study, results showed that bacterial richness and the microbiota structure of carcasses were different between the top and the bottom areas after cooling. In contrast to samples collected before cooling, samples collected from the bottom areas presented a higher bacterial richness. Similar to the culture results, washing just before cooling increased the risk for contamination of the bottom area and might be related to the difference observed for the bacterial diversity after cooling. A low temperature (4°C) favored the growth of psychrotrophic bacteria as opposed to the mesophilic ones [55]. As discussed above, different parameters of cooling can affect cooling efficiency and thus bacterial growth, but cross-contamination can also occur between carcasses touching each other for example, since some genera were detected only after cooling. However, it is also possible to hypothesize that the abundance of these bacteria is not enough to be detected before cooling with culture-independent methods. Regarding the bacterial composition of the pig carcass microbiota, results showed that the genus *Pseudomonas* was not detected as a dominant bacterium after cooling, thus reinforcing the fact that the cooling step appears to have a significant impact on all bacterial populations present on the surface of the pig carcass.

Conclusions

In conclusion, in the slaughterhouse studied, the results of the comparison of different sampling areas showed a higher level of carcass contamination on bottom areas, while sequencing results showed a higher bacterial diversity on top areas before cooling. With 16S amplicon sequencing, the bacterial richness and distribution for samples collected from the top and bottom areas appear similar between several visits throughout the month of sampling. In addition, samples collected from the top areas show different carcass bacterial richness according to processing shift, and pig carcass surface microbiota composition and diversity varied according to visit and shift. After cooling, diversity of the microbiota decreased on samples collected from the top and bottom areas. Samples collected from the bottom areas revealed a higher bacterial diversity, and cooling did not allow for a significant reduction of mesophilic aerobic bacteria counts. Ultimately, the bacterial community of pig carcasses might depend on the microbial population of the slaughterhouse. With the use of a non-culture based method, this study provides a better understanding of pig carcass microbiota evolution that could help inform the implementation of improved strategies for the control of spoilage and pathogen microorganisms.

Tables

Tableau 1. – Mean bacterial counts (log₁₀ CFU/600 cm² ± σ) for mesophilic aerobic bacteria, enterobacteria, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, and lactic acid bacteria and p-values of statistical tests when comparing each bacterial population mean count with samples collected from the top and bottom areas before and after cooling.

Mean concentration (log ₁₀ CFU/600 cm ² ± σ)	Mesophilic		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	Lactic acid bacteria
	aerobic bacteria	enterobacteria			
Samples collected from the top area (n = 64)	6.1 ± 0.3	4.2 ± 1.5	3.6 ± 1.80	2.8 ± 1.3	5.4 ± 0.5
Samples collected from the bottom area (n = 64)	6.5 ± 0.2	4.5 ± 1.1	4.3 ± 1.54	3.1 ± 1.6	5.7 ± 0.5
<i>(A) p-value</i>	<0.001*	0.007*	<0.001*	0.02*	<0.001*
Samples collected before cooling (n = 32)	6.3 ± 0.3	4.5 ± 1.0	4.2 ± 1.6	2.7 ± 1.4	5.6 ± 1.1
Samples collected after cooling (n = 32)	5.9 ± 0,5	3.7 ± 1.9	3.0 ± 1.5	2.2 ± 1.2	5.0 ± 0.5
<i>(B) p-value</i>	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.4	0.3
Samples collected from the top area before cooling (n = 16)	6.2 ± 0.3	4.4 ± 1.2	3.9 ± 1.8	2.7 ± 1.4	5.5 ± 0.5
Samples collected from the top area after cooling (n = 16)	5.5 ± 0.4	3.4 ± 1.7	2.9 ± 1.0	2.0 ± 0.8	4.7 ± 0.5
<i>(C) p-value</i>	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.3	0.03
Samples collected from the bottom area before cooling (n = 16)	6.3 ± 0.3	4.5 ± 0.5	4.4 ± 1.1	2.8 ± 1.5	5.8 ± 1.4
Samples collected from the bottom area after cooling (n = 16)	6.3 ± 0.4	4.0 ± 2.0	3.0 ± 1.8	2.5 ± 1.4	5.2 ± 0.5
<i>(D) p-value</i>	0.1	<0.001*	<0.001*	0.9	0.9

σ: standard deviation.

Comparison between each bacterial population mean count among :

(A) samples collected from the top and bottom areas before cooling using a Mann-Whitney test

(B) samples collected before and after cooling using a Wilcoxon-test

(C) samples collected from the top area before and after cooling using a Wilcoxon-test

(D) samples collected from the bottom area before and after cooling using a Wilcoxon-test

For all tests, a significance level of 0.05 was considered statistically significant (*significant difference).

Tableau 2. – *Salmonella* serotypes isolated from samples (collected from the top (n = 384) and bottom (n = 384) areas before cooling from 64 batches and their distribution according to week, visit, and work shift.

Samples collected from the	Serotype	Batch number	Week	Visit	Work shift
Top area	<i>S. Typhimurium</i>	5	#1	#2	Morning
		17	#2	#1	Afternoon
		64	#4	#4	Morning
	<i>S. Braenderup</i>	1	#1	#1	Afternoon
	<i>S. Derby</i>	61	#4	#4	Morning
Bottom area	<i>S. Derby</i>	28	#2	#4	Morning
		40	#3	#3	Morning
		61	#4	#4	Morning
	<i>S. Typhimurium</i>	9	#1	#3	Morning
		62	#4	#4	Morning
		<i>S. Braenderup</i>	41	#3	#3

Tableau 3. – Comparison of alpha diversity indices (Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices) between samples collected from both (top and bottom) areas between week, visit, and work shift.

	Observed	Shannon	Inverse Simpson
Samples collected from the top area (n = 64)	997	3.61	9.74
Samples collected from the bottom area (n = 64)	878.92	3.58	12.23
(A) p-values	<i><0.001*</i>	<i>0.98</i>	<i>0.47</i>
Samples collected from week #1 (n= 32)	926	3.79	12.55
Samples collected from week #2 (n= 24)	1142	3.72	10.63
Samples collected from week #3 (n= 36)	877	3.07	5.64
Samples collected from week #4 (n= 36)	1090	3.88	15.21
(B) p-values	<i>0.011*</i>	<i><0.001*</i>	<i><0.001*</i>
Samples collected from visits #1 (n= 36)	990	3.42	8.49
Samples collected from visits #2 (n= 32)	1012	3.76	13.92
Samples collected from visits #3 (n= 26)	976	3.76	13.15
Samples collected from visits #4 (n= 34)	944	3.51	9.28
(C) p-values	<i>0.003*</i>	<i>0.024*</i>	<i>0.011*</i>
Samples collected from morning shift (n= 64)	972	3.71	12.65
Samples collected from afternoon shift (n= 64)	887	3.47	9.36
(D) p-values	<i><0.001*</i>	<i>0.014*</i>	<i>0.01*</i>

Comparison of alpha diversity indices with :

(A) samples collected from the top and bottom areas before cooling using a Mann-Whitney test

(B) samples collected from top and bottom areas over four weeks of sampling using a Kruskal-Wallis test

(C) samples collected from top and bottom areas over four different sampling visits using a Kruskal-Wallis test

(D) samples collected from top and bottom areas during morning and afternoon shifts using a t-test

For all tests, a significance level of 0.05 was considered statistically significant (significant difference)*

The means were based on 1,000 subsampling of 15,998 sequences.

Tableau 4. – Comparison of alpha diversity indices (Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices) between samples collected from the top between week, visit, and work shift, as well between samples collected from the top between week, visit, and work shift and bottom areas of 16 batches before and after cooling.

		Observed	Shannon	Inverse Simpson
Samples collected from the top area	Samples collected from week #1 (n= 16)	979	3.68	10.61
	Samples collected from week #2 (n= 12)	1239	3.79	10.50
	Samples collected from week #3 (n= 18)	967	3.10	5.22
	Samples collected from week #4 (n= 18)	1242	3.97	13.11
	(A) p-values	<i>0.05</i>	<i><0.001*</i>	<i><0.001*</i>
	Samples collected from visits #1 (n= 18)	1076	3.45	7.62
	Samples collected from visits #2 (n= 16)	1101	3.82	11.62
	Samples collected from visits #3 (n= 13)	1034	3.75	11.69
	Samples collected from visits #4 (n= 17)	1021	3.49	8.68
	(B) p-values	<i>0.059</i>	<i>0.077</i>	<i>0.056</i>
	Samples collected from morning shift (n=32)	1070	3.79	11.37
	Samples collected from afternoon shift (n= 32)	936	3.42	8.09
	(C) p-values	<i><0.001*</i>	<i>0.002*</i>	<i>0.003*</i>
Samples collected from the bottom area	Samples collected from week #1 (n= 16)	902	3.91	14.52
	Samples collected from week #2 (n= 12)	1082	3.66	10.84
	Samples collected from week #3 (n= 18)	805	3.05	6.08
	Samples collected from week #4 (n= 18)	999	3.80	17.30
	(D) p-values	<i>0.14</i>	<i>0.001*</i>	<i><0.001*</i>
	Samples collected from visits #1 (n= 18)	915	3.40	9.31
	Samples collected from visits #2 (n= 16)	935	3.70	16.12
	Samples collected from visits #3 (n= 13)	1034	3.75	11.69
Samples collected from visits #4 (n= 17)	943	3.53	9.85	

	(E) p-values	0.078	0.29	0.15
Samples collected from morning shift (n= 32)		907	3.64	14.01
Samples collected from afternoon shift (n=32)		911	3.53	10.50
	(F) p-values	0.16	0.52	0.31

Comparison of alpha diversity indices between samples collected from the top area for :

(A) four weeks of sampling using a Kruskal-Wallis and PERMANOVA test, respectively.

(B) four different visits of sampling using a Kruskal-Wallis test

(C) morning and afternoon work shifts using a Mann-Whitney test

Comparison of alpha diversity indices between samples collected from the bottom area for:

(D) four weeks of sampling using a Kruskal-Wallis test

(E) four different visits of sampling using a Kruskal-Wallis test

(F) morning and afternoon work shifts using a Mann-Whitney test

For all tests, a significance level of 0.05 was considered statistically significant (significant difference)*

The means were based on 1000 subsampling of 15,998 sequences for comparisons A, B, C and 17,248 sequences for comparisons D, E, F.

Tableau 5. – Comparison of alpha diversity indices (Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices) between samples collected from the top and bottom areas of 16 batches before and after cooling.

	Observed	Shannon	Inverse Simpson
Samples collected from the top area before cooling (n = 16)	1148	3.68	10.28
Samples collected from the bottom area before cooling (n = 16)	1008	3.74	16.68
(A) p-values	<i>0.0067*</i>	<i>0.85</i>	<i>0.76</i>
Samples collected from the top area after cooling (n = 16)	782	2.96	5.671
Samples collected from the bottom area after cooling (n = 16)	761	3.14	7.09
(B) p-values	<i>0.035*</i>	<i>0.65</i>	<i>0.27</i>

Comparison of alpha diversity indices between :

(A) samples collected from the top and bottom areas before cooling from 16 pig batches

(B) samples collected from the top and bottom areas after cooling from 16 pig batches

For all comparisons, a Wilcoxon-test was conducted with a significance level of 0.05 considered statistically significant (significant difference)*

The means were based on 1,000 subsampling of 22,282 and 14,143 sequences for samples collected before (A) and after (B), respectively.

Tableau 6. – Comparison of alpha diversity indices (Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices) between samples collected before and after cooling and between samples collected from the top or the bottom area before and after cooling from 16 batch.

	Observed	Shannon	Inverse Simpson
Samples collected before cooling (n = 32)	1055	3.70	13.42
Samples collected after cooling (n = 32)	715	3.04	6.35
(A) p-values	<i>0.004*</i>	<i><0.001*</i>	<i><0.001*</i>
Samples collected from the top area before cooling (n = 16)	1148	3.68	10.28
Samples collected from the top area after cooling (n = 16)	782	2.96	5.671
(B) p-values	<i>0.041*</i>	<i>0.01*</i>	<i>0.002*</i>
Samples collected from the bottom area before cooling (n = 16)	1008	3.74	16.68
Samples collected from the bottom area after cooling (n = 16)	761	3.14	7.09
(C) p-values	<i>0.026*</i>	<i>0.045*</i>	<i>0.065</i>

Comparison of alpha diversity indices between :

(A) samples collected from both areas before and after cooling from 16 pig batches

(B) samples collected from the top area before and after cooling from 16 pig batches

(C) samples collected from the bottom area before and after cooling from 16 pig batches

For all comparisons, a Wilcoxon-test was conducted with a significance level of 0.05 considered statistically significant (significant difference)*

The means were based on 1000 subsampling of 14,143 sequences for comparisons A and B and 21,162 sequences for comparison C.

Figures

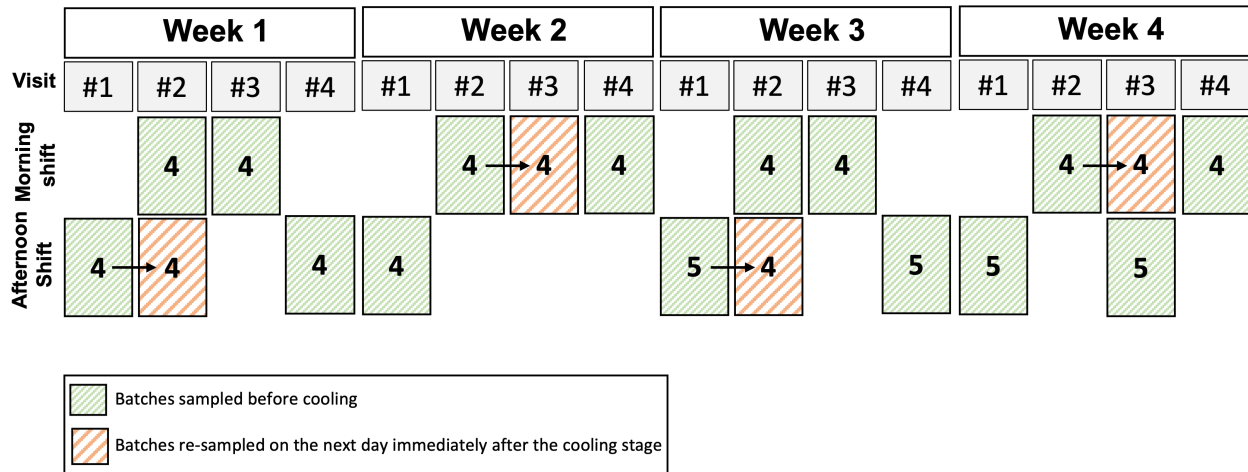


Figure 1. – Sampling protocol for number of pigs batches sampled. Sampling was performed over a period of 4 weeks. During each week, four visits were conducted on four different days (Monday: #1; Tuesday: #2; Wednesday: #3; Thursday: #4). During each visit, 4 or 5 batches, depending on operation constraints, were sampled. A total of 64 batches were sampled just before the final wash that preceded cooling and 16 batches from these 64 were re-sampled on the next day immediately after the cooling stage. From these 64 batches, 32 batches were sampled during the morning shift and the remaining 32 were sampled during the afternoon shift.

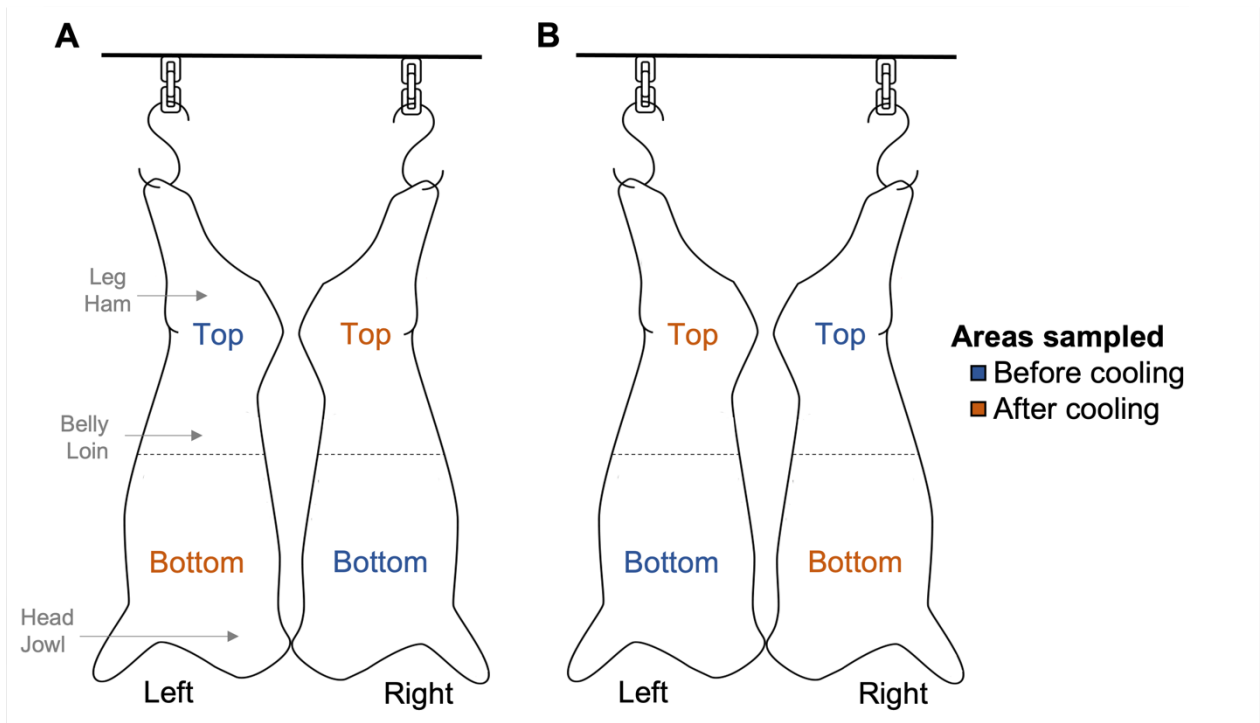
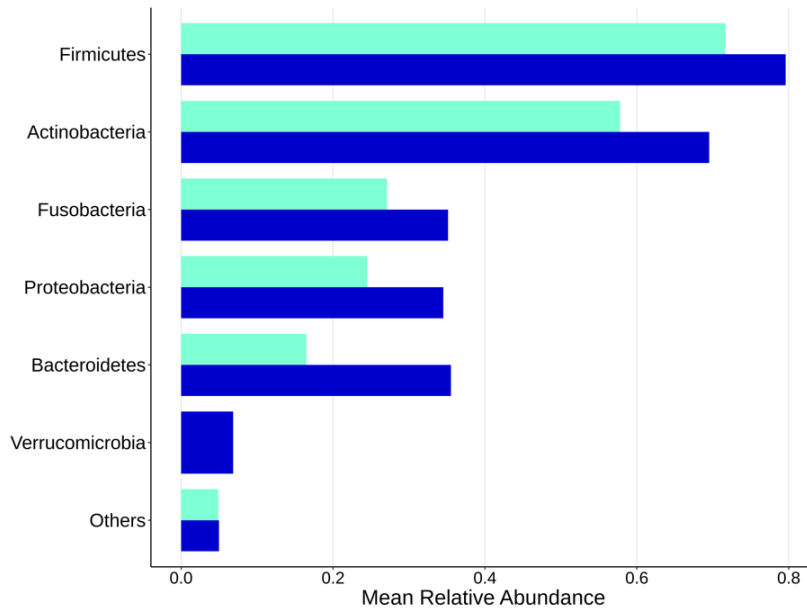
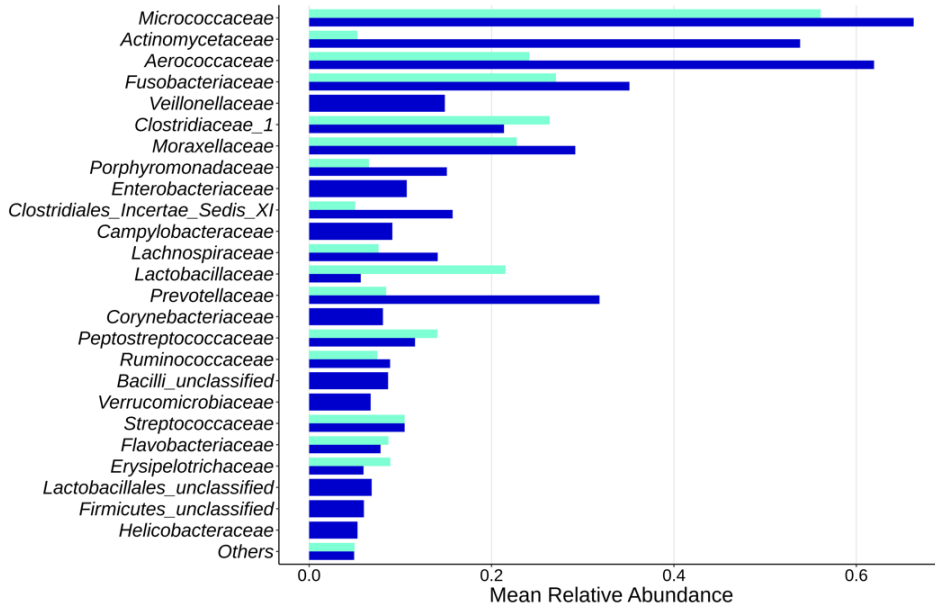


Figure 2. – Illustration of the top and the bottom areas sampled before and after cooling of the same pig carcass. For three carcasses, one sample was collected from the top left side and one sample from the bottom right side (A). The alternate sides were sampled for the remaining three carcasses (B).

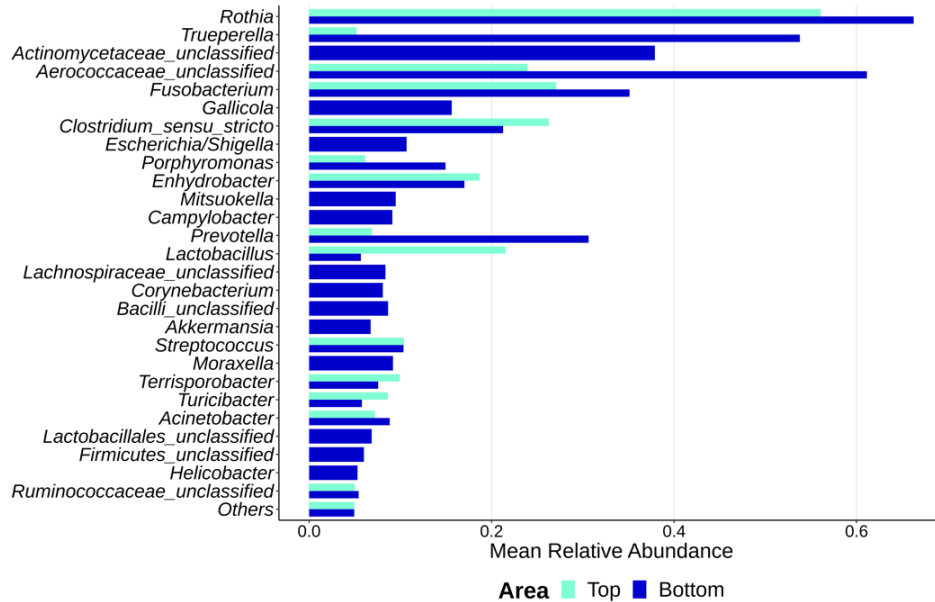
A



B



C



Area ■ Top ■ Bottom

Figure 3. – Mean relative abundance (%) of bacterial community members (individual representation in microbiota > 5%) identified at the phylum (A), family (B), and genus (C) levels on samples collected from the top (n= 64) and bottom (n = 64) areas before cooling from 64 batches. The category “Others” covers bacterial genera with individual relative abundance <5%.

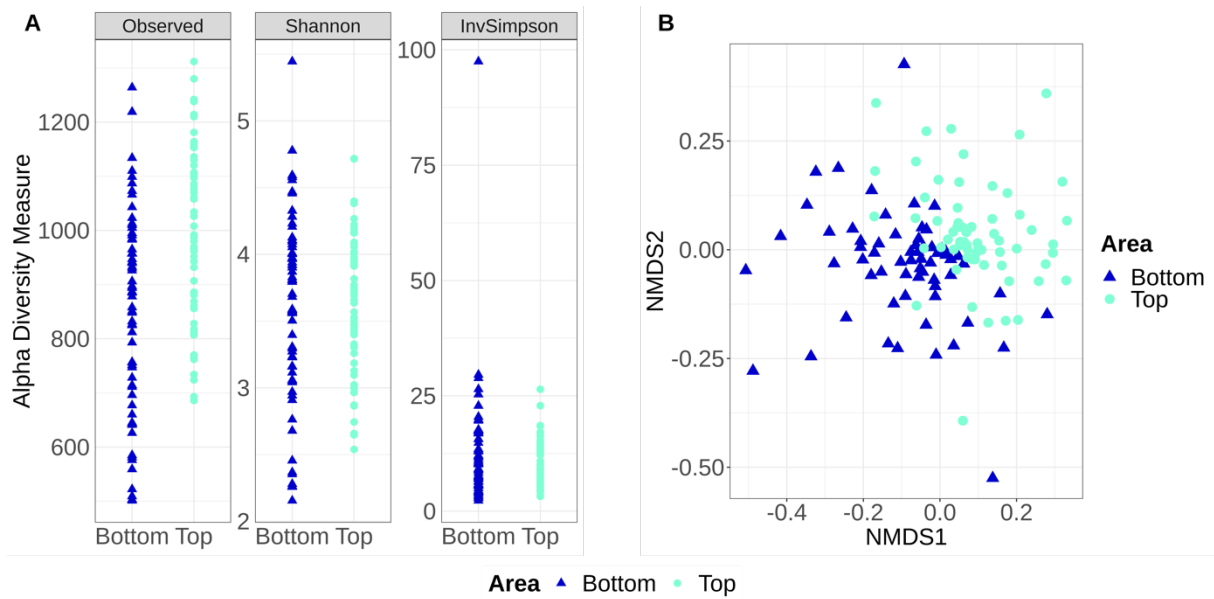


Figure 4. – Alpha (A) and beta (B) diversity measures for samples collected from the top (n = 64) and bottom (n = 64) areas before cooling from 64 batches using, respectively, Observed, Shannon, Inverse Simpson indices, and non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot to illustrate the comparison of the microbiota structure of pig carcass surfaces, calculated with the Bray-Curtis index, for samples collected from top (n = 64) and bottom (n = 64) areas.

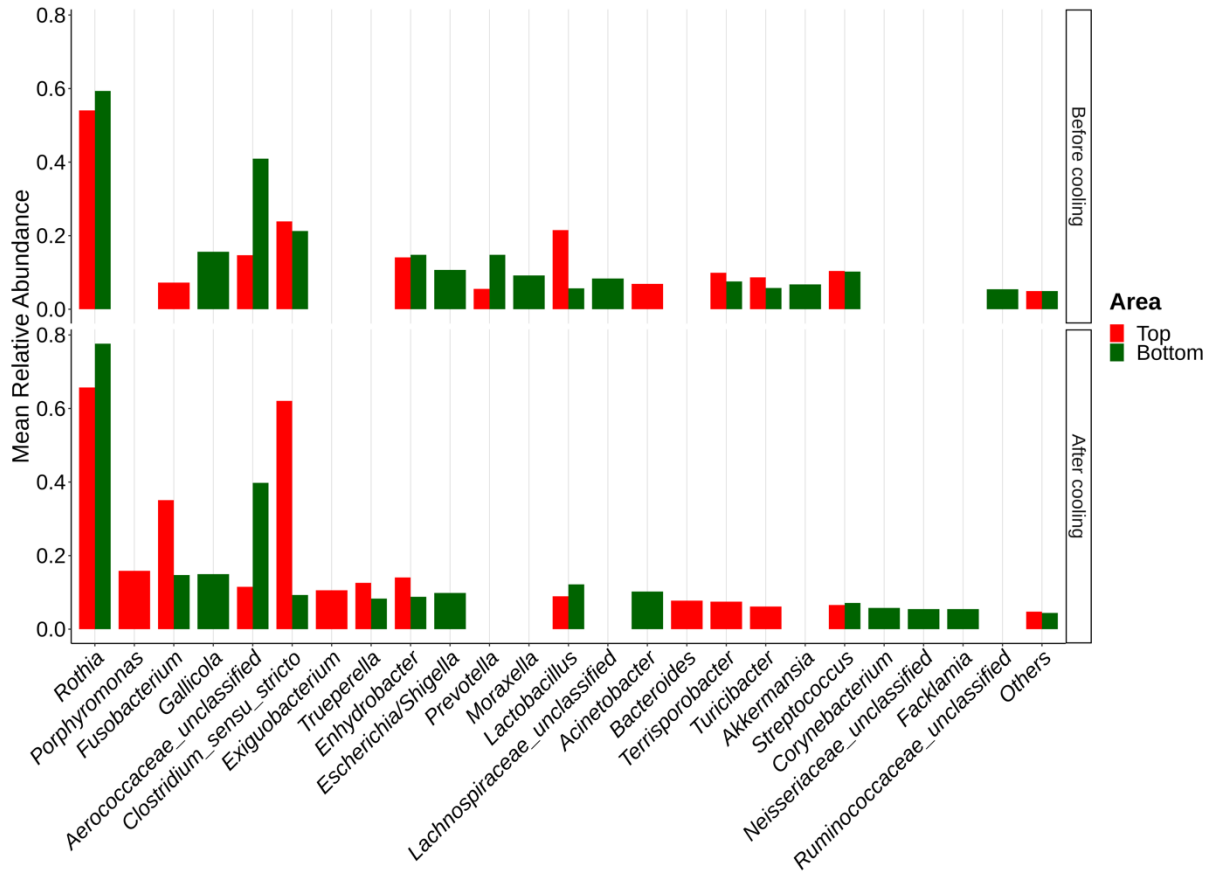


Figure 5. – Mean relative abundance (%) of bacterial community members (individual representation in microbiota > 5%) identified at the genus level from samples collected from the top (n = 16) and bottom (n = 16) areas before and after cooling from 16 batches. The category “Others” regroups bacterial genera with individual relative abundance <5%.

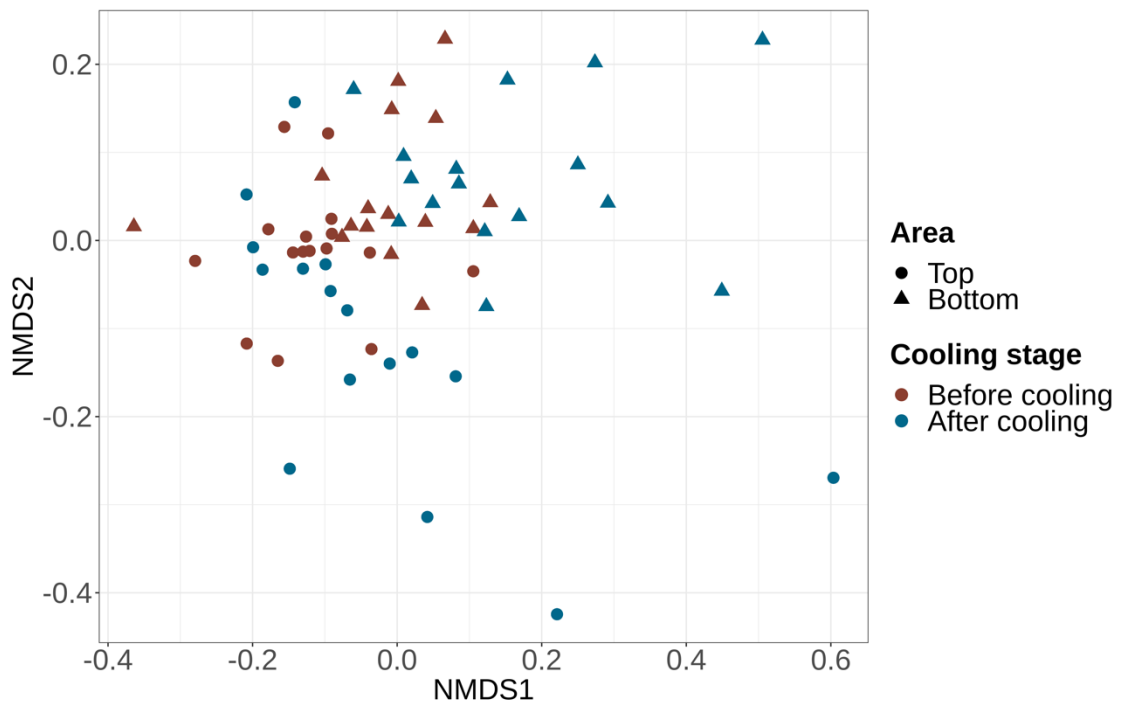


Figure 6. – Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure of the pig carcass surface, calculated with the Bray-Curtis index, and comparing samples collected from the top (n = 16) and bottom (n = 16) areas before and after cooling from 16 batches.

Supplementary material

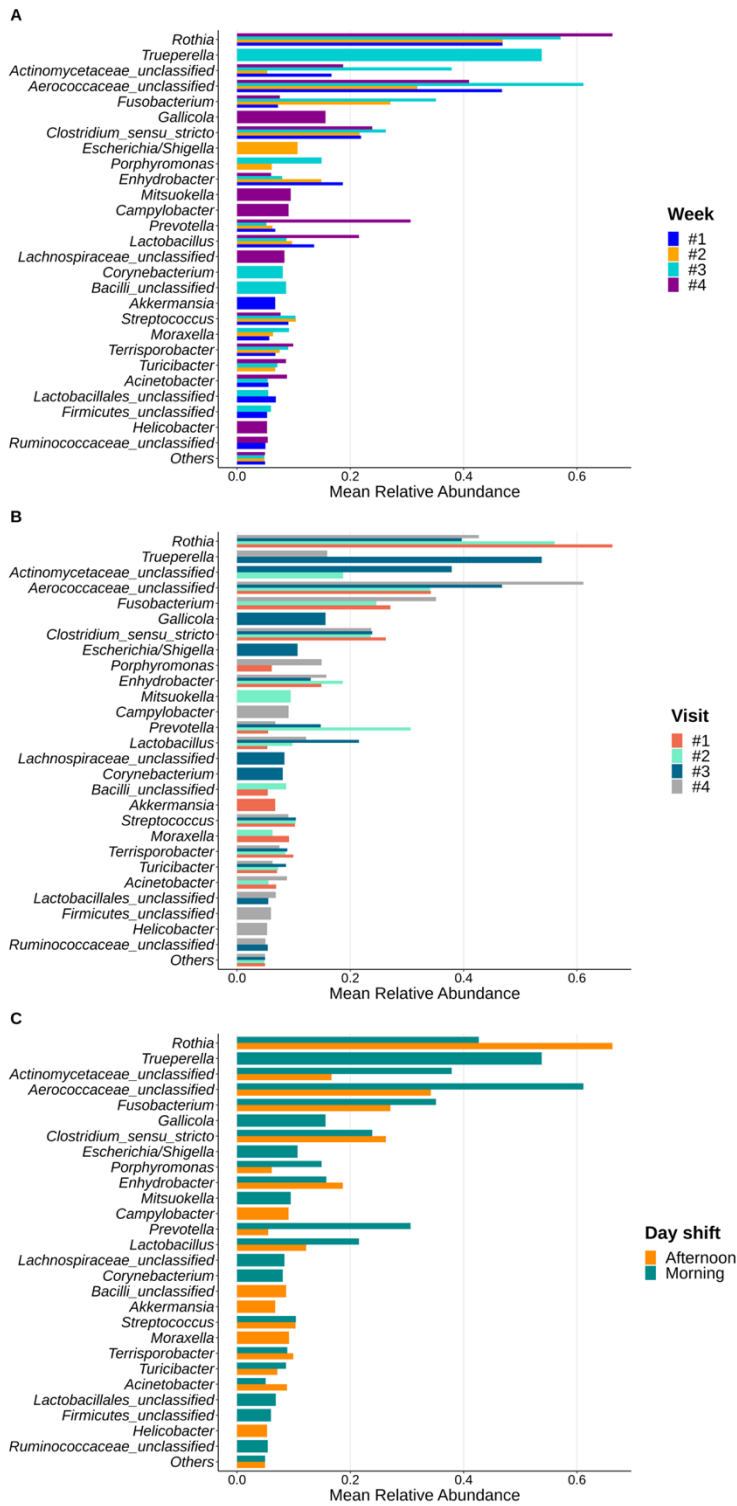


Figure 1. – (Supplementary) Mean relative abundance (%) of bacterial community members (individual representation in microbiota > 5%) identified at the genus level on samples collected from top (n = 64) and bottom (n = 64) areas before the cooling stage from 64 batches according to week (A), visit (B), and work shift (C). Category “Others” covers bacterial genera with an individual relative abundance <5%.

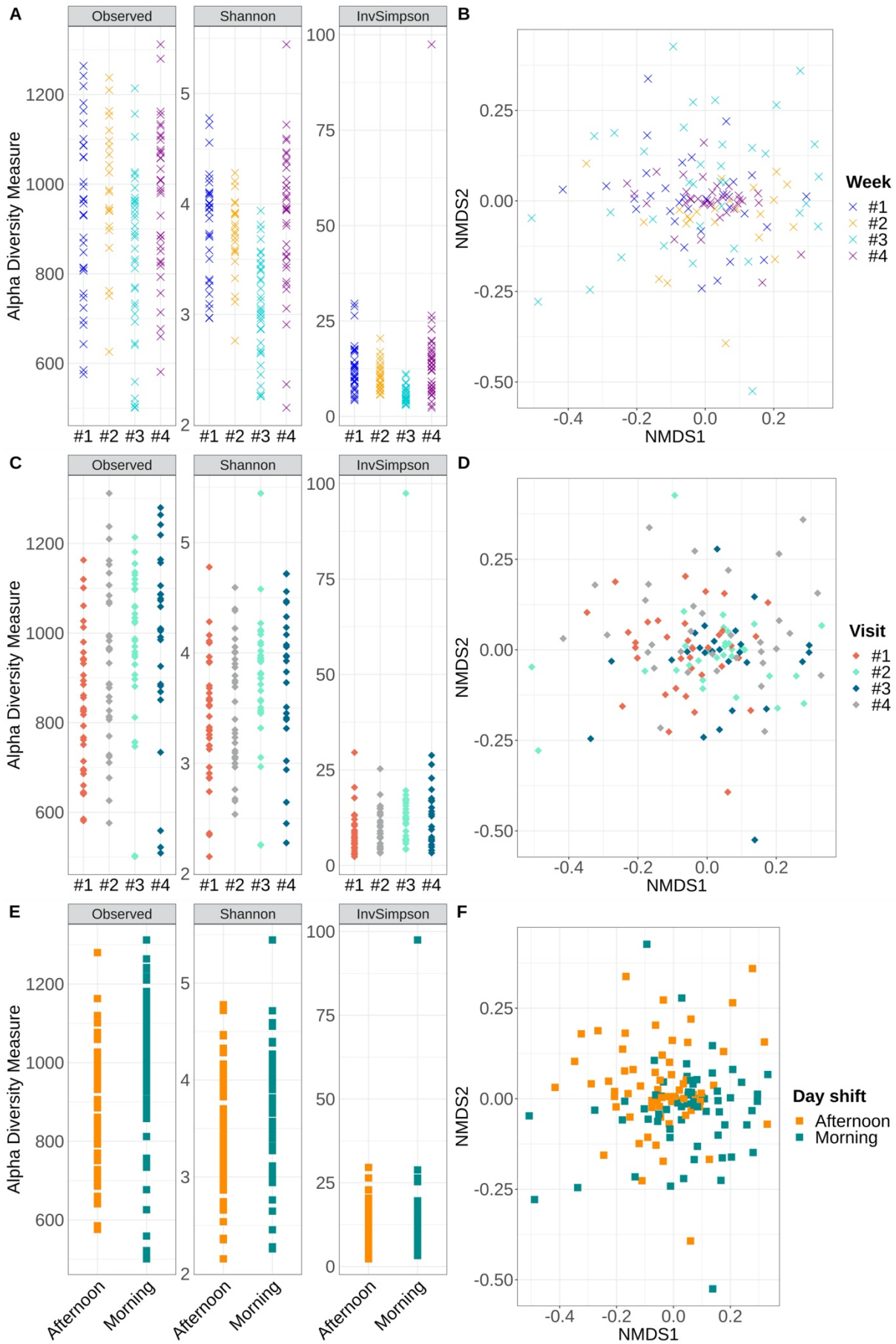


Figure 2. – (Supplementary) Comparison of alpha diversity measures of samples collected from the top (n = 64) and bottom (n = 64) areas according to week (A), visit (C), and work shift (E) using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure of the pig carcass surface, calculated with the Bray-Curtis index, and comparing microbiota of samples collected from the top (n = 64) and bottom (n = 64) areas according to week (B), visit (D), and work shift (F).

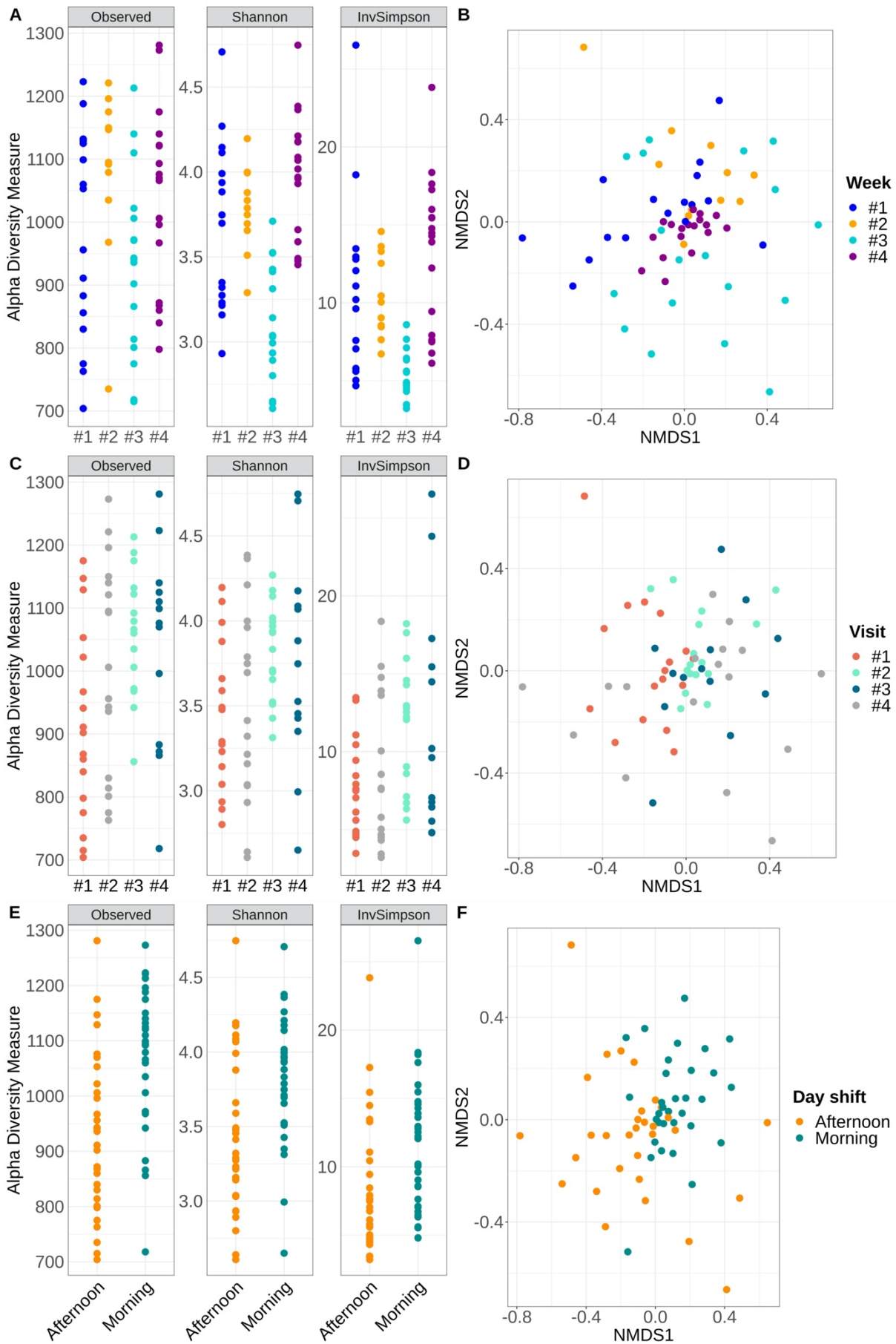


Figure 3. – (Supplementary) Comparison of alpha diversity measures of samples collected from top areas (n = 64) before cooling according to week (A), visit (C), and work shift (E) using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure of the pig carcass surface, calculated with the Bray-Curtis index, and comparing microbiota of samples collected from the top (n = 64) areas before cooling according to week (B), visit (D) and work shift (F).

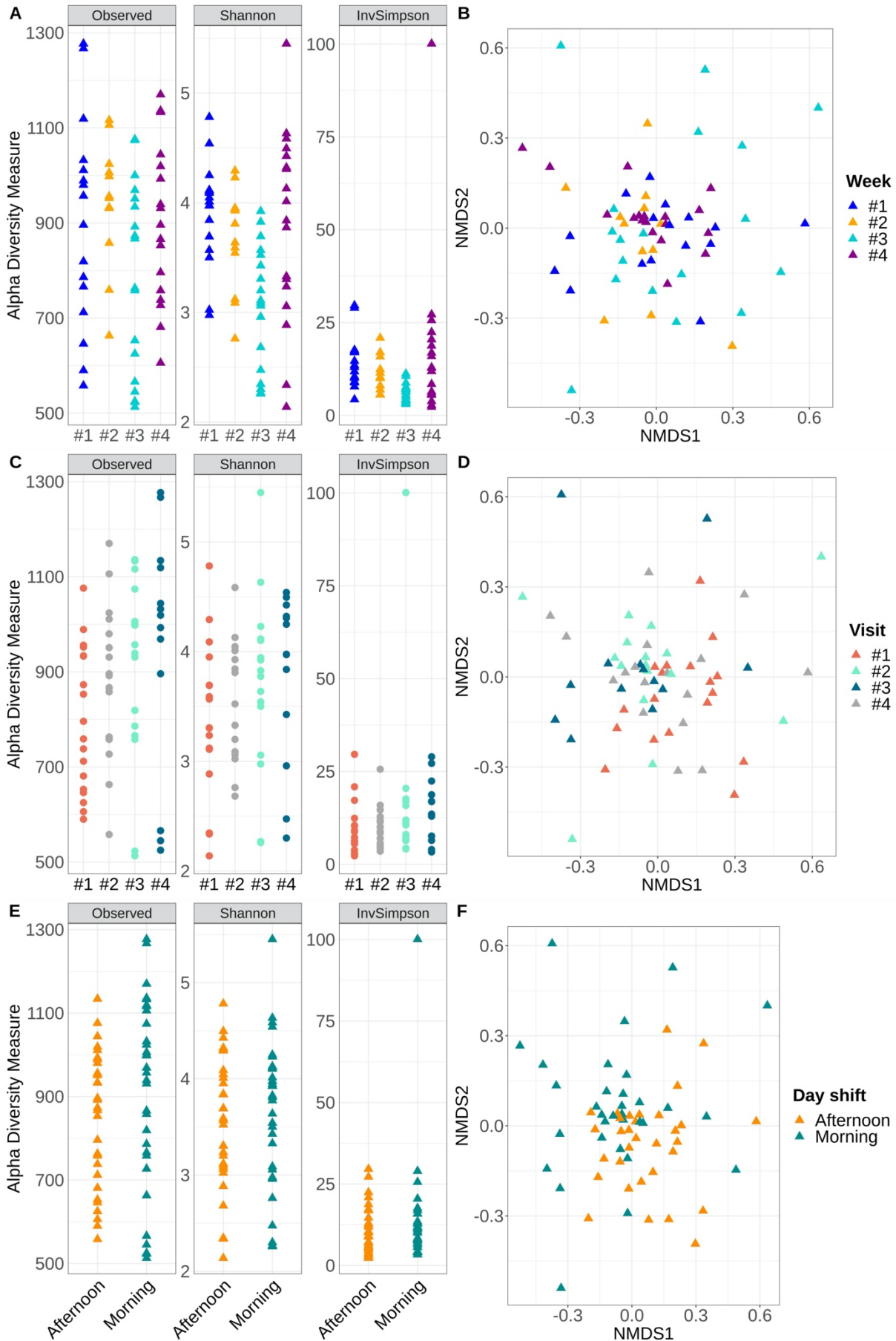


Figure 4. – (Supplementary) Comparison of alpha diversity measures of samples collected from the bottom (n = 64) areas before cooling according to week (A), visit (C), and work shift (E) using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the microbiota structure of the pig carcass surface, calculated with the Bray-Curtis index, and comparing microbiota of samples collected from the bottom (n = 64) areas before cooling according to week (B), visit (D) and work shift (F).

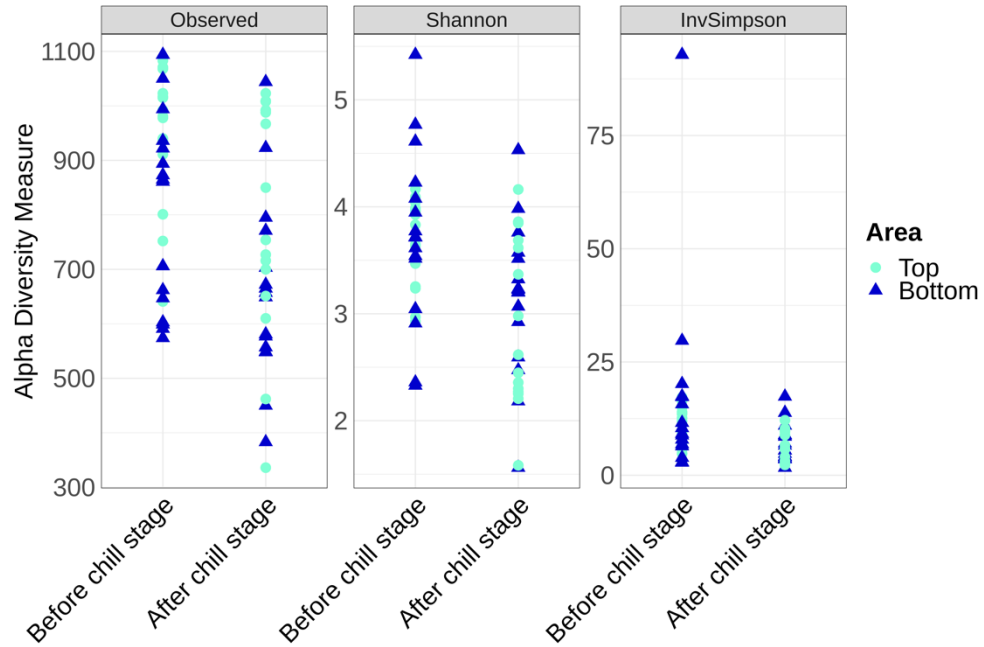


Figure 5. – (Supplementary) Alpha diversity measure samples collected from the top (n = 16) and bottom (n = 16) areas before and after the cooling stage using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices on 16 batches of pig carcasses.

References

1. OECD; Food and Agriculture Organization of the United Nations *OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031*; OECD-FAO Agricultural Outlook; OECD, 2022; ISBN 978-92-64-58870-7.
2. Borch, E.; Nesbakken, T.; Christensen, H. Hazard Identification in Swine Slaughter with Respect to Foodborne Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *30*, 9–25, doi:10.1016/0168-1605(96)00988-9.
3. Doulgeraki, A.I.; Ercolini, D.; Villani, F.; Nychas, G.-J.E. Spoilage Microbiota Associated to the Storage of Raw Meat in Different Conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 130–141, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020.
4. Gram, L.; Ravn, L.; Rasch, M.; Bruhn, J.B.; Christensen, A.B.; Givskov, M. Food Spoilage—Interactions between Food Spoilage Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *78*, 79–97, doi:10.1016/S0168-1605(02)00233-7.
5. Rivas, T.; Vizcaíno, J.A.; Herrera, F.J. Microbial Contamination of Carcasses and Equipment from an Iberian Pig Slaughterhouse. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 1670–1675, doi:10.4315/0362-028X-63.12.1670.
6. Mrdovic, B.; Raseta, M.; Brankovic-Lazic, I.; Milijasevic, M.; Baltic, B.; Nastasijevic, I. Pigs and Cattle Slaughter Process Hygiene in a Large-Scale and Small-Scale Abattoir: A Report from One County in Serbia. *Sci. J. QuotMeat Technol.* **2018**, *58*, 65–72.
7. Zwirzitz, B.; Wetzels, S.U.; Dixon, E.D.; Stessl, B.; Zaiser, A.; Rabanser, I.; Thalguter, S.; Pinior, B.; Roch, F.-F.; Strachan, C.; et al. The Sources and Transmission Routes of Microbial Populations throughout a Meat Processing Facility. *Npj Biofilms Microbiomes* **2020**, *6*, 26, doi:10.1038/s41522-020-0136-z.
8. Bonardi, S. *Salmonella* in the Pork Production Chain and Its Impact on Human Health in the European Union. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 1513–1526, doi:10.1017/S095026881700036X.
9. Arguello, H.; Álvarez-Ordoñez, A.; Carvajal, A.; Rubio, P.; Prieto, M. Role of Slaughtering in Salmonella Spreading and Control in Pork Production. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 899–911, doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-404.
10. Pesciaroli, M.; Cucco, L.; De Luca, S.; Massacci, F.R.; Maresca, C.; Medici, L.; Paniccià, M.; Scoccia, E.; Staffolani, M.; Pezzotti, G.; et al. Association between Pigs with High Caecal Salmonella

Loads and Carcass Contamination. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *242*, 82–86, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.021.

11. Rizzotto, D.; Montes, J.H.; Kich, J.D.; Peripolli, V.; Bianchi, I.; Oliveira Júnior, J.M. de; Duval, E.H.; Schwegler, E.; Moreira, F. Salmonella Enterica and Enterobacteria in Pig Carcasses Processed on Different Slaughter Days. *Pesqui. Agropecuária Bras.* **2022**, *57*, e02813, doi:10.1590/s1678-3921.pab2022.v57.02813.

12. Smid, J.H.; van Hoek, A.H.A.M.; Aarts, H.J.M.; Havelaar, A.H.; Heres, L.; de Jonge, R.; Pielaat, A. Quantifying the Sources of Salmonella on Dressed Carcasses of Pigs Based on Serovar Distribution. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 1425–1431, doi:10.1016/j.meatsci.2013.12.002.

13. Biasino, W.; De Zutter, L.; Mattheus, W.; Bertrand, S.; Uyttendaele, M.; Van Damme, I. Correlation between Slaughter Practices and the Distribution of Salmonella and Hygiene Indicator Bacteria on Pig Carcasses during Slaughter. *Food Microbiol.* **2018**, *70*, 192–199, doi:10.1016/j.fm.2017.10.003.

14. Deane, A.; Murphy, D.; Leonard, F.C.; Byrne, W.; Clegg, T.; Madigan, G.; Griffin, M.; Egan, J.; Prendergast, D.M. Prevalence of Salmonella Spp. in Slaughter Pigs and Carcasses in Irish Abattoirs and Their Antimicrobial Resistance. *Ir. Vet. J.* **2022**, *75*, 4, doi:10.1186/s13620-022-00211-y.

15. Ghafir, Y.; China, B.; Dierick, K.; De Zutter, L.; Daube, G. Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef, Pork, and Poultry Meats in Belgium. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 35–45, doi:10.4315/0362-028X-71.1.35.

16. Pala, C.; Tedde, T.; Salza, S.; Uda, M.T.; Lollai, S.; Carboni, V.; Fadda, A.; Marongiu, E.; Virgilio, S. Epidemiological Survey on the Prevalence of Salmonella Spp. in the Sardinian Pig Production Chain, Using Real-Time PCR Screening Method. *Ital. J. Food Saf.* **2019**, *8*, doi:10.4081/ijfs.2019.7843.

17. Piras, F.; Fois, F.; Mazza, R.; Putzolu, M.; Delogu, M.L.; Lochi, P.G.; Pani, S.P.; Mazzette, R. Salmonella Prevalence and Microbiological Contamination of Pig Carcasses and Slaughterhouse Environment. *Ital. J. Food Saf.* **2014**, *3*, doi:10.4081/ijfs.2014.4581.

18. Primavilla, S.; Roila, R.; Zicavo, A.; Ortenzi, R.; Branciarri, R.; Shtylla Kika, T.; Valiani, A.; Ranucci, D. Salmonella Spp. in Pigs Slaughtered in Small and Medium-Sized Abattoirs in Central

Italy: Preliminary Results on Occurrence and Control Strategies. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 7600, doi:10.3390/app11167600.

19. USDA Annex U: USDA Performance Standards for Salmonella Available online: <https://inspection.canada.ca/exporting-food-plants-or-animals/food-exports/requirements/export-requirements-for-meat-and-poultry-products/annex-u/eng/1371663720505/1371663913885>.

20. Remenant, B.; Jaffrès, E.; Dousset, X.; Pilet, M.-F.; Zagorec, M. Bacterial Spoilers of Food: Behavior, Fitness and Functional Properties. *Food Microbiol.* **2015**, *45*, 45–53, doi:10.1016/j.fm.2014.03.009.

21. Gooch, D.; Bucknell, D.; LaPlain, D.; Dent, B.; Whitehead, P.; Felfel, A.; Nikkel, L.; Maguire, M. The Avoidable Crisis of Food Waste: Technical Report; Value Chain Management International and Second Harvest; Ontario, Canada. 2019.

22. Nychas, G.-J.E.; Skandamis, P.N.; Tassou, C.C.; Koutsoumanis, K.P. Meat Spoilage during Distribution. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 77–89, doi:10.1016/j.meatsci.2007.06.020.

23. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Growth of Spoilage Bacteria during Storage and Transport of Meat. *EFSA J.* **2016**, *14*, doi:10.2903/j.efsa.2016.4523.

24. Regulation (EC) No 2073/2005 Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs (Text with EEA Relevance). *Off. J. Eur. Union. Off. J. Eur. Union* 2005.

25. FSIS Guideline: Modernization of Swine Slaughter Inspection - Developing Microbiological Sampling Programs in Swine Slaughter Establishments. Guideline ID : IDFSIS-GD-2019-0005. Issue Date : September 2019. 2019.

26. Spescha, C.; Stephan, R.; Zweifel, C. Microbiological Contamination of Pig Carcasses at Different Stages of Slaughter in Two European Union–Approved Abattoirs. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 2568–2575, doi:10.4315/0362-028X-69.11.2568.

27. Zweifel, C.; Fischer, R.; Stephan, R. Microbiological Contamination of Pig and Cattle Carcasses in Different Small-Scale Swiss Abattoirs. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 225–231, doi:10.1016/j.meatsci.2007.06.025.

28. Bolton, D.J.; Pearce, R.A.; Sheridan, J.J.; Blair, I.S.; McDowell, D.A.; Harrington, D. Washing and Chilling as Critical Control Points in Pork Slaughter Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92*, 893–902, doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01599.x.
29. Wheatley, P.; Giotis, E.S.; McKeivitt, A.I. Effects of Slaughtering Operations on Carcass Contamination in an Irish Pork Production Plant. *Ir. Vet. J.* **2014**, *67*, 1, doi:10.1186/2046-0481-67-1.
30. Peruzzy, M.F.; Houf, K.; Joossens, M.; Yu, Z.; Proroga, Y.T.R.; Murru, N. Evaluation of Microbial Contamination of Different Pork Carcass Areas through Culture-Dependent and Independent Methods in Small-Scale Slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *336*, 108902, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108902.
31. Van Ba, H.; Seo, H.-W.; Seong, P.-N.; Kang, S.-M.; Cho, S.-H.; Kim, Y.-S.; Park, B.-Y.; Moon, S.-S.; Kang, S.-J.; Choi, Y.-M.; et al. The Fates of Microbial Populations on Pig Carcasses during Slaughtering Process, on Retail Cuts after Slaughter, and Intervention Efficiency of Lactic Acid Spraying. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *294*, 10–17, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.015.
32. Braley, C.; Fravallo, P.; Gaucher, M.-L.; Larivière-Gauthier, G.; Shedleur-Bourguignon, F.; Longpré, J.; Thibodeau, A. Similar Carcass Surface Microbiota Observed Following Primary Processing of Different Pig Batches. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 849883, doi:10.3389/fmicb.2022.849883.
33. Casaburi, A.; Piombino, P.; Nychas, G.-J.; Villani, F.; Ercolini, D. Bacterial Populations and the Volatilome Associated to Meat Spoilage. *Food Microbiol.* **2015**, *45*, 83–102, doi:10.1016/j.fm.2014.02.002.
34. Jagadeesan, B.; Gerner-Smidt, P.; Allard, M.W.; Leuillet, S.; Winkler, A.; Xiao, Y.; Chaffron, S.; Van Der Vossen, J.; Tang, S.; Katase, M.; et al. The Use of next Generation Sequencing for Improving Food Safety: Translation into Practice. *Food Microbiol.* **2019**, *79*, 96–115, doi:10.1016/j.fm.2018.11.005.
35. Jakobsen, A.M.; Bahl, M.I.; Buschhardt, T.; Hansen, T.B.; Al-Soud, W.A.; Brejnrod, A.D.; Sørensen, S.J.; Nesbakken, T.; Aabo, S. Bacterial Community Analysis for Investigating Bacterial Transfer from Tonsils to the Pig Carcass. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *295*, 8–18, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.003.

36. Schloss, P.D.; Wescott, S.L.; Ryabin, T. Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities 299AD.
37. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584, doi:10.7717/peerj.2584.
38. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* **2013**, *8*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0061217.
39. Oksanen, J.; Blanchet, F.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; et al Vegan: Community Ecology Package. R Package. 2020.
40. Zdolec, N.; Kotsiri, A.; Houf, K.; Alvarez-Ordóñez, A.; Blagojevic, B.; Karabasil, N.; Salines, M.; Antic, D. Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Interventions Applied during Primary Processing to Reduce Microbial Contamination on Pig Carcasses. *Foods* **2022**, *11*, 2110, doi:10.3390/foods11142110.
41. Tomović, V.M.; Petrović, L.S.; Džinić, N.R. Effects of Rapid Chilling of Carcasses and Time of Deboning on Weight Loss and Technological Quality of Pork Semimembranosus Muscle. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 1188–1193, doi:10.1016/j.meatsci.2008.05.013.
42. Lenahan, M.; Crowley, H.; O'Brien, S.B.; Byrne, C.; Sweeney, T.; Sheridan, J.J. The Potential Use of Chilling to Control the Growth of *Enterobacteriaceae* on Porcine Carcasses and the Incidence of *E. Coli* O157:H7 in Pigs. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106*, 1512–1520, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04112.x.
43. Pearce, R.A.; Bolton, D.J.; Sheridan, J.J.; McDowell, D.A.; Blair, I.S.; Harrington, D. Studies to Determine the Critical Control Points in Pork Slaughter Hazard Analysis and Critical Control Point Systems. *Int J Food Microbiol* 2004, *90*:331-339.
44. Roasto, M.; Bonardi, S.; Mäesaar, M.; Alban, L.; Gomes-Neves, E.; Vieira-Pinto, M.; Vågsholm, I.; Elias, T.; Lindegaard, L.L.; Blagojevic, B. Salmonella Enterica Prevalence, Serotype Diversity, Antimicrobial Resistance and Control in the European Pork Production Chain. *Trends Food Sci. Technol.* **2023**, *131*, 210–219, doi:10.1016/j.tifs.2022.12.007.

45. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2017. *EFSA J.* **2018**, *16*, doi:10.2903/j.efsa.2018.5500.
46. Li, X.-J.; Wang, M.; Xue, Y.; Duan, D.; Li, C.; Han, X.; Wang, K.; Qiao, R.; Li, X.-L. Identification of Microflora Related to Growth Performance in Pigs Based on 16S rRNA Sequence Analyses. *AMB Express* **2020**, *10*, 192, doi:10.1186/s13568-020-01130-3.
47. Iulietto, M.F.; Sechi, P.; Borgogni, E.; Cenci-Goga, B.T. Meat Spoilage: A Critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. *Ital. J. Anim. Sci.* **2015**, *14*, 4011, doi:10.4081/ijas.2015.4011.
48. López-Serrano, S.; Galofré-Milà, N.; Costa-Hurtado, M.; Pérez-de-Rozas, A.M.; Aragon, V. Heterogeneity of *Moraxella* Isolates Found in the Nasal Cavities of Piglets. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 28, doi:10.1186/s12917-020-2250-9.
49. Gill, C.O.; Bryant, J. The Contamination of Pork with Spoilage Bacteria during Commercial Dressing, Chilling and Cutting of Pig Carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* **1992**, *16*, 51–62, doi:10.1016/0168-1605(92)90125-M.
50. Stellato, G.; La Storia, A.; De Filippis, F.; Borriello, G.; Villani, F.; Ercolini, D. Overlap of Spoilage-Associated Microbiota between Meat and the Meat Processing Environment in Small-Scale and Large-Scale Retail Distributions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 4045–4054, doi:10.1128/AEM.00793-16.
51. Bridier, A.; Le Grandois, P.; Moreau, M.-H.; Prénom, C.; Le Roux, A.; Feurer, C.; Soumet, C. Impact of Cleaning and Disinfection Procedures on Microbial Ecology and Salmonella Antimicrobial Resistance in a Pig Slaughterhouse. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12947, doi:10.1038/s41598-019-49464-8.
52. Sheridan, J.J. SOURCES OF CONTAMINATION DURING SLAUGHTER AND MEASURES FOR CONTROL. *J. Food Saf.* **1998**, *18*, 321–339, doi:10.1111/j.1745-4565.1998.tb00223.x.
53. Bridier, A.; Sanchez-Vizueté, P.; Guilbaud, M.; Piard, J.-C.; Naïtali, M.; Briandet, R. Biofilm-Associated Persistence of Food-Borne Pathogens. *Food Microbiol.* **2015**, *45*, 167–178, doi:10.1016/j.fm.2014.04.015.

54. Spescha, C.; Stephan, R.; Zweifel, C. Microbiological Contamination of Pig Carcasses at Different Stages of Slaughter in Two European Union–Approved Abattoirs. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 2568–2575, doi:10.4315/0362-028X-69.11.2568.
55. Wei, Q.; Wang, X.; Sun, D.-W.; Pu, H. Rapid Detection and Control of Psychrotrophic Microorganisms in Cold Storage Foods: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *86*, 453–464, doi:10.1016/j.tifs.2019.02.009.

Chapitre 6 – Slight temperature deviation during a 56-day storage period does not affect the microbiota of fresh vacuum-packed pork loins

Charlotte Braley^{1,2*}, Marie-Lou Gaucher^{1,2,3,5}, Philippe Fravallo^{3,4}, Fanie Shedleur-Bourguignon^{1,2}, Jessie Longpré⁶, Alexandre Thibodeau^{1,2,3,5}

¹Chaire de Recherche en Salubrité des Viandes (CRSV), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

²Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

³Groupe de Recherche et d'Enseignement en Salubrité Alimentaire (GRESA), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

⁴Le Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM), Paris, France

⁵Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole (CRIPA), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

⁶F. Ménard, Division d'Olymel s.e.c., Ange-Gardien, QC, Canada

* Correspondence : braley.braley@umontreal.ca (C.B.); alexandre.thibodeau@umontreal.ca (A.T.)

Cet article a été publié le 19 avril 2023 dans le journal *Foods*

Author Contributions :

Conceptualization, A.T.; formal analysis, C.B.; funding acquisition, A.T.; investigation, A.T.; methodology, C.B. and A.T.; project administration, J.L. and A.T.; resources, M.-L.G., P.F., F.S.-B., J.L. and A.T.; software, C.B. and A.T.; supervision, A.T.; validation, A.T.; visualization, C.B.; writing—original draft, C.B.; writing—review and editing, C.B., M.-L.G., P.F., F.S.-B., J.L. and A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Abstract

It is profitable to export fresh meat overseas, where it is often regarded as a premium commodity. Meeting this demand for fresh meat, however, necessitates long export times, during which uncontrolled temperature increases can affect the microbiological quality of the meat and thereby, reduce shelf life or compromise food safety. To study the impact of temperature deviations on microbial community composition and diversity, we used 16S rRNA gene sequencing for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection to describe the surface microbiota of eight batches of vacuum-packed loins stored at $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (control) for 56 days and subjected to a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ or $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature deviation for a few hours (mimicking problems regularly encountered in the industry) at day 15 or 29. The presence of pathogens was negligible. The applied temperature deviations were not associated with different microbiota. Sequencing analysis showed the presence of *Yersinia*, an unexpected pathogen, and relative abundance increased in the groups subjected to temperature deviations. Over time, *Lactobacillales_unclassified* genus became the main constituent of the microbiota of vacuum-packed pork loins. Although the microbiota of the eight batches appeared similar at the beginning of storage, differences were revealed after 56 days, suggesting unequal aging of the microbiota.

Keywords : vacuum-packed pork loin, microbiota, storage temperature, temperature deviation, batch production

Introduction

In 2021, world pig meat production reached more than 122 million tons. In this global market, Canada exported approximately 1.49 million metric tons of pig meat [1] to more than 90 countries, with China being the largest export market for Canadian pork meat products. The Asian market (China and Japan) was 41% of Canada's exports, which represents a CAD 4 billion dollar market [2]. Since fresh pork meat products are considered premium commodities by consumers, exporting fresh meat to overseas markets is more profitable than shipping frozen goods. However, maintaining constant control over product temperature for such a long period of time remains a challenge since the organoleptic and microbiological quality of these fresh meat products can be hampered by the increase in storage temperature during long exports [3,4,5].

To limit this problem, most of this exported fresh pork meat is shipped to remote destinations at temperatures just above the freezing point of meat (-1.5 ± 0.5 °C) [6,7]. This extends the product shelf life as much as four times compared to storage at 4 °C [8]. To further increase shelf life, fresh pork meat is packaged under vacuum. Vacuum packaging is a well-documented method for enhancing fresh food preservation. It improves flavor, juiciness, and tenderness of meats [9]. Oxygen removal coupled with storage at subzero temperatures has proven to be very effective at slowing bacterial growth and thereby reducing and slowing spoilage, thus extending product shelf life [10].

Spoilage can be defined by a product deterioration beyond consumer acceptance and is mostly the cause of extensive microbial proliferation [5,11]. Aerobic spoilage bacteria such as *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. were observed to be dominant in refrigerated pork meat products [5,12,13]. Under refrigerated vacuum-packaged conditions, there was a shift from aerobic spoilage bacteria to facultative anaerobic bacteria [14]. Indeed, lactic acid bacteria (LAB) (such as *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc* spp., and *Carnobacterium* spp.) and *Brochothrix thermosphacta* were found to be major contributors to meat spoilage and prevailed in pork meat stored at -2 °C [12] or in vacuum-packed pork meat products stored at 4 °C [15]. The spoilage potential of LAB depends on the strain and the quantity of bacteria contaminating the product [5,16]. In the case of overgrowth, LAB produce metabolites such as ethanol and acetic acid, with consequent off-odors, slime, gas formation, and meat

discoloration—all typical alterations observable under vacuum packaging [14]. According to several studies [17,18,19,20], the level of LAB contamination, specially *Carnobacterium*, increased over a 20-day storage period under refrigeration. Storage temperatures exceeding 5 °C were correlated with increasing levels of contamination by *Enterobacteriaceae* (such as *Pseudomonas* and *Aeromonas*) [20], clearly showing that storage temperature modified the meat bacterial populations in vacuum packed meat.

The presence of pathogenic bacteria in fresh meat products is also a concern, as they are responsible for human foodborne infections [21]. The bacterial communities of meat products can contain pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. or *Listeria monocytogenes*, bacterial genus that may be present on fresh pork meat products at the end of processing [22,23,24]. *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* are able to thrive in food processing environments [23,25]. Vacuum packaging of pork meat has been found to reduce pathogen survival. For example, Djordjević et al. [26] observed that *Salmonella* spp. counts decreased by a reduction of 1.5 log CFU/g during storage under vacuum packaging at refrigerated temperatures. However, it has been reported that *L. monocytogenes*, a psychrotrophic bacterium, was able to grow in vacuum packaged products, especially in ready-to-eat meat [27,28].

Current knowledge on the microbial populations that develop during storage under different vacuum packaging conditions were mainly generated using culture-dependent methods [15,17,29,30,31]. These methods were not able to describe the entire composition of the microbial community. Modern molecular techniques, such as 16S rRNA amplicon sequencing, allow for a deeper characterization of the microbiota using a single analysis and are especially useful for characterizing the presence of bacteria for which culture is not suitable [32]. A few studies used molecular techniques to describe major bacterial populations on fresh pork and the changes that occurred under vacuum packaging conditions throughout a meat processing facility [12,13,15,31,33,34]. Among them, Zhao et al. [15] described the changes in vacuum-packed pork microbiota stored at 0 °C during 21 days. The authors observed that microbiota was more diverse during the first seven days of storage, dominated by the *Micrococcaceae* (27%) and *Flavobacteriaceae* (33%) families, while at the end of storage, the diversity decreased and was dominated by *Lactobacillaceae* (70%), *Enterobacteraceae* (7%), and *Carnobacterium* (4%).

Moreover, using sequencing methods, few studies observed that the increase in refrigerated temperature storage influenced the microbiota of vacuum-packed pork meat. For example, Bassey et al. [35] observed that *Rhodococcus* and *Bacillus* dominated in vacuum-packed meat stored at 25 °C, at the beginning and at the end of their experiment (20 days), respectively. However, these studies evaluated the impact of a temperature storage conditions in the whole period of sampling. To our knowledge, no studies described the effect of temperature fluctuations (temporary temperature deviation) on the microbiota of vacuum-packed pork. To our knowledge, no research has described the microbiota evolution of vacuum-packed pork products over a period of several weeks under super chilling conditions that mimic overseas exportation, as well as the impact of early or late temperature deviation on the meat microbiota. Moreover, little is known about microbiota variation between pork meat products originating from different pig batches processed in the same facility during overseas shipping.

The objective of this study was to characterize the impact of temperature deviations on the microbiota of vacuum-packed pork loins according to different production batches. To do so, 16S rRNA amplicon sequencing was used, as well as culture-dependent detection of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. In this study, we investigated the possibility that components of the microbiota of vacuum-packed pork loins can be useful indicators of temperature deviations in an assay reproducing possible conditions encountered during the overseas transport of fresh vacuum-packed pork loins.

Materials and methods

Sampling

Fresh vacuum-packed pork loins intended to be sent overseas were collected at a swine slaughterhouse in the province of Quebec, Canada. Vacuum-packed pork loins were stored in commercial refrigerated trailers in the slaughterhouse vicinity. Trailers were kept at $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 56 days, a period representing the maximum time needed for fresh products to arrive and be purchased overseas. A batch of vacuum-packed pork loins was defined as products originating from animals slaughtered at the same time, i.e., during the same morning over 4 consecutive hours of processing activities. Whole packed loins were produced on Mondays or on Fridays. For the Monday samples, carcasses were cooled down for 24 h to reach a final temperature around $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ before packaging, while those produced on the Fridays had a 48 h cooling time. At each sampling time point, 4 batches of loins cooled for 24 h (referred to in this study as Tuesday loins) or 48 h (referred to in this study as Monday loins) before packaging were sampled. The loins were subjected to different storage temperature deviations, mimicking the defect in temperature regulation regularly encountered in the industry: (A) no deviation (control, $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 56 days, (B) a temperature increase of $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 days at day 15, (C) a temperature increase of $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 days at day 29, (D) a temperature increase of $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 6 h at day 15, and (E) a temperature increase of $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 6 h at day 29. Whole unopened loins were sampled at day 1 (after packaging), at day 21 (representing the time when samples would be loaded onto a boat), or at day 56 (representing the maximum period needed for the client to receive the loins overseas) (Figure 1). When temperature deviations were performed, vacuum-packed loins were moved to different trailers at the desired temperature. Temperatures were monitored using a probe located in the middle of each storage trailer, and data were collected by computer for each batch and each condition. For each batch ($n = 8$), six vacuum-packed pork loins at each sampling point ($n = 9$) were used, for a total of 432 vacuum-packed pork loins sampled in this study. For each sample, a vacuum-packed pork loin was opened, and a single sample consisting of a fine slice of 10 g was sterilely taken from the surface of the loin before being transferred directly into a sterile tube that was sent on ice to the laboratory for bacteriological analysis. A second sample of 10 g was also collected in the same way and was stored directly in liquid nitrogen at the slaughterhouse before being kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

at the laboratory until DNA extractions were performed. The sampling area for each loin was randomly selected, apart from the area near the opening, which was never sampled.

Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.

Sample preparation

For *L. monocytogenes*, five grams of meat were transferred into a sterile filter bag (Fisher) containing 45 mL of UVM1 modified broth (Biokar diagnostics, Allonne, France). Samples were mixed for 1 min in a stomacher Smasher™ AESAP1064 (bioMérieux, St. Louis, MO, USA) and thereafter incubated at 30 °C for 48 h. After incubation, 3 mL were transferred into a 15 mL tube containing 1 mL of glycerol, and the tubes were stored at –20 °C. For *Salmonella* spp., 5 g were transferred into a sterile filter bag containing 45 mL of buffered-peptone water (ThermoFisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). After mixing for 1 min using a stomacher, samples were incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, 3 mL were transferred into a 15 mL conical tube containing 1 mL of glycerol, and samples were stored at –20 °C until analysis.

Detection

The detection of *Listeria monocytogenes* was performed as previously described by our group [3636]. Briefly, thawed samples were enriched in Fraser broth (Biokar diagnostic) (24 h, 37 °C) and plated onto the selective chromogenic RAPID'L.Mono (Bio-Rad Laboratories Inc., Montreal, QC, Canada) agar medium. Samples were incubated for 24 h at 37 °C. The presumptive identification of *L. monocytogenes* was performed by the rhamnose fermentation test in Purple Broth Base (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) and identification was performed by a multiplex serogrouping PCR [37]. The detection of *Salmonella* spp. was based on the methods used in previous studies [38,39]. Briefly, thawed samples were cultured on Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar (MSRV) (Biokar diagnostic) as a selective enrichment step and two selective media: Brilliant Green Sulfa (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) agar and Xylose-Lysine-Desoxycholate (Biokar diagnostic) agar. The presumptive identification of two typical colonies from each culture medium was achieved using triple sugar iron agar slants (BD Difco) and urea agar slants (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark).

16S rRNA gene amplicon sequencing

Sample preparation

Ten grams of meat were thawed at room temperature (for less than one hour) before being transferred into a sterile filter bag containing 40 mL of buffer (EDTA, 1 mM; Tris-HCl, 10 mM; NaCl, 8.5 g) and mixed with a stomacher for 1 min. After that, 40 mL of the filtrate was centrifuged for 20 min at 5000 rpm at 4 °C (Sorvall legend X1R centrifuge, Thermo Scientific R, Agawam, MA, USA). The pellet was used for DNA extraction. For control samples (stable temperature) collected on day 1 and 56, DNA extraction was performed individually on the six loins of each batch, accounting for a total of 96 samples. The aim was to compare the microbiota among the eight different batches at the start and the end of the study. For the other conditions, 10 g of meat from 3 samples from the same batch were pooled to reduce analysis numbers.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

DNA was extracted using the HostZEROTM Microbial DNA Kit from Zymo Research, following the manufacturer's instructions. This kit was developed to reduce the amount of contaminating host DNA and therefore enrich bacterial DNA in our samples. DNA quality and concentration were measured using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) and the Qubit 3.0 High Sensitivity broad range assay (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) on a DeNovix (Wilmington, DE, USA) fluorometer. A 291 pb fragment of the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using universal primers 515F_III (5'-ACACTGACGAACTGGTTCTACAAGTGCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R_III (5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGGACTACHUGGGTWTCTAAT-3') (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A 30 µL PCR reaction assessment was performed using the Platinum SuperFi PCR Master Mix (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), as previously described [39]. The PCR program consisted of an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 25 cycles of amplification that included a denaturation step at 95 °C for 30 s, an annealing step at 55 °C for 30 s, an elongation step at 72 °C for 60 s, and a final elongation step of 10 min at 72 °C in a Mastercycler®Nexus PCR (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

Negative control of the DNA extraction (H₂O), as well as a PCR negative (H₂O) and positive control (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard, Zymo Research, Irvine, CA, USA) was included. The PCR positive control contained DNA from eight known bacterial genus with different 16S rRNA gene abundance (18.4% *Lactobacillus*, 17.4% *Bacillus*, 15.5% *Staphylococcus*, 14.1% *Listeria*, 10.4% *Salmonella*, 10.1% *Escherichia*, 9.9% *Enterococcus*, and 4.2% *Pseudomonas*). PCR amplification from samples and positive controls, as well as the absence of amplification from the negative controls, were confirmed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. The purification, barcoding, and sequencing were performed on an Illumina MiSeq 250 paired-end sequencing at Genome Québec Innovation Centre, Montréal, QC, Canada.

Sequencing data processing

The cleaning and the analyzing of the sequences were completed using Mothur [40] version 1.43 following the MiSeq standard operational procedure (https://mothur.org/wiki/miseq_sop/, accessed on 31 July 2021), as previously described [39]. Forward and reverse reads were merged into contigs for each sample. Sequences that contained ambiguities were removed, and identical sequence were merged. The unique sequences were aligned using the SILVA 132 reference database formatted for Mothur (https://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files, accessed on 31 July 2021). Sequences were pre-cluster using the Deblur algorithm and chimeras were removed using VSEARCH [41]. Sequences identified as other than bacteria were removed. The remaining sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) using a unique method yielding a threshold of 100% sequence identity. In this study, the Amplicon Sequence Variant approach (ASV) was used for analysis. Final taxonomic grouping was assigned to these ASVs using the Ribosomal Database Project (RDP) trainset 16 database formatted for Mothur (https://www.mothur.org/wiki/RDP_reference_files, accessed on 31 July 2020).

Sequencing and statistical analyses

Alpha and beta diversity analyses were performed using RStudio (version 1.4.1103), according to the standard operating procedure (SOP) used in a previous study [39]. Data were first rarefied to the lowest number of sequences found in a sample to minimize the impact of uneven sequencing

depth. Alpha diversity indexes (Observed ASV, Shannon and Inverse Simpson) were calculated using the `estimate_richness` function from the R package “Phyloseq” [42], and the Kruskal–Wallis test was performed to compare the alpha diversity measures between conditions. Beta diversity was assessed using the Bray–Curtis and Jaccard distance metrics, based on the relative abundance and on the presence/absence at the genus level, respectively, and visualized using 2D non-metric multidimensional scaling (NMDS). Permutational analysis of molecule variance (PERMANOVA) were conducted using the `ADONIS` function from package “vegan” [43] for the analysis of the microbiota structure and assessed statistical variations between the different conditions. Alpha and beta diversity analysis were performed to investigate the following differences: between different time points; between batches at day 1 and day 56; and between each group at day 1, 21, and 56. Alpha and beta diversity analysis were also conducted to compare samples based on the production day (Monday vs. Tuesday).

Results

Pathogen detection

No sample was found positive for *L. monocytogenes*. Three samples out of the 432 tested were positive for the presence of *Salmonella* spp.: one loin surface sampled from batch #3 and two samples recovered from batch #4, all from the control samples (no temperature deviation) at day 1.

Sequencing data

A total of 18,647,640 sequences were generated from the analysis of the samples collected. After cleaning and processing all the reads—a total of 12,277,943 sequences—were retained and were assigned to 27 phyla, 69 classes, 129 orders, 279 families, and 821 genera. The lowest number of sequences found was 10,176. A mean of 59,153 sequences was obtained per sample, and a total of 18,961 ASV was detected. The positive PCR control was composed of 18.1% *Bacillus*, 14.7% *Lactobacillus*, 14.6% *Staphylococcus*, 12.8% *Escherichia/Shigella*, 12% *Salmonella*, 12.3% *Listeria*, 9.5% *Pseudomonas*, and 6% *Enterococcus*, a composition close to the manufacturer product description. A total of 64 and 100 sequences were obtained for the negative controls of the DNA extraction and the PCR steps, respectively.

Evolution of the microbiota of the control vacuum-packed loins

Bacterial composition

The surface microbiota of control loins (no temperature deviation) evolved in time (Figure 2). At day 1, the vacuum-packed pork loin surface microbiota was dominated by the *Escherichia/Shigella* (58%) genus, followed by *Pseudomonas* (14%) and *Paracoccus* (5%). At day 21, there was a clear shift in the surface microbiota, moving from a dominance of *Escherichia/Shigella* to the *Lactobacillales_unclassified*, which represented over 80% of the microbiota composition. *Carnobacterium* (12%) and *Bacillaceae_unclassified* (8%) genera were also present at day 21. At day 56, mainly *Lactobacillales_unclassified* (75%), *Carnobacterium* (16%), and *Brochothrix* (4%) genera formed the surface microbiota of the analyzed loins. Since the *Lactobacillales_unclassified* was composed of a single ASV, the sequence was analyzed with the online Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in an attempt to refine this ASV taxonomy. *Lactobacillales_unclassified* ASV was identified as *Lactobacillus* spp. (query cover of 100%). Further inspection of the sequencing results revealed that this ASV sequence was present in samples at day 1, but in low relative abundance (3%).

An ASV assigned to *Yersinia*, a potential foodborne pathogen, was also observed. This same ASV was found at day 1 and at day 56 and was identified as *Yersinia enterocolitica* (query cover of 100%) using online BLAST. At day 1, 20.8% (10/48) of the control samples contained *Yersinia* ASV, with a mean relative abundance of 5.9%. At least one sample from each batch contained this ASV, except batch #1 and batch #2, from which it was not identified. At day 56, 37.5% (18/48) of the samples from the control group contained *Yersinia* ASV (with a mean relative abundance of 0.6%), while 45.3% (29/64) of the samples submitted to a temperature increase of 2 °C or 10 °C at day 15 or 29 were positive (with a mean relative abundance of 2.3%).

Alpha and beta diversities

The microbiota alpha and beta diversity of the control samples were compared between production days at each time point (Monday vs. Friday), and no significant differences could be observed (Kruskal–Wallis test $p > 0.05$). This factor was therefore not taken into consideration for downstream analyses. Alpha diversity analysis, which describes the bacterial richness and distribution within a sample, was used to compare the surface of vacuum pork loin microbiota for the control samples at days 1, 21, and 56 as shown in Figure 3. Significant differences were noted for the Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices. Samples from day 1 showed alpha diversity indices significantly higher compared to the day 21 and day 56 samples.

Bray–Curtis and Jaccard distance matrix results showed that the structure and membership of the bacterial community was significantly different (PERMANOVA $p > 0.05$) between the control samples (always at $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) collected on days 1, 21, and 56. Overall, control samples at day 1 and 56 clearly clustered into two different groups (Figure 4), while samples at day 21 were distributed in these two groups. Two-by-two comparisons revealed a significant difference in the microbiota structure between samples collected on day 1 and day 21, as well as between the day 1 and day 56 samples. For samples collected on day 21, a group of samples was close to the results of day 1; these samples were from batch numbers 1, 2, 3, 4, and 8. Another group of day 21 samples was grouped with day 56, and these samples were from batches 4, 5, 6, and 7 (Figure S1).

Impact of production batch on the microbiota of control samples at day 1 and day 56

Alpha and beta diversity were first compared between control samples (constant temperature at $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) collected on day 1 between the eight batches. No significant difference could be observed at day 1 for both alpha (Figure S2) and beta diversity (Figure S1). The same analysis was repeated at day 56. For both alpha and beta diversity, the results showed a significant difference between the 8 batches (Figures S1 and S2). Observed and Shannon index values were higher for batch number 1 and 2 compared to the six other batches. For beta diversity, two-by-two comparison between the eight batches revealed that samples from batch 1 were significantly different from

those collected from batches 6, 7, and 8, while samples from batch 2 were different from those analyzed for batches 3, 4, and 5 (Figure S2). The main bacterial genera observed at day 56 for samples from batches 1 and 2 were *Carnobacterium* and *Brochothrix*, respectively, while batches 3, 4, 5, 6, 7, and 8 were dominated by the *Lactobacillales_unclassified* genus (Figure 5).

Impact of temperature deviations on the vacuum-packed pork loin surface microbiota at day 56

At day 56, the alpha and beta diversity analysis showed that the richness, structure, and membership of the bacterial community were similar (Kruskal–Wallis and PERMANOVA $p > 0.05$) between the control samples and samples that were subjected to a temperature increase of 2 °C or 10 °C, carried out at day 15 (Figure 6 and Figure 7). This same observation was made for the comparison between control samples and samples that were subjected to a temperature increase of 2 °C or 10 °C, carried out at day 29 (Figure 6 and Figure 7). The same observations were observed for samples collected on day 21.

Discussion

In this study, the surface microbiota of vacuum-packed pork loins was analyzed by high-throughput sequencing and culture-dependent methods for pathogens detection in order to determine the evolution of the microbiota over a period of several weeks under refrigerated conditions and with an early or late transient temperature deviation. The objective of this study was to characterize the impact of temperature deviations on the microbiota of vacuum-packed pork loins according to different production batches.

In the present study, the non-detection of *L. monocytogenes* can be explained by an absent or very low initial contamination and/or by the absence of growth during storage, for all conditions tested. In a previous study conducted in the same facility, it was observed that conveyors on which loins travel during processing were never contaminated by *L. monocytogenes*, while conveyors associated with Boston or shoulder meat pieces were contaminated by the pathogen [36]. As a comparison, Saraiva et al. [44] observed that *L. monocytogenes* survived better in refrigerated vacuum-packed meat compared to fresh air-

packed products. Previous studies also reported a prevalence ranging from 15.9% to 33.3% for *L. monocytogenes* in fresh meat [45,46]. As for *Salmonella* spp., few positive samples were detected, and only at day 1. The absence of *Salmonella* spp. at day 56 reinforces previous work results that suggest a decrease in *Salmonella* spp. population on vacuum-packed pork meat with storage duration [26,47].

Microbiota analysis using high-throughput sequencing allowed us to reveal the presence of a *Yersinia* ASV that was further identified as *Yersinia enterocolitica*. It is known that pigs are a reservoir of pathogenic *Y. enterocolitica*, a bacterium responsible for human foodborne illnesses [48]. Moreover, *Y. enterocolitica* is naturally found in the intestinal content and tonsils [49] of pigs, and it is reported that evisceration or the removal of tonsils is a major source of contamination for carcasses during the slaughtering process [48]. The prevalence of *Y. enterocolitica* on pork carcasses reported in previous studies ranged from 2% to 39.7% [23,50,51,52]. In this study, we observed that the *Yersinia* genus was more frequently detected on samples collected on day 56 as compared to day 1. It is known that *Y. enterocolitica* can grow at refrigerated temperatures in vacuum-packed meat products [53].

The microbial composition, diversity, and structure of the surface microbiota of vacuum-packed pork loins were different between days 1 and 21 (when a shift from aerobic to anaerobic bacteria populations was observed) and between day 1 and day 56. These results are in line with those of other authors [15,54], who found that the bacterial community was more diverse at the beginning of storage and tended to decrease over time. As observed by Zhao et al. [15], it is important to notice that the decrease in the diversity of pork vacuum-packed microbiota during storage is not to be interpreted as a decrease of bacterial contamination, as the bacterial count continued to increase.

At day 1, *Escherichia/Shigella* genera was the most abundant bacterial population for each batch, followed by *Pseudomonas*. *Escherichia/Shigella* (*Enterobacteriaceae* family) are coliform bacteria considered indicators of fecal contamination. Their presence usually suggests insufficient sanitary conditions or possible cross-contamination events before the packaging and storage stages [55]. Moreover, we observed that the relative abundance of *Escherichia/Shigella* was greater than *Pseudomonas*, while *Pseudomonas* was the most abundant genus found in fresh

meat or at the beginning of the packaging step and is a major spoilage microorganism of fresh meats associated with environmental contamination [5,18].

On sampling days 21 and 56, *Lactobacillales_unclassified* genus was the main constituent of the vacuum-packed pork loin surface microbiota stored at $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. The order of Lactobacillales includes families that are part of the LAB. In addition to LAB, *Brochothrix thermosphacta* and *Carnobacterium* were also reported as the major component of the microbiota in chilled vacuum-packed pork under extended storage (for up to 21 days) [15,31,33]. In the current study, it is important to note that when the vacuum-packed pork loins were opened, no off-odor, discoloration of the meat, or packaging defect were observed in any pork loin sampled, suggesting that the level of contamination from LAB was below spoiling levels.

In the current study, no differences were recorded for the surface microbiota of pork loins at the first day of the vacuum packaging between batches. Meat processing steps, until packaging, may have standardized the surface carcass microbiota of pigs, as observed in a previous study conducted in the same slaughterhouse [39]. However, in the current study, the microbiota diversity had evolved in these same batches of pigs at day 56. The diversity and structure of the microbiota of two batches were significantly different compared to the six other batches, with *Carnobacterium* being predominate in batch #1 and #2. Other studies [20,56] have reported the dominance of *Carnobacterium* spp. at the end of a long storage period (at $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 months) in vacuum-packaged meat products. In the present study, the microbiota difference observed between batches at day 56 was not anticipated, as all vacuum-packed pork loins had been stored in the same conditions, and no difference between batches could be observed at the start of the study. During the 56-day storage at $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, bacteria may not have grown uniformly between batches due to a combination of factors, such as concentration of nutriment (glucose vs. amino acid), the presence of low molecular weight compounds in meat exudates, pH, packaging atmosphere composition, and environmental production factors (temperature, humidity) [57,58]. Moreover, in the present study, the differences in meat quality and aging might also be responsible for the differences observed between the batches at day 56. Faucitano et al. [59] observed that bacterial counts of total aerobic mesophilic and LAB on fresh vacuum-packed pork loins were similar at the beginning of storage, but evolved differently after 35 days,

according to different meat quality classes. For example, it was reported that dark, firm, dry meat presented higher pH and was the meat quality class most susceptible to spoilage. Another possibility is that the initial bacterial loads may have been different between batches at day 1, although these might have been too slight to be observed by sequencing. These small, undetected differences might have been amplified over the 56 days of storage. The unknown total bacterial load on sampling day 1 is a limiting factor of our study. Complementary data of bacterial enumeration of mesophilic aerobic bacteria, total coliform, *Escherichia coli*, and anaerobic lactic bacteria was given by the slaughterhouse for other loin samples taken at day 56. We observed that different samples within a same batch showed differences between LAB bacterial counts ranging from 10^4 to 10^7 log UFC/g. This suggests the hypothesis that diversity differences observed at day 56 between the batches might be due to different bacterial loads. Indeed, Zhao et al. [12] observed that the diversity of spoiled (with bacterial concentration of bacteria aerobic total $> 6 \log_{10}$ CFU/g) pork meat was significantly lower than fresh (not spoiled) meat stored at -2 °C or 4 °C.

The increase in storage temperature (increase of 2 °C for 2 days and increase of 10 °C for 6 h) at day 15 or day 29, which simulated a defect in temperature regulation, had no recordable influence on the microbiota composition and diversity of vacuum-packed pork loins. On fresh pork meat not under vacuum packaging, Zhao et al. [12] observed that the diversity of spoiled pork meat stored at 10 °C during 72 h was significantly higher than that of fresh pork. In vacuum-packed beef meat, Yang et al. [60] observed that the microbiota was dominated by *Carnobacterium* during 150 days of storage at 4 °C, 2 °C and -1 °C, but only a positive association between *Carnobacterium* and meat stored at 2 °C and -1 °C was found. Moreover, *Lactobacillus* was predominant at the end of storage at 2 °C, as well as at -1 °C, while the abundance of *Lactococcus* increased with storage time at 4 °C. In our study, the absence of an impact of the different temperature deviations on the microbiota could be explained by the fact that the increase in the temperature was not high and/or not long enough to have a significant effect on the meat microbiota. Another possibility is that there was a transient modification of the microbiota that was not covered by the used sampling time points (day 21

and 56). During 56 days of storage, specific members of the microbiota of vacuum-packed pork loins could not be used as biomarkers of temperature deviations.

Conclusions

The present results are specific to this study, which was conducted in a single slaughterhouse on one specific pork product. To our knowledge, this is the first time that a study has described the overall microbiota of vacuum-packed pork loins according to different temperature deviations and production batches in a design corresponding to the transport of fresh meat products overseas. Results showed that the surface microbiota of pork loins at the first day of the vacuum packaging appear similar between batches but had differently evolved between by the end of storage. Our results showed that a slight deviation in temperature, followed by a return to normal, was not sufficient to affect the final bacterial composition and diversity of vacuum-packed pork loins. This study showed that high throughput sequencing is a useful tool that may identify unsuspected problems in a slaughterhouse, such as differences between batches after storage or the presence of unexpected pathogens such as *Yersinia*.

Figures

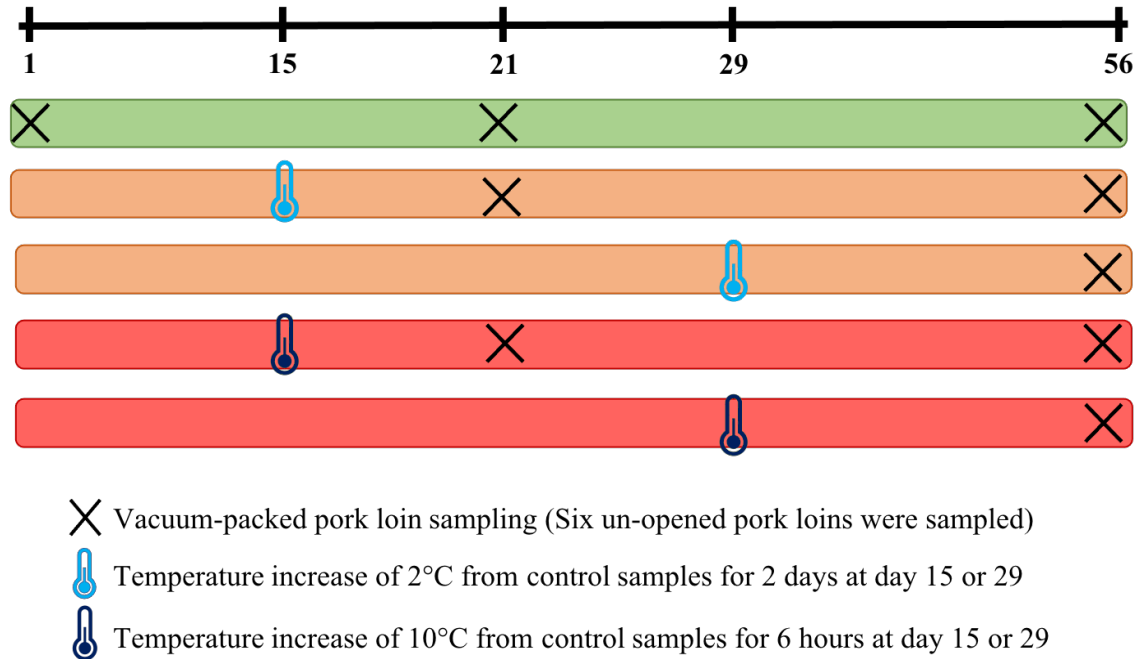


Figure 1. – Sampling of six vacuum-packed pork loins for each condition per batch : control (stable temperature) sampled at day 1, day 21, and day 56; a temperature increase of 2 °C for 2 days at day 15, sampled at day 21 and day 56; a temperature increase of 2 °C for 2 days at day 29, sampled at day 56; a temperature increase of 10 °C for 6 h at day 15, sampled at day 21 and day 56; a temperature increase of 10 °C for 6 h at day 29, sampled at day 56. This sampling was repeated for the 8 batches.

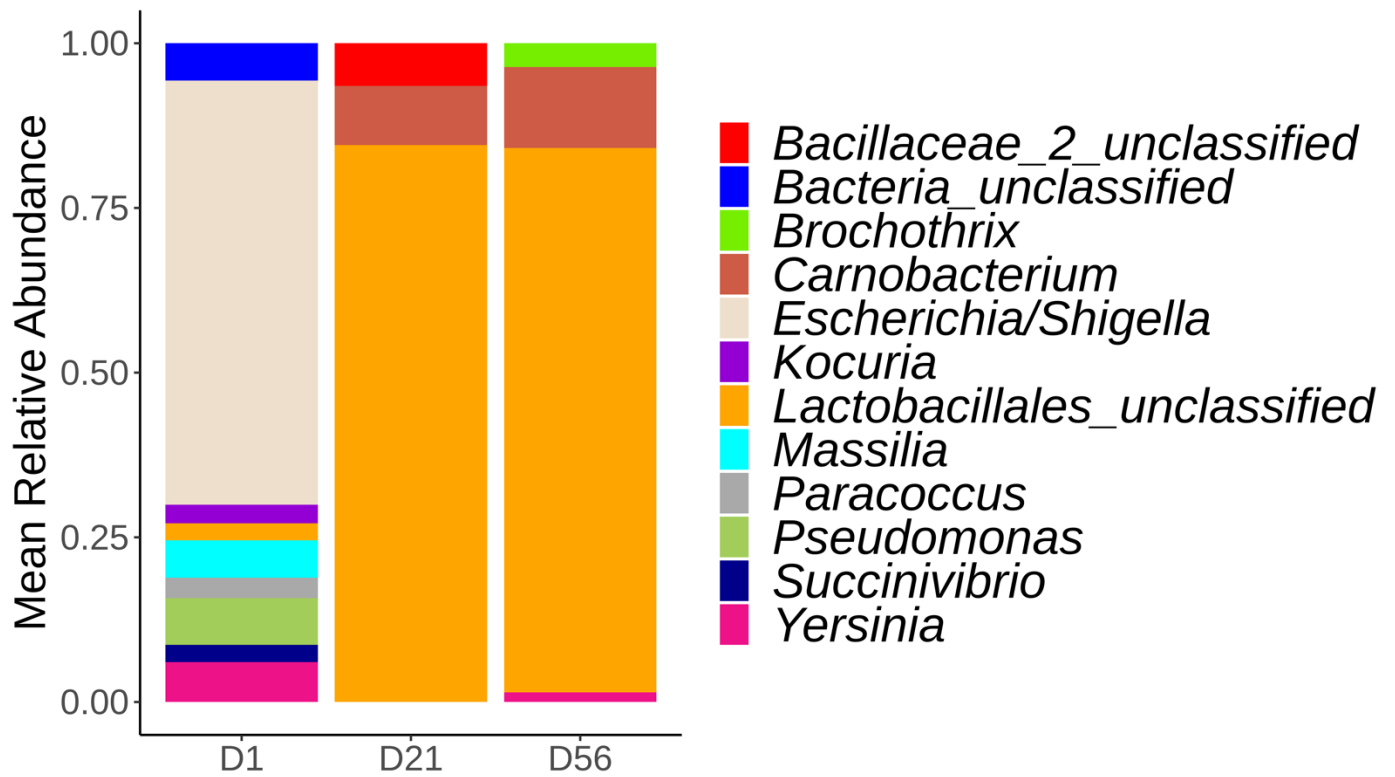


Figure 2. – Relative abundance of the major bacterial genera identified from the vacuum-packed pork loin surface microbiota at day 1, 21, and 56. Only bacterial genera representing at least 2% of the total reads are shown.

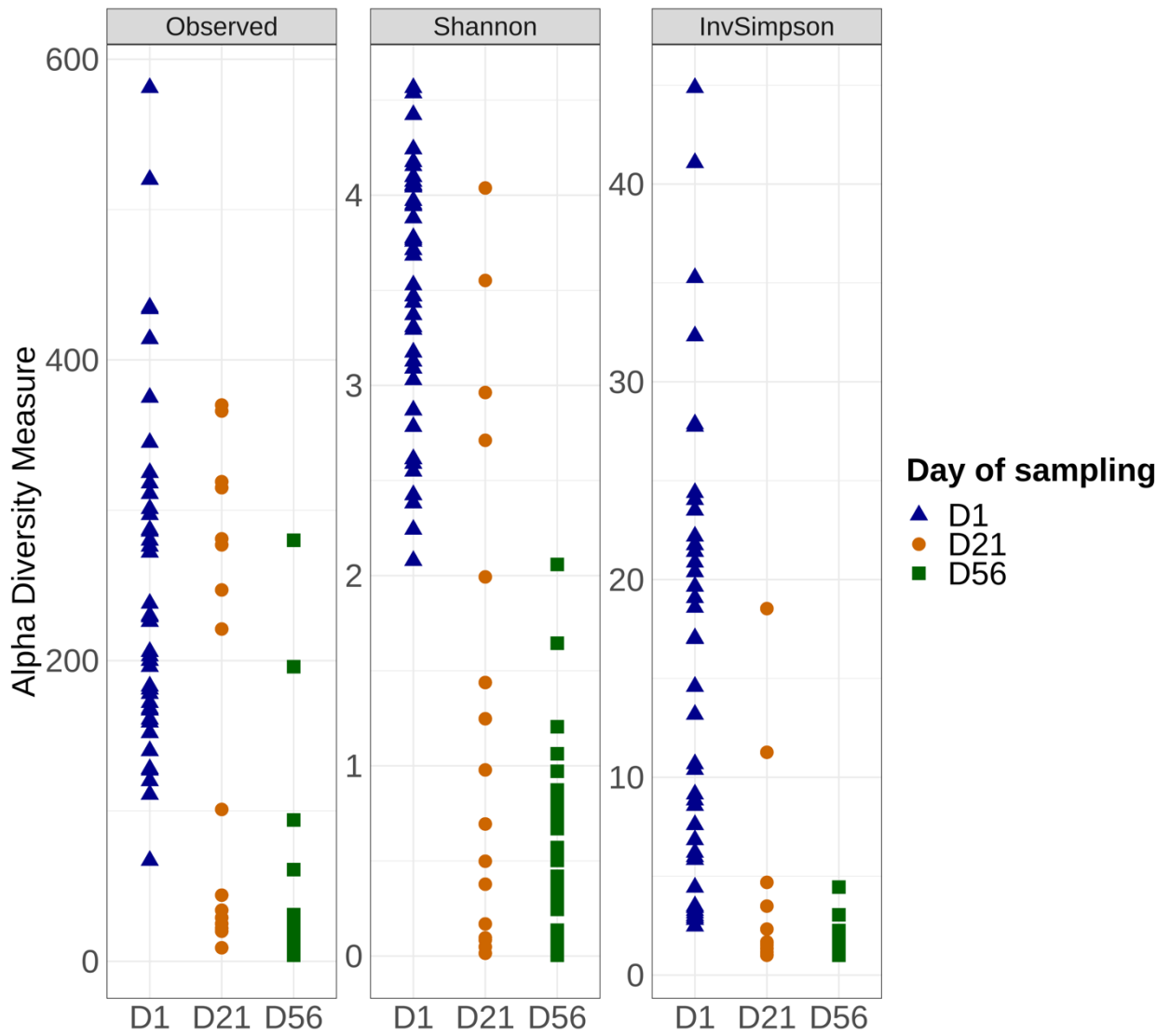


Figure 3. – Alpha diversity measures among the control samples at day 1, 21, and 56 using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices.

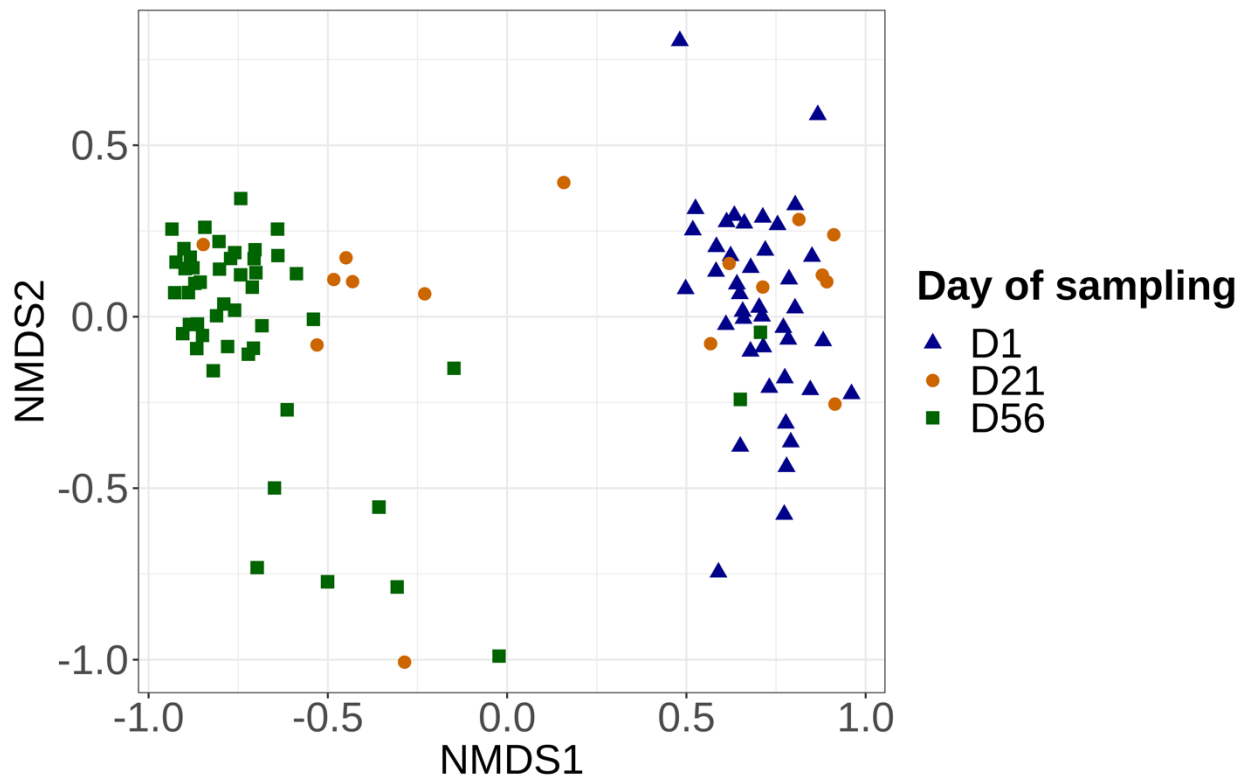


Figure 4. – Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) illustrating beta diversity, calculated with the Bray–Curtis index according to the day of sampling (D1, D21, D56). Significant differences were found in the vacuum-packed surface microbiota between day 1 and 21, as well as day 1 and 56. No significant difference between day 21 and 56 was seen.

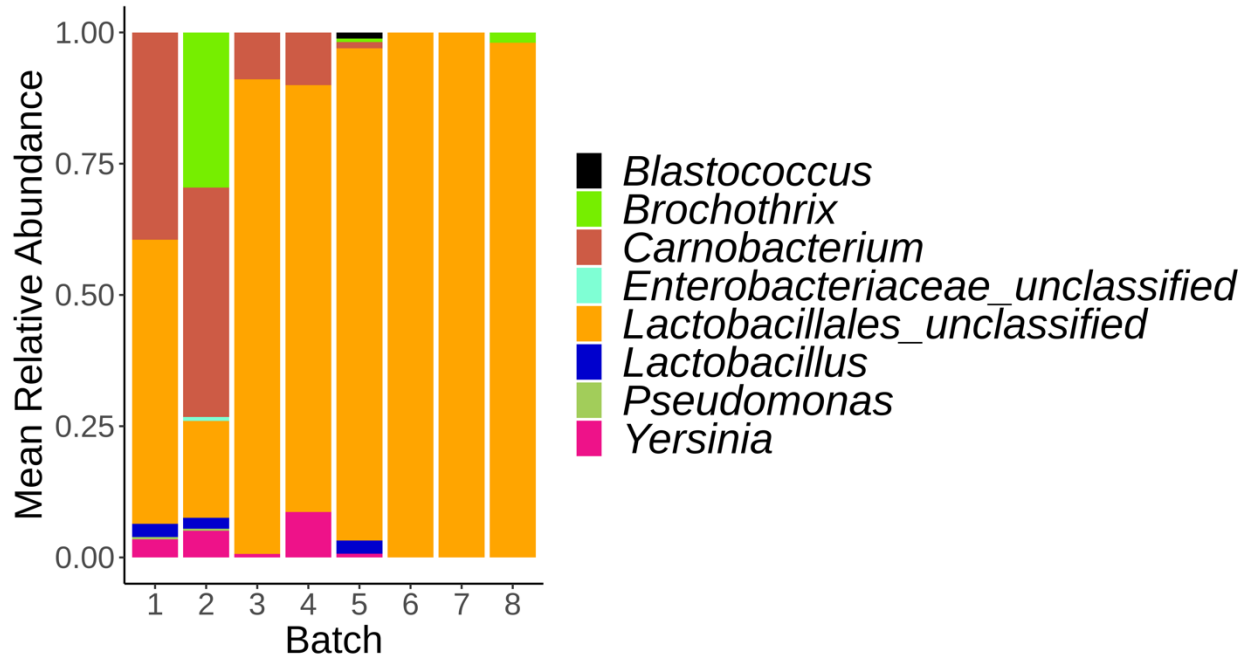


Figure 5. – Relative abundance of the major bacterial genera identified on the vacuum-packed pork loin surface microbiota at day 56 for each batch. Only the bacterial genera representing at least 2% of the total reads are shown.

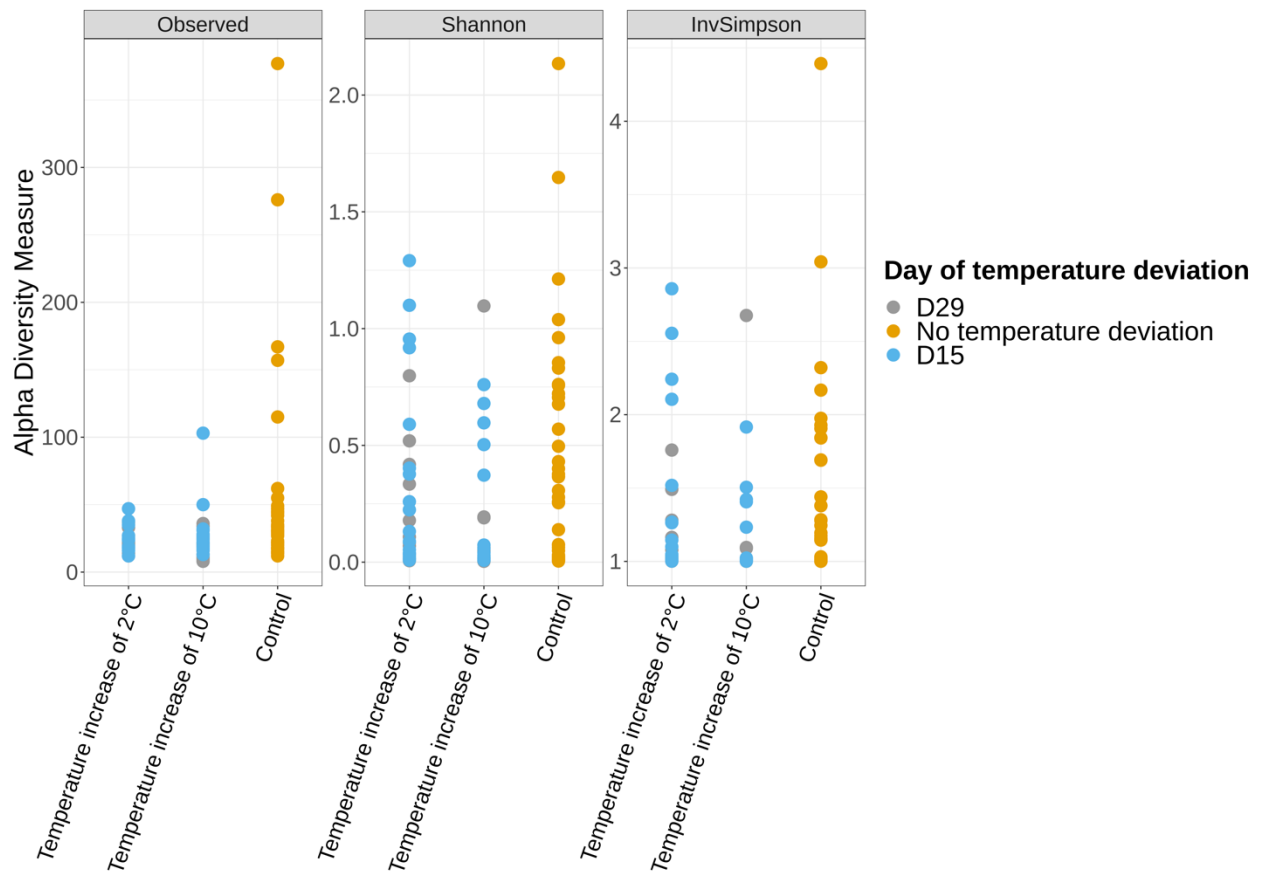


Figure 6. – Alpha diversity measures among the control samples and samples that were subjected to a temperature increase of 2 °C or 10 °C, carried out at day 15 and 29 and sampled at day 56.

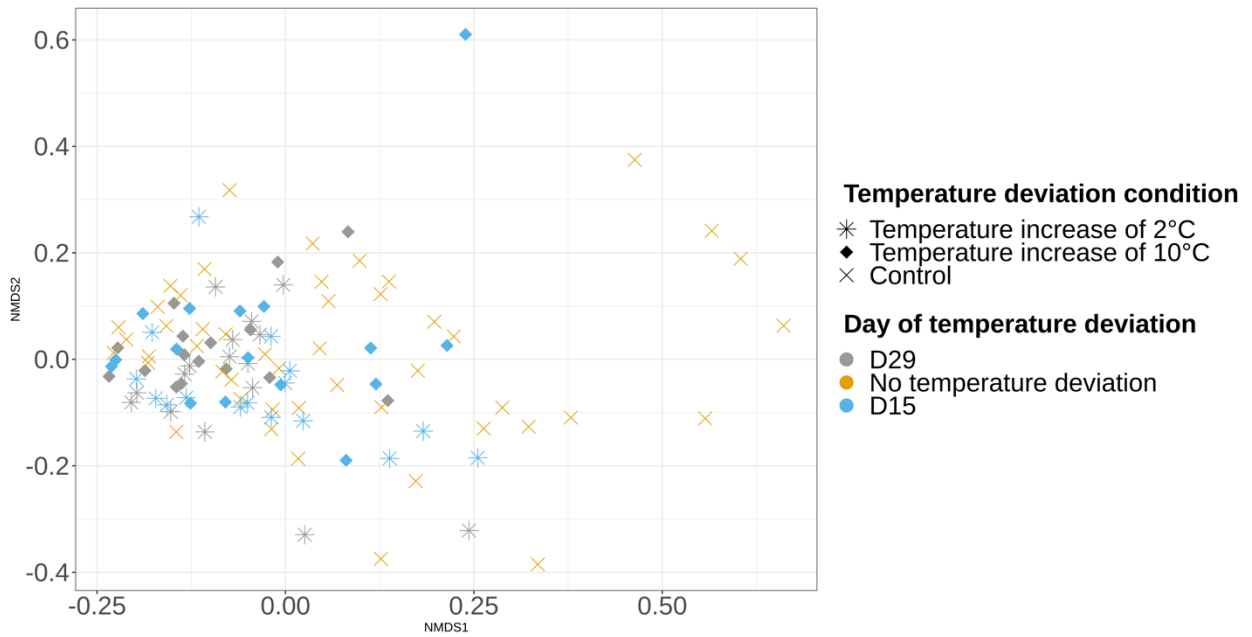


Figure 7. – Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) illustrating microbiota beta diversity, calculated with the Bray–Curtis index, comparing control samples to samples that were subjected to a temperature increase of 2 °C or 10 °C, carried out at day 15 and 29, and sampled at day 56.

Supplementary material

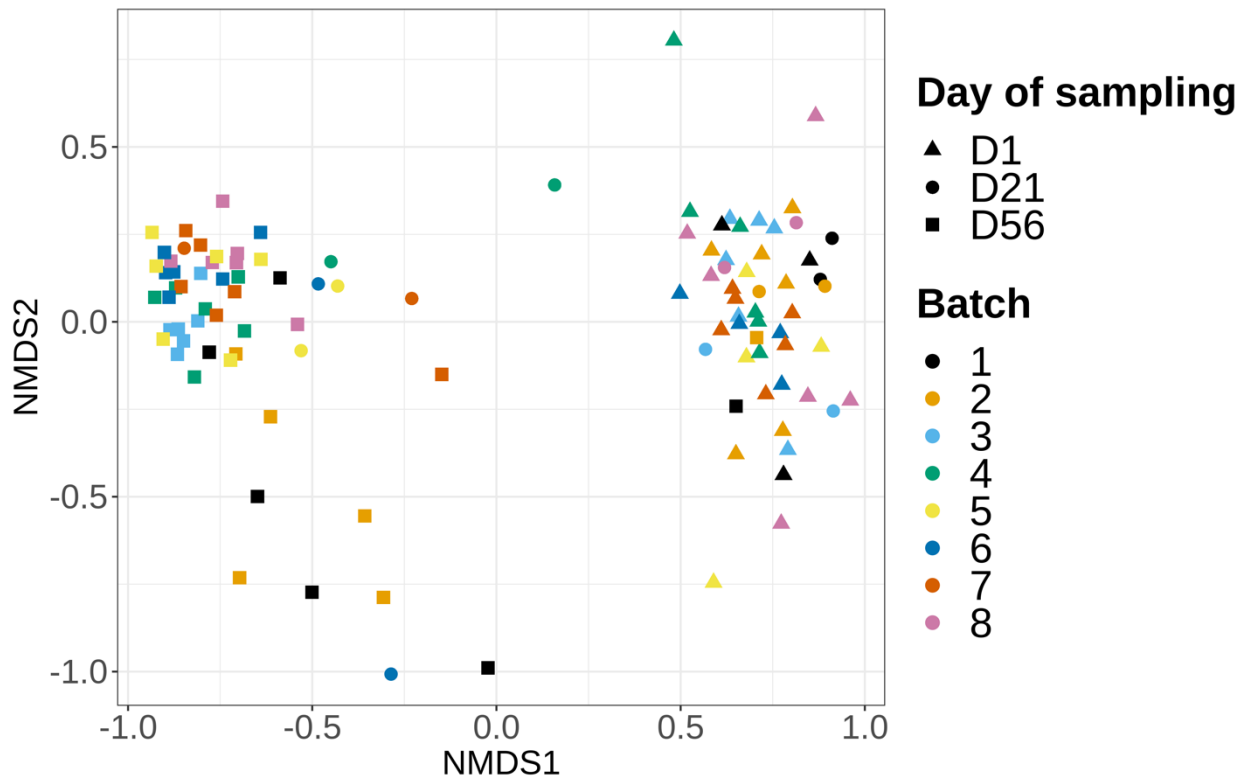


Figure 1. – (Supplementary) Non-metric multidimensional scaling plot (NMDS) illustrating microbiota beta diversity, calculated with the Bray-Curtis, according to batch and day of sampling.

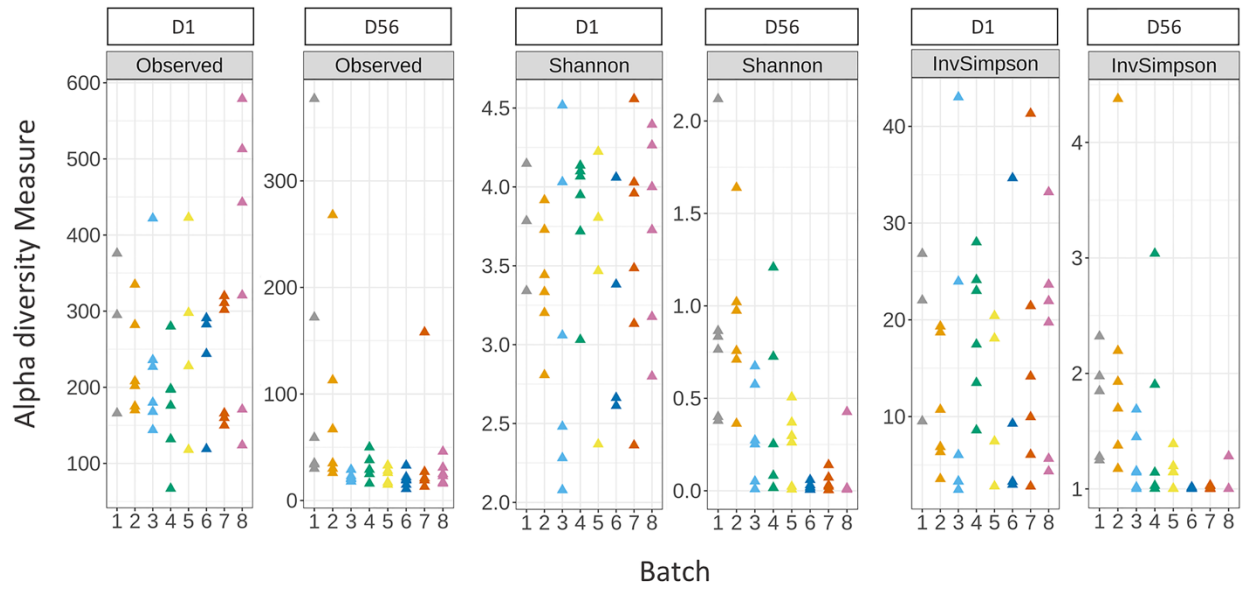


Figure 2. – (Supplementary) Alpha diversity measures among the control samples at day 1 and 56 for the 8 batches of the surface of vacuum pork loin sampled using Observed, Shannon, and Inverse Simpson indices.

References

1. OECD; Food and Agriculture Organization of the United Nations. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2022–2031*; OECD-FAO Agricultural Outlook; OECD: Paris, France, 2022; ISBN 978-92-64-58870-7. [[Google Scholar](#)]
2. Canadian Pork Council. Exportations de Porc En Chine. Available online: <https://www.cpc-ccp.com/francais/canadian-pork-exports-in-china> (accessed on 31 July 2018).
3. Koutsoumanis, K.; Taoukis, P.S. Meat Safety, Refrigerated Storage and Transport: Modeling and Management. In *Improving the Safety of Fresh Meat*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2005; pp. 503–561. ISBN 978-1-85573-955-0. [[Google Scholar](#)]
4. Nychas, G.-J.E.; Skandamis, P.N.; Tassou, C.C.; Koutsoumanis, K.P. Meat Spoilage during Distribution. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 77–89. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Doulgeraki, A.I.; Ercolini, D.; Villani, F.; Nychas, G.-J.E. Spoilage Microbiota Associated to the Storage of Raw Meat in Different Conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 130–141. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. James, S.J.; James, C. Chilling and Freezing of Foods. In *Food Processing*; Clark, S., Jung, S., Lamsal, B., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2014; pp. 79–105. ISBN 978-1-118-84631-5. [[Google Scholar](#)]
7. Bellés, M.; Alonso, V.; Roncalés, P.; Beltrán, J.A. The Combined Effects of Superchilling and Packaging on the Shelf Life of Lamb. *Meat Sci.* **2017**, *133*, 126–132. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Qian, S.; Li, X.; Wang, H.; Sun, Z.; Zhang, C.; Guan, W.; Blecker, C. Effect of Sub-Freezing Storage (–6, –9 and –12 °C) on Quality and Shelf Life of Beef. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *53*, 2129–2140. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Gómez, M.; Lorenzo, J.M. Effect of Packaging Conditions on Shelf-Life of Fresh Foal Meat. *Meat Sci.* **2012**, *91*, 513–520. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Cayuela, J.; Gil, M.; Bañón, S.; Garrido, M. Effect of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on the Quality of Pork Loin. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 316–320. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

11. Casaburi, A.; Piombino, P.; Nychas, G.-J.; Villani, F.; Ercolini, D. Bacterial Populations and the Volatilome Associated to Meat Spoilage. *Food Microbiol.* **2015**, *45*, 83–102. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
12. Zhao, F.; Wei, Z.; Zhou, G.; Kristiansen, K.; Wang, C. Effects of Different Storage Temperatures on Bacterial Communities and Functional Potential in Pork Meat. *Foods* **2022**, *11*, 2307. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Li, N.; Zhang, Y.; Wu, Q.; Gu, Q.; Chen, M.; Zhang, Y.; Sun, X.; Zhang, J. High-Throughput Sequencing Analysis of Bacterial Community Composition and Quality Characteristics in Refrigerated Pork during Storage. *Food Microbiol.* **2019**, *83*, 86–94. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
14. Gram, L.; Ravn, L.; Rasch, M.; Bruhn, J.B.; Christensen, A.B.; Givskov, M. Food Spoilage—Interactions between Food Spoilage Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *78*, 79–97. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
15. Zhao, F.; Zhou, G.; Ye, K.; Wang, S.; Xu, X.; Li, C. Microbial Changes in Vacuum-Packed Chilled Pork during Storage. *Meat Sci.* **2015**, *100*, 145–149. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Chenoll, E.; Macián, M.C.; Elizaquível, P.; Aznar, R. Lactic Acid Bacteria Associated with Vacuum-Packed Cooked Meat Product Spoilage: Population Analysis by RDNA-Based Methods. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102*, 498–508. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Holley, R.A.; Peirson, M.D.; Lam, J.; Tan, K.B. Microbial Profiles of Commercial, Vacuum-Packaged, Fresh Pork of Normal or Short Storage Life. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *97*, 53–62. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Pennacchia, C.; Ercolini, D.; Villani, F. Spoilage-Related Microbiota Associated with Chilled Beef Stored in Air or Vacuum Pack. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 84–93. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Youssef, M.K.; Gill, C.O.; Yang, X. Storage Life at 2 °C or –1,5 °C of Vacuum-Packaged Boneless and Bone-in Cuts from Decontaminated Beef Carcasses: Storage Life of Vacuum-Packaged Beef Primals from Decontaminated Carcasses. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 3118–3124. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

20. Youssef, M.K.; Gill, C.O.; Tran, F.; Yang, X. Unusual Compositions of Microflora of Vacuum-Packaged Beef Primal Cuts of Very Long Storage Life. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 2161–2167. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Self, J.L.; Luna-Gierke, R.E.; Fothergill, A.; Holt, K.G.; Vieira, A.R. Outbreaks Attributed to Pork in the United States, 1998–2015. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 2980–2990. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Baer, A.A.; Miller, M.J.; Dilger, A.C. Pathogens of Interest to the Pork Industry: A Review of Research on Interventions to Assure Food Safety: Pathogens of Pork Industry: A review of research on interventions to assure food safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 183–217. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Bonardi, S.; Bassi, L.; Brindani, F.; D’Incau, M.; Barco, L.; Carra, E.; Pongolini, S. Prevalence, Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* Enterica and *Yersinia* Enterocolitica in Pigs at Slaughter in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *163*, 248–257. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Ricci, A.; Allende, A.; Bolton, D.; Chemaly, M.; Davies, R.; Fernández Escámez, P.S.; Girones, R.; Herman, L.; Koutsoumanis, K.; et al. *Listeria Monocytogenes* Contamination of Ready-to-eat Foods and the Risk for Human Health in the EU. *EFSA J.* **2018**, *16*, e05134. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Nastasijevic, I.; Milanov, D.; Velebit, B.; Djordjevic, V.; Swift, C.; Painset, A.; Lakicevic, B. Tracking of *Listeria Monocytogenes* in Meat Establishment Using Whole Genome Sequencing as a Food Safety Management Tool: A Proof of Concept. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *257*, 157–164. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Djordjević, J.; Bošković, M.; Starčević, M.; Ivanović, J.; Karabasil, N.; Dimitrijević, M.; Lazić, I.B.; Baltić, M.Ž. Survival of *Salmonella* Spp. in Minced Meat Packaged under Vacuum and Modified Atmosphere. *Braz. J. Microbiol.* **2018**, *49*, 607–613. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bērziņš, A.; Terentjeva, M.; Korkeala, H. Prevalence and Genetic Diversity of *Listeria Monocytogenes* in Vacuum-Packaged Ready-to-Eat Meat Products at Retail Markets in Latvia. *J. Food Prot.* **2009**, *72*, 1283–1287. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Kramarenko, T.; Roasto, M.; Keto-Timonen, R.; Mäesaar, M.; Meremäe, K.; Kuningas, M.; Hörman, A.; Korkeala, H. *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Vacuum and Modified Atmosphere Packaged Meat and Fish Products of Estonian Origin at Retail Level. *Food Control* **2016**, *67*, 48–52. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Knox, B.L.; van Laack, R.L.J.M.; Davidson, P.M. Relationships between Ultimate PH and Microbial, Chemical, and Physical Characteristics of Vacuum-Packaged Pork Loins. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, M104–M110. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Martínez, L.; Djenane, D.; Cilla, I.; Beltrán, J.A.; Roncalés, P. Effect of Varying Oxygen Concentrations on the Shelf-Life of Fresh Pork Sausages Packaged in Modified Atmosphere. *Food Chem.* **2006**, *94*, 219–225. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Jiang, Y.; Gao, F.; Xu, X.L.; Su, Y.; Ye, K.P.; Zhou, G.H. Changes in the Bacterial Communities of Vacuum-Packaged Pork during Chilled Storage Analyzed by PCR–DGGE. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 889–895. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Jagadeesan, B.; Gerner-Smidt, P.; Allard, M.W.; Leuillet, S.; Winkler, A.; Xiao, Y.; Chaffron, S.; Van Der Vossen, J.; Tang, S.; Katase, M.; et al. The Use of next Generation Sequencing for Improving Food Safety: Translation into Practice. *Food Microbiol.* **2019**, *79*, 96–115. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Li, M.Y.; Zhou, G.H.; Xu, X.L.; Li, C.B.; Zhu, W.Y. Changes of Bacterial Diversity and Main Flora in Chilled Pork during Storage Using PCR–DGGE. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 607–611. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
34. Stellato, G.; La Storia, A.; De Filippis, F.; Borriello, G.; Villani, F.; Ercolini, D. Overlap of Spoilage-Associated Microbiota between Meat and the Meat Processing Environment in Small-Scale and Large-Scale Retail Distributions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 4045–4054. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
35. Bassey, A.P.; Chen, Y.; Boateng, E.F.; Zhang, Y.; Diao, X.; Nasiru, M.M.; Tang, C.; Ye, K.; Li, C.; Zhou, G. Evaluation of Physicochemical, Microbiological, and Sensory Profiles of Vacuum-Packed Cooked Low-Salt Pork Belly under Refrigeration and Room-Temperature Storage. *LWT* **2022**, *167*, 113847. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

36. Shedleur-Bourguignon, F.; Thériault, W.P.; Longpré, J.; Thibodeau, A.; Fravallo, P. Use of an Ecosystem-Based Approach to Shed Light on the Heterogeneity of the Contamination Pattern of *Listeria Monocytogenes* on Conveyor Belt Surfaces in a Swine Slaughterhouse in the Province of Quebec, Canada. *Pathogens* **2021**, *10*, 1368. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kérouanton, A.; Marault, M.; Petit, L.; Grout, J.; Dao, T.T.; Brisabois, A. Evaluation of a Multiplex PCR Assay as an Alternative Method for *Listeria Monocytogenes* Serotyping. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *80*, 134–137. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Larivière-Gauthier, G.; Thibodeau, A.; Letellier, A.; Yergeau, É.; Fravallo, P. *Salmonella* Shedding Status of the Sow Affects the Microbiota of Their Piglets at Weaning. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 411–423. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Braley, C.; Fravallo, P.; Gaucher, M.-L.; Larivière-Gauthier, G.; Shedleur-Bourguignon, F.; Longpré, J.; Thibodeau, A. Similar Carcass Surface Microbiota Observed Following Primary Processing of Different Pig Batches. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 849883. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
40. Schloss, P.D.; Wescott, S.L.; Ryabin, T. Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7537–7541. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
43. Oksanen, J.; Blanchet, F.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; Minchin, P.R.; O’Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; Stevens, M.H.H.; et al. Vegan: Community Ecology Package. R Package. Available online: https://www.researchgate.net/publication/346579465_vegan_community_ecology_package_version_25-7_November_2020 (accessed on 10 August 2022).

44. Saraiva, C.; Fontes, M.C.; Patarata, L.; Martins, C.; Cadavez, V.; Gonzales-Barron, U. Modelling the Kinetics of *Listeria Monocytogenes* in Refrigerated Fresh Beef under Different Packaging Atmospheres. *LWT—Food Sci. Technol.* **2016**, *66*, 664–671. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
45. Figueroa-López, A.M.; Maldonado-Mendoza, I.E.; López-Cervantes, J.; Verdugo-Fuentes, A.A.; Ruiz-Vega, D.A.; Cantú-Soto, E.U. Prevalence and Characterization of *Listeria Monocytogenes* Isolated from Pork Meat and on Inert Surfaces. *Braz. J. Microbiol.* **2019**, *50*, 817–824. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
46. Gutierrez, R.; Ponce-Alquicira, E.; Braña Varela, D.; Perez-Chabela, M. de L.; Universidad Autonoma Metropolitana, México Prevalence of Pathogenic Microorganisms in Pork Meat Offered for Retail Sale in Supermarkets of Mexico City. *Nacameh* **2020**, *14*, 31–40. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
47. Da Silva, J.L.; Cadavez, V.A.P.; Machado, M.A.M.; Dias, B.d.C.L.; da Cunha-Neto, A.; Gonzales-Barron, U.; Figueiredo, E.E.d.S. Behavior of Spoilage Bacteria and *Salmonella* Enterica Subspecies Enterica O:4,5 in Vacuum-Packaged Beef during Refrigeration. *Ciênc. Rural* **2020**, *50*, e20200090. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. Laukkanen, R.; Martínez, P.O.; Siekkinen, K.-M.; Ranta, J.; Maijala, R.; Korkeala, H. Contamination of Carcasses with Human Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* 4/O:3 Originates from Pigs Infected on Farms. *Foodborne Pathog. Dis.* **2009**, *6*, 681–688. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Vanantwerpen, G.; Van Damme, I.; De Zutter, L.; Houf, K. Seroprevalence of Enteropathogenic *Yersinia* Spp. in Pig Batches at Slaughter. *Prev. Vet. Med.* **2014**, *116*, 193–196. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Fredriksson-Ahomaa, M.; Stolle, A.; Stephan, R. Prevalence of Pathogenic *Yersinia* Enterocolitica in Pigs Slaughtered at a Swiss Abattoir. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 207–212. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Bonardi, S.; Bruini, I.; D’Incau, M.; Van Damme, I.; Carniel, E.; Brémont, S.; Cavallini, P.; Tagliabue, S.; Brindani, F. Detection, Seroprevalence and Antimicrobial Resistance of

- Yersinia Enterocolitica* and *Yersinia Pseudotuberculosis* in Pig Tonsils in Northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *235*, 125–132. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Van Damme, I.; Berkvens, D.; Vanantwerpen, G.; Baré, J.; Houf, K.; Wauters, G.; De Zutter, L. Contamination of Freshly Slaughtered Pig Carcasses with Enteropathogenic *Yersinia* Spp.: Distribution, Quantification and Identification of Risk Factors. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *204*, 33–40. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
53. Hayashidani, H.; Iwata, T.; Yamaguchi, S.; Hara-Kudo, Y.; Okatani, T.A.; Watanabe, M.; Lee, K.-I.; Kumagai, S. Survival of Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* in Vacuum-Packed or Non-Vacuum-Packed Pork at Low Temperature. *Biocontrol Sci.* **2008**, *13*, 139–144. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
54. Kaur, M.; Williams, M.; Bissett, A.; Ross, T.; Bowman, J.P. Effect of Abattoir, Livestock Species and Storage Temperature on Bacterial Community Dynamics and Sensory Properties of Vacuum Packaged Red Meat. *Food Microbiol.* **2021**, *94*, 103648. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
55. Valero, A.; Rodríguez, M.-Y.; Posada-Izquierdo, G.D.; Pérez-Rodríguez, F.; Carrasco, E.; García-Gimeno, R.M. Risk Factors Influencing Microbial Contamination in Food Service Centers. In *Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases*; Makun, H.A., Ed.; InTech: London, UK, 2016; ISBN 978-953-51-2277-7. [[Google Scholar](#)]
56. Kaur, M.; Shang, H.; Tamplin, M.; Ross, T.; Bowman, J.P. Culture-Dependent and Culture-Independent Assessment of Spoilage Community Growth on VP Lamb Meat from Packaging to Past End of Shelf-Life. *Food Microbiol.* **2017**, *68*, 71–80. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
57. Ercolini, D.; Russo, F.; Torrieri, E.; Masi, P.; Villani, F. Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4663–4671. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Luong, N.-D.M.; Coroller, L.; Zagorec, M.; Membré, J.-M.; Guillou, S. Spoilage of Chilled Fresh Meat Products during Storage: A Quantitative Analysis of Literature Data. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1198. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Faucitano, L.; Ielo, M.C.; Ster, C.; Lo Fiego, D.P.; Methot, S.; Saucier, L. Shelf Life of Pork from Five Different Quality Classes. *Meat Sci.* **2010**, *84*, 466–469. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Yang, X.; Wang, H.; Hrycauk, S.; Klassen, M.D. Effects of Peroxyacetic Acid Spray and Storage Temperature on the Microbiota and Sensory Properties of Vacuum-Packed Subprimal Cuts of Meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*, e03143-20. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

Chapitre 7 – Discussion générale

Les principaux objectifs de ce travail étaient de décrire la variabilité du microbiote de surface de carcasses et/ou des produits de viande de porc emballés sous vide en fonction de la provenance des animaux, des étapes du procédé d'abattage, des conditions d'entreposage, en plus de décrire la variation de ce microbiote dans le temps.

7.1 Choix de la méthodologie

Très peu d'études ont abordé la caractérisation du microbiote de surface des carcasses et des viandes de porc par des méthodes de séquençage à haut débit. Ainsi, dans un premier temps, il a été nécessaire de réaliser des mises au point pour déterminer quelles étaient les méthodologies liées à l'extraction d'ADN et aux analyses bio-informatiques qui étaient optimales.

Contrairement à des échantillons de matières fécales dont la composition est caractérisée par de nombreuses études [235,238,242,246,259], les échantillons provenant de surface de carcasses ou de viandes ne contiennent qu'une petite quantité d'ADN et ce microbiote est peu caractérisé. C'est pourquoi dans les deux premiers objectifs, la quasi-totalité de la surface des carcasses a été échantillonnée pour récupérer un maximum d'ADN bactérien, soit une surface de 600 cm² pour chaque partie (haute : jambon et basse : cou). Dans cette thèse, la concentration d'ADN bactérien retrouvée sur la surface des portions de carcasses échantillonnées n'excédait pas 10 ng/μL.

Dans les échantillons de viandes emballées sous vide, le nombre de bactéries attendu à la fin de l'entreposage était encore plus restreint que sur les carcasses en raison du retrait de l'oxygène qui inhibe la croissance de toutes les bactéries aérobies [4]. C'est pourquoi une méthode d'échantillonnage destructive (prélèvement d'un morceau de viande) suivie d'une extraction d'ADN à l'aide d'un Kit commercial, le HostZERO™ Microbial DNA Kit de la compagnie Zymo Research, ont été employées. Ce kit a été utilisé car il permet de réduire la quantité d'ADN de l'hôte en lysant sélectivement les cellules eucaryotes et en dégradant cet ADN avant la

purification de l'ADN bactérien. Ce kit a permis d'extraire une plus grande quantité d'ADN, celle-ci approchant les 20 ng/ μ L. Une PCR quantitative ciblant la région V4 de l'ARNr 16S a permis d'obtenir le nombre de copies de gènes. La méthode d'extraction d'ADN par le kit a permis de mesurer une moyenne de $8,2 \times 10^4$ copies de gènes (16S) pour 10 échantillons de surface de longes (préalablement échantillonnés à l'abattoir dans le but de mettre en place la méthode d'extraction de l'ADN), alors que la méthode d'extraction utilisant le phénol/chloroforme pour la purification a permis d'en mesurer seulement une moyenne de 4×10^3 copies de gènes.

Concernant les analyses bio-informatiques, les pipelines sont en constant développement et donc évoluent. Aujourd'hui, les pipelines les plus utilisés sont Mothur et QIIME2 avec l'implantation de DADA2. Dans cette thèse, le choix de logiciels bio-informatiques s'est orienté vers Mothur, car il a été démontré que l'algorithme de nettoyage de DADA2 développé dans QIIME2 supprimait beaucoup de séquences et apparaît trop restrictif dans les paramètres de filtrage et de nettoyage de ces séquences [210,213], pouvant ainsi contribuer à la suppression de séquences rares, mais réellement présentes dans notre contexte de contamination bactérienne limitée.

Par exemple, le fait que l'algorithme de DADA2 supprime les séquences qui ne contiennent qu'un seul nucléotide ambigu, mais aussi celles qui ne sont retrouvées qu'une seule fois dans les échantillons (singletons) basé sur la justification qu'il n'est pas possible pour le logiciel de distinguer si la présence d'une seule lecture est réellement associée à une séquence ou plutôt le résultat d'une erreur de séquençage, ou encore sur la base d'un faible nombre de séquences, peut amener à la perte de certaines espèces rares dans l'analyse [210]. Basée sur des communautés fictives, l'étude comparative de ces deux pipelines a démontré que le filtrage des lectures par DADA2 pouvait introduire des biais en supprimant des séquences assignées à *L. gasseri*, *S. agalactiae* et *S. pneumoniae*, car la région V4 du gène de l'ARNr 16S contient des motifs tels que des triplets de base « GGC » qui sont considérés comme des erreurs de lecture par DADA2 [213]. De plus, dans cette même étude citée précédemment, bien que DADA2 ait montré une meilleure sensibilité et ait été en mesure de différencier les séquences contenant uniquement une base de différence, les résultats démontraient que lorsque deux séquences d'un

même genre bactérien étaient présentes avec un ratio de 13 :1, la séquence de l'ASV en faible abondance n'était pas identifiée [213].

Il a été observé que la capacité à obtenir le nombre correct d'OTUs à partir du séquençage de données fictives était démontrée uniquement lorsque les séquences rares étaient supprimées en utilisant l'algorithme de QIIME [260]. A l'opposé, Schloss *et al.* en 2020 ont observé l'impact de la suppression des séquences rares (apparues dix fois ou moins dans chaque échantillon) dans un ensemble de 12 jeux de données publiés et qui utilisaient la plateforme Illumina MiSeq pour séquencer la région V4 de l'ARNr 16S d'une variété d'environnements, exercice beaucoup plus complexe que celui n'impliquant qu'une communauté bactérienne simple [261]. Les auteurs ont démontré que la richesse bactérienne était considérablement réduite (jusqu'à 95 % pour des échantillons provenant de sols) et que la structure du microbiote était modifiée lorsque les analyses étaient effectuées avec Mothur. Prodan *et al.* ont observé que le pipeline DADA2, lorsque comparé à Mothur, pour sa formation d'OTU à 97 % de similitude de séquences, présentait une meilleure spécificité [213]. Toutefois, les résultats obtenus ont montré que le nombre d'ASV et d'OTU exacts était respectivement de 99,88 % et 99,83 %, suggérant que Mothur et DADA2 possèdent une spécificité similaire au niveau du genre. De plus, dans cette même étude, il a été observé que le pipeline DADA2 produisait autant de « faux » ASV que les analyses effectuées par Mothur par regroupement à l'OTU (0,12 % et 0,17 %, respectivement) [213].

Alors, la principale faiblesse des approches basées sur l'OTU est la surestimation de la richesse bactérienne [213]. Au contraire, dans une étude portant sur le microbiote de litière de feuilles d'arbres correspondant à un environnement pauvre en terme de diversité bactérienne, il a été démontré qu'il n'y avait pas d'effet des pipelines choisis sur la richesse du microbiote, basé sur l'ASV par rapport à l'OTU [262]. Ainsi, pour des échantillons dont la caractérisation du microbiote par des techniques de séquençage à haut débit a été très peu réalisée comme ce qui est le cas des échantillons de la présente étude, l'utilisation de l'approche par DADA2 pour effectuer les analyses bio-informatiques ne semble pas optimale. Ainsi, pour caractériser le microbiote de surface de carcasses et de viande sans grande perte de la diversité, les analyses bio-informatiques

ont donc été réalisées à l'aide de Mothur. Une future comparaison des analyses du microbiote de surface des carcasses de porcs, ainsi que celui des longes de porcs, réalisées par Mothur et DADA2 permettrait de conclure sur l'impact du choix du pipeline pour ce type d'échantillons.

Dans cette thèse, les paramètres par défaut de la procédure normalisée (SOP) de Mothur ont été utilisés, à l'exception de l'étape de clustering et du pré-cluster. La méthode de clustering par OTU et le regroupement des séquences à plus de 97 % de similitude est la plus utilisée dans les analyses de séquençage de l'ARN 16S [210]. Dans la littérature, l'utilisation du seuil de 97 % d'identité pour regrouper les espèces dans une même OTU, introduite en 1994, a été remise en cause [211]. En 2018, Edgar *et al.* ont estimé que le seuil d'identité standard, soit 97 %, était trop bas et que le seuil optimal pour le séquençage de la région V4 était de 100 % [211].

Dans cette thèse, lors du premier échantillonnage où des surfaces des carcasses de porcs provenant de six différents lots ont été récoltés avant le refroidissement, la comparaison de la communauté bactérienne sur un ensemble d'échantillons (contrôle négatif, communauté fictive connue et 10 échantillons choisis aléatoirement) a été réalisée entre la méthode de regroupement des séquences à 97 % (OTU) et à 100 % (méthode unique). Nous avons observé que le nombre d'OTU et d'ASV étaient identiques, et qu'il n'y avait pas de différence dans l'abondance et l'assignation taxonomique. Nous sommes conscients que le regroupement de séquence à 97 % peut amener à une perte de la diversité [213]. Dans notre cas, sachant que le microbiote des carcasses de porc a très peu été caractérisé par des méthodes de séquençage de l'ARNr 16S, l'approche choisie était de considérer chaque séquence comme une espèce, avec un seuil de 100 % de similitude. Il est important de noter qu'un ASV n'est pas équivalent à une OTU avec un seuil de 100 % d'identité [207]. Toutefois, Chiarello *et al.* ont démontré qu'après une raréfaction des OTUs regroupées avec un seuil de 99 % d'identité, la corrélation entre les estimations de richesse basées sur l'ASV (DADA2) et l'OTU (Mothur) était augmentée, et que la richesse bactérienne obtenue en se basant sur les OTUs était alors comparable avec celle considérant les ASV [216].

Dans notre cas, le choix du pré-regroupement (*pre-cluster* en anglais) dans l'étape de nettoyage des lectures a eu un impact sur le nombre d'ASV obtenu et sur l'assignation taxonomique. En utilisant un seuil de 100 % pour le regroupement des séquences, le choix de la méthode de pré-regroupement « deblur » implantée dans Mothur a réduit de 10 % le nombre d'ASV obtenus, mais a permis une meilleure assignation taxonomique lorsque comparée à la méthode par défaut présentée dans la revue de littérature. Par exemple, le genre *Staphylococcaceae_unclassified* avec la méthode par défaut a été assigné à *Salinicoccus* avec deblur. De plus, les séquences assignées au genre *Bacteria_unclassified* n'étaient plus présentes lorsque la méthode deblur était utilisée. La comparaison entre les abondances des mêmes genres présents entre les deux choix de méthode a montré qu'il n'y avait pas de différence.

Dans le cadre de cette thèse, avant de réaliser les tests pour le choix de la méthode du pré-regroupement, le choix de la base de données de référence pour l'assignation taxonomique s'est porté vers RDP, selon les bases de données disponibles lors du commencement des travaux. Dans notre cas, en comparaison avec la base de données SILVA 132, l'analyse de nos données a démontré que l'alignement de séquences avec RDP permettait un niveau de précision taxonomique plus élevé. Par exemple, lors des premières analyses bio-informatiques réalisées sur les échantillons de surface de carcasses de porc ainsi que sur des échantillons de communautés bactériennes communautés fictives connues (contenant *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Enterococcus*, et *Pseudomonas*), la séquence correspondant à *Escherichia/Shigella* était assignée aux *Enterobacteriaceae* avec l'utilisation de SILVA, amenant ainsi au choix d'exclure l'utilisation de la base de données SILVA dans cette étude. Confirmant nos observations, l'étude de Trudeau et *al.* a observé que ces deux bases de données semblaient complémentaires, mais que l'assignation taxonomique avec RDP permettait d'identifier des séquences qui restaient inconnues avec SILVA [263].

Au cours de cette thèse, une nouvelle version de SILVA (138) a été formatée pour être utilisée dans Mothur. Dans notre cas, pour la communauté artificielle connue et séquencée, cette nouvelle version de SILVA assignait les genres *Salmonella* et *Enterococcus* en tant

qu'*Enterobacteriaceae_unclassified* et *Enterococcaceae_unclassified*, respectivement, confirmant notre choix d'utiliser la base de données RDP pour les analyses. Conformément à nos observations, l'étude de Hung *et al.* a démontré qu'en utilisant l'algorithme de Mothur, la précision au niveau de la famille et du genre lors de l'assignation taxonomique était de 97,96 % et 93,18 %, respectivement, avec SILVA (version 138), contre 100 % et 99,68 % avec RDP lors du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S [264].

7.2 La contamination bactérienne et le microbiote des surfaces des carcasses de porc

Le premier objectif était de déterminer si la contamination microbienne et le microbiote variaient et pouvait être associé à la ferme d'origine des animaux même après l'abattage et l'habillage des carcasses. Le premier échantillonnage a permis de récolter 26 échantillons de surfaces de carcasses de porc (prélevés en haut et en bas de la carcasse), provenant de six fermes différentes (lots), sur une même journée d'abattage avant l'étape de refroidissement, dans un abattoir porcin dans la province de Québec au Canada.

Par des analyses de microbiologie classique, il a été démontré que la concentration des bactéries aérobies mésophiles totales était significativement plus élevée dans la partie basse (5,3 log UFC/600 cm²) des carcasses, que dans la partie haute (4,6 log UFC/600 cm²). Cette concentration bactérienne n'était pas significativement différente entre les échantillons des hauts de carcasses pour les 6 lots de porcs, ainsi qu'entre les échantillons des bas de carcasses pour ces mêmes 6 lots. À notre connaissance, aucune étude n'a investigué l'effet de la provenance des animaux sur la charge des différents indicateurs bactériens retrouvés à la surface des carcasses. Dans cette étude, la concentration bactérienne moyenne des bactéries lactiques s'élevait à 3,5 log retrouvé dans 96 % des échantillons de la partie basse des carcasses et *Pseudomonas* n'a été détecté dans aucun des échantillons. Comme mentionné lors de la recension de la littérature, *Pseudomonas* spp. est principalement responsable de l'altération des viandes fraîches entreposées à 4°C sous aérobiose, tandis que les bactéries lactiques

anaérobiques sont celles qui sont les plus impliquées dans l'altération des viandes emballées sous vide [4]. Ainsi, le dénombrement seul des bactéries aérobies mésophiles totales comme méthode d'analyse pour définir les critères d'hygiène des procédés pour les carcasses de porc avant l'étape de refroidissement n'est pas suffisant et ne représente donc qu'une estimation de la charge globale des bactéries retrouvées à la surface des carcasses dans cet établissement.

L'analyse du microbiote a permis de caractériser pour la première fois le microbiote de ces surfaces de carcasses dans un abattoir porcin au Canada. Dans cet objectif, il a été démontré, grâce aux analyses bio-informatiques, que le microbiote de surface de carcasses était constitué à 90 % de bactéries qui sont généralement retrouvées dans le microbiote intestinal des porcs, soit *Terrisporobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Turicibacter*, *Clostridium sensu stricto*, et *Streptococcus*, ainsi que des bactéries généralement retrouvées dans le microbiote oral des animaux (langue, amygdales), telles qu'*Acinetobacter*, *Enhydrobacter* et *Rothia* [38,253,265–267].

Parmi ces genres bactériens, c'est la première fois que *Terrisporobacter*, *Turicibacter* et *Clostridium sensu stricto* ont été identifiés sur la surface de carcasses de porc. En 2022, une étude a identifié le genre *Turicibacter* dans le microbiote de surface de carcasses d'agneaux [268] et cette présence a été positivement corrélée à la dégradation des protéines produisant des composés volatils (mesurés par acide basique volatil total). Le taux d'azote basique volatil total est utilisé comme biomarqueur de la dégradation des protéines et des amines et est utilisé pour évaluer la fraîcheur des viandes [269]. Dans notre étude, *Terrisporobacter* et *Turicibacter* n'ont été retrouvés que dans la partie haute des carcasses. Ces bactéries, connues pour être retrouvées dans le microbiote intestinal des porcs, pourraient être transférées aux carcasses, soit pendant l'étape d'éviscération s'il y a rupture accidentelle des intestins, soit par les gants des employés à cette étape ou bien pendant la fente des carcasses [265,267].

Parmi les genres identifiés, à l'exception d'*Acinetobacter*, les bactéries ne semblaient pas être reconnues à des pathogènes d'origine alimentaire ou à bactéries responsables de l'altération des viandes. Cependant, une grande diversité de bactéries provenant potentiellement du microbiote

intestinal retrouvée à la surface des carcasses indiquerait un transfert de ces bactéries lors de l'étape d'éviscération et/ou de potentiels défauts d'hygiène lors du processus d'habillage des carcasses. Ainsi, le risque de contamination des carcasses par des bactéries pathogènes augmenterait. De plus, les résultats portant sur la composition du microbiote ont confirmé que les bactéries retrouvées à la surface des carcasses ne sont pas représentées uniquement par des bactéries aérobies mais aussi par des bactéries anaérobies facultatives telles que les LAB. Ces résultats confirment bien que l'utilisation seule du dénombrement des bactéries aérobies mésophiles totales ne permet pas de caractériser toute la charge bactérienne des bactéries retrouvées à la surface des carcasses.

Dans notre étude, il a été démontré que la richesse et la structure du microbiote de surface des carcasses étaient similaires entre le haut et le bas de la carcasse, ainsi qu'entre les six différents lots échantillonnés. La variabilité connue du microbiote intestinal entre des animaux issus de différentes fermes ne semblait pas se traduire à la surface des carcasses [270]. Le microbiote de surface de carcasses de porc provenant de différents élevages et abattus sur une même journée semble alors être uniformisé lors du processus de transformation primaire jusqu'à la douche précédent le refroidissement des carcasses.

Une limite reconnue de la présente étude réside dans le fait que pour les animaux échantillonnés, la composition, la richesse et la structure du microbiote intestinal des porcs préalablement à l'abattage étaient inconnues. Malgré tout, basé sur les résultats de notre étude, une différence significative de richesse et de diversité bactérienne entre des carcasses d'animaux provenant de différents élevages et abattus sur une même journée à la fin de la ligne d'habillage pourrait mettre en évidence une variation dans le processus d'habillage, tels qu'un équipement défectueux, ou encore des erreurs ou des mauvaises pratiques d'hygiène et de fabrication (désinfection inefficace du couteau à l'étape d'éviscération), par exemple.

La caractérisation du microbiote pourrait être utilisée comme indicateur de l'origine de la contamination. Bien que le procédé d'abattage apparait ici être maîtrisé au regard des critères de

rendement établis par l'USDA ($8,3 \times 10^4$ UFC/100cm² < au critère de $4,2 \times 10^6$ log UFC/cm² pour les bactéries aérobies mésophiles totales), l'identification des genres bactériens qui peuvent être associés à l'altération de la viande (*Acinetobacter* par exemple) dans cette étude a permis d'observer sans culture que la contamination proviendrait de l'écosystème microbien présent dans les intestins, ou les amygdales et la salive. Toutefois, l'hypothèse d'une contamination croisée entre les équipements, l'environnement et les carcasses ne peut pas être exclue.

La structure globale du microbiote de surface des carcasses échantillonnées dans le cadre de notre étude semblait être affectée principalement par le procédé d'abattage. Une autre limite reconnue de la présente étude, est que le plan d'échantillonnage établi en fonction des contraintes des opérations d'abattage lors de la visite, a permis d'échantillonner 26 échantillons provenant de 6 différents lots ce qui diminue la puissance statistique de l'étude. En effet, sur une journée classique d'abattage, une moyenne de 8 lots de porcs sont abattus. De plus, ces résultats ont été obtenus à une étape précise sur la chaîne d'abattage, et à l'intérieur d'une fenêtre de temps limitée.

Ainsi, le deuxième objectif avait pour but de décrire la variation du microbiote de carcasses de porc dans le temps, à la suite du processus d'habillage, et d'étudier l'impact du refroidissement des carcasses sur ce microbiote. Le deuxième échantillonnage s'est donc déroulé sur quatre semaines, dans le même établissement d'abattage que précédemment, durant lesquelles 504 échantillons de surface de carcasses ont été récoltés avant le refroidissement, représentant 64 lots de porcs. Dans cette étude, l'analyse n'a pas été réalisée à l'échelle d'un lot comme précédemment. Pour chaque lot, 6 échantillons de carcasses ont été regroupés pour chaque partie de carcasse ciblée (haute et basse). La moitié des lots ont été échantillonnés en début de journée d'abattage (avant-midi) et l'autre moitié en fin de journée d'abattage (après-midi). Sur ces 64 lots, 16 lots ont été sélectionnés et échantillonnés après le refroidissement, représentant ainsi 96 échantillons.

Conformément aux résultats du premier objectif, la concentration des bactéries aérobies mésophiles totales, des entérobactéries, d'*Escherichia coli*, des bactéries lactiques et de *Pseudomonas* était significativement plus élevée pour la portion basse des carcasses, avant le refroidissement. Après le refroidissement, il a été observé que les comptes des bactéries aérobies mésophiles totales, des entérobactéries et d'*Escherichia coli* étaient significativement moins élevés pour la partie haute des carcasses, tandis que seuls les comptes des entérobactéries et d'*Escherichia coli* étaient significativement moins élevés pour la partie basse. Que ce soit avant ou après le refroidissement, les comptes bactériens respectaient les critères de rendement établis par l'USDA qui représentent la moyenne des charges microbiennes les plus élevées attendues sur les carcasses lorsque le procédé d'abattage est bien maîtrisé.

En ce qui concerne les résultats de séquençage, il a été observé que toutes les bactéries ayant une abondance relative de plus de 5 % et retrouvées à la surface des carcasses lors du précédent échantillonnage (échantillons récoltés sur une même journée) ont été également identifiées sur les carcasses provenant des 64 lots avant le refroidissement. Toutefois, l'abondance relative variait en fonction de l'échantillonnage. Parmi les genres retrouvés à la surface des carcasses de porc, *Lactobacillus* et *Acinetobacter* peuvent contenir des espèces responsables de l'altération de la viande. Le microbiote des 64 lots de carcasses de porc avant le refroidissement était dominé par le genre *Rothia*. Alors que le genre *Escherichia/Shigella* était le plus représenté sur les parties hautes et basses des carcasses de porc lors du précédent échantillonnage, il n'a été retrouvé que sur la partie basse des carcasses lors du deuxième échantillonnage, et ce, pendant les quatre semaines où ces échantillons ont été récoltés. A l'inverse, dans cette étude, les genres *Terrisporobacter* et *Turicibacter* étaient retrouvés autant dans la partie haute que basse sur les 64 lots de carcasses de porc avant le refroidissement, alors qu'ils n'étaient présents que dans la partie haute des carcasses lors du premier échantillonnage. Le fait que les 64 lots de carcasses aient été échantillonnés pendant plusieurs visites rend difficile la comparaison du microbiote des carcasses entre les deux échantillonnages et un effet de la visite pourrait davantage expliquer les différences observées. Il apparaît donc que sur un temps court, le microbiote de surface de différents lots de carcasses de porc est similaire, mais que cet effet n'est plus observé si l'on

compare le microbiote des carcasses sur une échelle de temps plus grande et traduit bien une évolution à maîtriser du processus de contamination de surface des carcasses, quelle que soit son origine. L'analyse du microbiote apparaît être un bon révélateur de cette évolution.

Contrairement aux premiers résultats où la diversité bactérienne était similaire entre les deux parties des carcasses, il a été observé que le nombre d'espèces, représenté par l'indice Observed dans les analyses de diversité microbienne, était significativement plus élevé sur la partie haute des carcasses lorsque comparée à la partie basse, avant le refroidissement, et que la structure et la composition du microbiote étaient différentes entre les deux parties. Nous remarquons tout de même que près de 50 % des bactéries ayant une abondance relative supérieure à 5 % (13/27) étaient uniquement présentes dans les échantillons prélevés de la partie basse des carcasses. Nous avons observé alors qu'une plus grande richesse bactérienne dans la partie haute des carcasses ne résultait pas d'une augmentation de la charge bactérienne, qui elle restait plus élevée dans la partie basse des carcasses, pour tous les indicateurs microbiens.

Il serait alors intéressant d'accorder de l'intérêt à la diversité des bactéries retrouvées dans la partie haute des carcasses et de l'origine spécifique de cette contamination. En effet, si une plus grande diversité est observée, nous pourrions suggérer que plusieurs sources de contamination croisée contribuent mutuellement à la contamination des carcasses. Ainsi, une plus grande diversité augmenterait le risque que les carcasses soient contaminées par des bactéries pathogènes ou des bactéries responsables de l'altération qui pourront par la suite se retrouver sur les produits de viandes. L'ouverture du rectum de la carcasse pourrait sans doute jouer un rôle important dans le transfert des bactéries à la surface des carcasses avant le refroidissement [23,25,27,28,161].

Nous avons observé précédemment que le microbiote des carcasses était similaire sur une même journée d'abattage. Néanmoins, ce microbiote différait lors des quatre semaines d'échantillonnage dans cette étude. Les résultats indiquaient que la diversité microbienne était différente entre les semaines, que ce soit pour les échantillons provenant de la partie haute ou

de la partie basse des carcasses, tandis que la diversité apparaissait similaire entre les différentes visites. De plus, la diversité était plus élevée dans les échantillons collectés à partir de la partie haute des carcasses pendant le quart de travail du matin lorsque comparée à celle des échantillons récoltés pendant l'après-midi, alors que cette même diversité restait similaire pour les échantillons provenant de la partie basse des carcasses. Ces résultats sont contrintuitifs. Nous pourrions nous attendre à ce que la diversité microbienne augmente au fur et à mesure que les porcs sont abattus dans la journée [100]. Une étude réalisée dans un abattoir de porcs a démontré que le microbiote d'échantillons prélevés à partir d'environnements de la machine à épiler, des fouets au niveau de la machine à gratter, et de la scie circulaire permettant d'ouvrir la carcasse était similaire entre les quatre différentes dates d'échantillonnage, distribuées sur trois mois [35].

Il serait alors intéressant, dans notre cas de figure, de déterminer si les différences de structure et de composition du microbiote observées entre les semaines et les visites résultaient de mauvaises pratiques d'hygiène telles que les procédures de nettoyage et de désinfection de l'environnement ou le nettoyage des ustensiles comme les couteaux utilisés lors de l'éviscération, ou de la capacité des bactéries à résister aux solutions de nettoyage et de désinfection utilisées. De mauvaises pratiques au niveau des procédures d'abattage par le personnel, résultant d'un manque de formation, ou d'un équipement défectueux sur la ligne d'abattage, pourraient davantage expliquer l'évolution observée entre les quarts de travaux. Pour cela, il serait envisageable de procéder au séquençage de l'ARN 16S des échantillons de l'environnement de l'abattoir (par exemple les couteaux utilisés lors de l'éviscération avant et après leur nettoyage) pour déterminer si l'on retrouve une uniformité du microbiote dans l'environnement ou si la différence observée provient directement des animaux.

Contrairement aux échantillons collectés avant le refroidissement, il a été observé que le nombre de bactéries était significativement plus élevé dans les échantillons de bas de carcasses après le refroidissement. Les échantillons collectés avant le refroidissement présentaient une diversité plus élevée, comme attendu sachant que le refroidissement est reconnu pour diminuer la charge bactérienne sur les carcasses [27,29,90,95,105]. Une des limites de la présente étude est que le

point d'échantillonnage après le refroidissement comprend également l'étape de lavage des carcasses, avant l'entrée dans la chambre de refroidissement. Ainsi, il n'est pas possible de conclure que seul le refroidissement a permis de diminuer la diversité bactérienne. Le ruissèlement de l'eau, de haut en bas, sur la carcasse lors de l'étape de lavage pourrait davantage expliquer la plus grande diversité observée au bas des carcasses après l'étape de refroidissement.

Bien que la diversité, la structure et la composition du microbiote apparaissent significativement différentes entre les échantillons collectés avant et après le refroidissement, et ce, peu importe la partie de la surface de la carcasse, il a été observé que les genres prédominants ayant un potentiel d'altération avant le refroidissement étaient également identifiés après cette étape. Ces bactéries retrouvées après le refroidissement peuvent alors contaminer par la suite l'environnement de transformation des carcasses. Une étude réalisée dans le même établissement d'abattage entre septembre 2017 et mars 2018 avait pour but de caractériser le microbiote de surface des convoyeurs de six lignes de production présentes dans la salle de découpe, lignes qui étaient chacune associées à une partie spécifique de la carcasse destinée à devenir une pièce de viande (demi-carcasses, flancs, longes, épaules et les jambons) lors de six différentes visites. Les bactéries identifiées sur les surfaces des carcasses de porc avant le refroidissement ont également été identifiées sur ces différents convoyeurs. Par exemple, les genres *Truperrela*, *Fusobacterium* et *Acinetobacter* ont été identifiés sur tous les convoyeurs lors de chaque visite, tandis que le genre *Rothia* était présent à chaque visite seulement à la surface des convoyeurs principaux, de l'épaule et du jambon [271].

Bien que les résultats liés à la microbiologie classique nous informent que le procédé d'abattage est maîtrisé au regard des critères aujourd'hui considérés, la caractérisation du microbiote nous a permis de déterminer que la diversité bactérienne retrouvée à la surface de carcasses de porc n'était pas uniforme sur une période d'un mois d'abattage et ouvrent des perspectives dans la volonté de maîtrise de la qualité microbiologique pour un atelier d'abattage. Ces résultats indiquaient alors que la contamination microbienne des carcasses de porc n'était pas constante, bien que le principal genre bactérien, *Rothia*, prédominant soit présent tout au long de

l'échantillonnage. La plus importante limite de l'étude se base sur notre choix méthodologique d'avoir combiné les six échantillons de carcasses provenant d'un même lot. Une perspective envisageable est de confirmer ou informer l'hypothèse que la différence de diversité observée à la surface des carcasses entre les visites provient des animaux en effectuant le séquençage de chaque carcasse indépendamment entre les différents lots à chaque visite.

7.3 Le microbiote des surfaces des longes de porc emballées sous vide

Enfin, le troisième objectif était de décrire l'évolution du microbiote de produits finis de porc emballés sous vide sur une période de plusieurs semaines, ce qui imitait l'exportation outre-mer, de déterminer la variation de ce microbiote entre les produits provenant de différents lots de porcs abattus, et de déterminer l'impact de différents écarts de température (et du retour à la normale de celle-ci) d'entreposage sur ce microbiote.

Ce dernier échantillonnage a permis de récolter 432 échantillons de surface de longes de porc emballées sous vide, provenant de 8 lots différents, pendant une période de 5 mois. Les 8 lots ont été échantillonnés pendant 8 visites distinctes (4 visites les lundis et 4 visites les mardis, à intervalle d'une, deux ou trois semaines entre chaque visite). Les longes de porc emballées sous vide expédiées à l'international, considérées comme un produit de première qualité, provenaient de carcasses abattues le matin, moment où l'environnement de l'abattoir est théoriquement le moins contaminé. Dans cette étude, l'unité de lot correspondait donc à des longes provenant des premières carcasses abattues le matin. Pour chaque lot, la durée de l'échantillonnage était de 56 jours à partir de la mise sous vide (J1). Cinq conditions de température d'entreposage ont été choisies : aucun abus de température (contrôle), une augmentation de la température de 2°C pendant 2 jours avant un retour à la normale aux jours 15, et au jour 29 de l'entreposage, puis finalement une augmentation de la température de 10°C pendant 6 heures avant le retour à la normale aux jours 15, et au jour 29 de l'entreposage.

À notre connaissance, c'est la première fois que le microbiote d'une pièce de viande de porc emballée sous vide et entreposée à des températures inférieures à 0°C est caractérisée à l'aide

du séquençage de l'ARNr 16S. Au premier jour de l'entreposage, il a été observé que les surfaces des longes de porc emballées sous vide étaient dominées par les genres *Escherichia/Shigella* et *Pseudomonas*. Le genre *Escherichia/Shigella* dominait également à la surface des carcasses de porc précédemment échantillonnées avant et après l'étape de refroidissement.

Nos résultats pourraient suggérer que les genre *Escherichia/Shigella* retrouvés à la surface des longes de porc emballées sous vide proviennent des surfaces des carcasses. Ces genres sont les seuls retrouvés à la surface des carcasses et retrouvés à la surface des longes au début de l'entreposage. Le genre *Pseudomonas* n'a pas été identifié dans la composition initiale du microbiote des carcasses, bien qu'il ait été dénombré sur le milieu de culture, avant et après le refroidissement, lors du deuxième échantillonnage. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la charge de *Pseudomonas* était trop faible pour être identifiée par les méthodes de séquençage. La contamination des longes de porc emballées sous vide par *Pseudomonas* pourrait également provenir d'une contamination croisée après l'étape de refroidissement. En effet, d'après l'étude de Shedleur-Bourguignon *et al.* publiée en 2023, il a été observé dans la salle de découpe de ce même abattoir que *Pseudomonas* était retrouvé à la surface des convoyeurs associés aux longes et qu'il était également significativement et positivement associé à la ligne de production du convoyeur principal [271].

Aux 21^{ème} et 56^{ème} jours d'entreposage sous vide, le changement de la population des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies était attendu. Les résultats du séquençage ont démontré que les *Lactobacillales_unclassified* et *Carnobacterium* étaient les genres prédominants. Les *Lactobacillales* sont un ordre de bactéries qui comprend six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterocaccaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostrocaceae* et *Streptocaccaceae*. De plus, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont six genres bactériens faisant partie de ces familles, respectivement, et sont actuellement reconnus comme des bactéries lactiques responsables de l'altération de la viande [4]. Grâce à un alignement de la séquence de l'ASV correspondant à *Lactobacillales_unclassified* avec l'outil BLAST, la séquence a été assignée à *Lactobacillus spp.* Il

est tout de même important de noter que la séquence assignée à cet ASV était différente de la séquence de l'ASV correspondant au genre *Lactobacillus* dans les données de séquençage, présente dans la communauté fictive.

L'ASV assigné à *Lactobacillales_unclassified* retrouvé à la surface des longes de porc lors de l'entreposage était également présent, en faible abondance relative, dans les échantillons lors du premier jour d'entreposage. De plus, le genre *Lactobacillales_unclassified* a été également identifié à la surface des carcasses de porc précédemment échantillonnées avant l'étape de refroidissement et il n'a été identifié que dans les échantillons collectés pendant le quart de travail du matin. Toutefois, toujours dans l'échantillonnage précédent, il n'a pas été détecté dans les échantillons de carcasses après le refroidissement. Deux hypothèses sont pour expliquer cette observation : la quantité des *Lactobacillales_unclassified* se situait sous la limite de détection de la méthode de séquençage utilisée, et dans ce cas-là, nous pouvons émettre l'hypothèse que le microbiote des carcasses contribue au microbiote des longes de porc emballées sous vide, ou qu'une recontamination croisée des carcasses par *Lactobacillales_unclassified* aurait pu avoir lieu dans la salle de découpe et de transformation des carcasses.

À l'abattoir, pour les produits de porc emballés sous vide, la recherche et le dénombrement des bactéries lactiques (LAB) sont réalisés. *Carnobacterium* spp. fait partie des LAB. Cependant, la présence et la charge de *Carnobacterium* spp. dans les aliments sont sous-estimées. En effet, la croissance de cette bactérie est inhibée par l'acétate qui est contenu dans le milieu de culture de la gélose MRS utilisée pour le dénombrement des LAB [17,55]. Le séquençage a donc permis d'identifier des bactéries qui n'étaient pas prises en compte dans l'évaluation de la charge microbienne. Les méthodes de séquençage peuvent fournir dans ce cas-là des informations nécessaires pour identifier les bactéries indicatrices permettant un contrôle plus fin de la qualité microbiologique des produits de viande emballés sous vide. Les genres *Lactobacillales_unclassified* et *Carnobacterium* apparaissent faire partie du microbiote résiduel des longes de porc, sachant que l'échantillonnage s'est étendu sur une période de plus de 5 mois. Le séquençage du génome entier des séquences assignées à *Lactobacillales_unclassified*

retrouvées sur ces pièces de viande serait alors une perspective à envisager, dans un premier temps pour mieux identifier le genre et l'espèce bactérienne, mais également pour déterminer leurs potentielles fonctions dans l'altération de la viande.

Pour les longes de porc, tel qu'attendu, il a été observé que la diversité du microbiote diminuait pendant l'entreposage et qu'au premier de jour de celui-ci, ce microbiote était significativement différent des longes entreposées pendant 21 et 56 jours. Comme mentionné précédemment, la diminution de la diversité pendant l'entreposage n'est pas interprétée comme une diminution de la charge bactérienne. Bien que la structure et la composition du microbiote étaient similaires entre les échantillons prélevés au jour 21 et 56, nous avons remarqué sur les graphiques des NMDS qu'un groupe d'échantillons prélevés au jour 21 (provenant des lots numéros 1, 2, 3, 4 et 8) était regroupé près des échantillons entreposés au premier jour; tandis qu'un autre groupe d'échantillon (regroupant les échantillons des lots 4, 5, 6 et 7) était regroupé près des échantillons prélevés à la fin de la période d'entreposage. Une des limites de l'étude du microbiote retrouvé sur la surface des longes de porc est la méthodologie utilisée (voir Chapitre 6 matériels et méthodes). En effet, trois échantillons du même lot ont été regroupés en amont du séquençage afin de réduire le nombre d'échantillons et parallèlement les coûts associés au séquençage. En regroupant ces échantillons, il n'est plus possible de mesurer statistiquement les différences de diversité entre les 8 lots à J21 (2 échantillons/lots). Toutefois, nous avons observé que les lots 1, 2, 3, 4 et 8 étaient regroupés près des échantillons de J1 présentaient des valeurs de diversités plus élevées lorsque comparées aux autres lots. Ces résultats n'étaient pas attendus. Il s'agit ici des échantillons contrôles qui ont été entreposés à la même température pendant les 56 jours d'entreposage et aucun écart de température n'a été observé. Nous pouvons alors penser qu'une différence de charge bactérienne au début de l'entreposage entre les lots pourrait expliquer la potentielle différence de diversité observée à J21.

Contrairement aux échantillons de surface de carcasses de porc pour lesquels nous avons observé que le microbiote différait entre plusieurs journées d'abattage, au premier jour de l'entreposage, le microbiote des longes de porc était similaire en termes de diversité, de structure et de

composition, pour les 8 lots échantillonnés lors de différentes visites. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'après l'étape de refroidissement, qu'une contamination croisée uniforme des surfaces des longes de porc intervient. Une des limites de l'étude est que l'échantillonnage des carcasses de porc après le refroidissement ne nous permet pas de conclure sur l'effet de la visite. De plus, ne sachant pas si le microbiote de surface de carcasse est similaire ou différent entre plusieurs lots de carcasses après l'étape de refroidissement, nous pouvons également émettre l'hypothèse que le microbiote de surface de carcasse est uniformisé dès la sortie de refroidissement des carcasses.

À la fin de l'entreposage des longes de porc, les résultats ont démontré que le microbiote différait significativement entre ces mêmes 8 lots et que les lots numéro 1 et 2 étaient prédominés par *Carnobacterium* et *Brochotrix*, respectivement, tandis que les autres lots étaient dominés par le genre *Lactobacillales_unclassified*. Encore là, les résultats étaient inattendus, car le microbiote au début de l'entreposage était similaire entre les lots, et que les échantillons ont été entreposés dans les mêmes conditions tout le long de l'entreposage (sans variation de température observée). Seules des méthodes indépendantes de la culture permettent de déterminer s'il y a une différence de diversité entre les différents lots à la fin de l'entreposage. Cette étude démontre que le dénombrement des bactéries pour déterminer la charge reste primordial pour tenter d'expliquer les résultats obtenus. Il serait alors intéressant d'envisager d'établir la charge bactérienne au début, ainsi qu'à la fin de l'entreposage. Il serait alors possible de préciser si les charges bactériennes sont différentes entre les différents lots, bien que le microbiote apparaisse similaire. Il a été observé que plus la diversité est faible, plus le risque que la viande de porc entreposée à 4°C dépasse les critères microbiologiques et soit altérée, est élevé [109]. Comme énoncé précédemment, l'hypothèse retenue pour expliquer les résultats est que la différence de charge bactérienne entre les lots au début du stockage est responsable de la différence de microbiote observée au jour 56. Ainsi, en suivant ce raisonnement, les lots 1 et 2 qui présentaient des indices de diversité plus élevés devraient montrer des charges bactériennes moins élevées que les autres lots. Il serait également intéressant de valider si des longes de porc emballées sous vide présentant les mêmes charges bactériennes présentent une diversité microbienne similaire.

Toujours pour les longes de porc, l'augmentation de la température d'entreposage de 2°C pendant 2 jours et de 10°C pendant 6 heures aux jours 15 et 29, qui imitait les défauts de régulation observés par l'industrie lors du transport des viandes, n'a montré aucun impact sur la diversité, la structure et la composition du microbiote de ces longes. Ces résultats ne confirment pas pour autant que les charges bactériennes sont similaires entre les différentes conditions d'entreposage.

Un des objectifs initiaux était d'identifier des marqueurs microbiens associés aux variations de température d'entreposage. Les buts étaient de caractériser des marqueurs microbiens au début de l'entreposage qui auraient été associés à une modification du microbiote en fonction de la température lors des 56 jours d'entreposage, mais aussi de pouvoir dire, grâce au microbiote de surface, si la viande arrivée à destination avait subi un abus de température ou non. Au regard des résultats obtenus, aucun indicateur bactérien n'a pu être mis en évidence. L'hypothèse retenue dans ce cas est que l'augmentation de la température n'était pas assez importante pour observer une modification du microbiote. L'échantillonnage étant volumineux et coûteux pour l'industriel, il serait envisageable dans le futur de tester préalablement sur un plus petit nombre d'échantillons si des longes de porc subissant un écart de température plus élevée présentent des modifications de leur microbiote. Il a été démontré que le microbiote de viande de porc non emballée sous vide entreposée à des températures de 10°C présentait une diversité plus élevée, accompagnée de la présence de bactéries mésophiles, comparativement à des échantillons entreposés à 4°C qui sont dominés par des bactéries psychrophiles [109]. Malgré la présence de problèmes dans la régulation de la température d'entreposage lors de l'expédition, la température est contrôlée et des actions correctives sont mises en place lors d'écarts. Ainsi, il est peu fréquent que la température d'entreposage excède les 15°C lors du transport, ce qui se rapproche de la température ambiante.

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent que pour ce type de produit, de telles variations de température pendant l'entreposage n'affectent pas le microbiote. Cependant,

comme mentionné dans le chapitre 6 à la section du matériel et méthodes, les échantillons qui ont subi des variations de température d'entreposage ont été regroupés au laboratoire, et nous ne pouvons donc pas exclure une perte de la variabilité au niveau du microbiote identifié lorsque nous les avons regroupés. Une autre perspective envisageable pour la suite de ce projet sera de déterminer si l'effet lot a un impact pour les groupes d'échantillons qui ont été entreposés aux différentes températures testées pour confirmer les hypothèses de cette étude.

7.4 La détection des bactéries pathogènes à la surface des carcasses et des longes

Pour chacun des objectifs de cette thèse, la détection des pathogènes, soit *Salmonella* spp. et *Listeria monocytogenes*, a été réalisée. L'objectif initial était de définir le lien entre la présence de bactéries pathogènes sur les carcasses et certains membres de la communauté microbienne. À la ferme, il a été mis en évidence que le microbiote intestinal variait entre des porcs sevrés naturellement infectés par *Salmonella* et des porcs non infectés [272]. Par exemple, il a été observé que les animaux infectés présentaient des abondances relatives plus élevées des genres *Lactobacillus* ou *Oscillospira*, lorsque comparés aux porcs non infectés présentant une abondance plus élevée des genres appartenant à *Clostridia* [273].

À l'abattoir, sur les carcasses de porc, une telle association microbiote-pathogène n'a jamais été étudiée. Dans cette thèse, la faible prévalence de *Salmonella* retrouvée à la surface des carcasses et des longes (8 % et < 1 % pour l'ensemble des sérotypes de *Salmonella* identifiés (*S. Derby*, *S. Typhimurium* et *S. Braenderup*) respectivement) et la prévalence nulle observée pour *L. monocytogenes* sur les longes ne nous ont pas permis de répondre à cet objectif. Une expérience *in vitro* permettant de contaminer artificiellement des surfaces de carcasses ou produits de viande de porc par *Salmonella* pourrait être une alternative. Cependant, les conditions réelles de l'environnement d'abattage ne peuvent pas être imitées et la contamination artificielle s'effectue à un instant t , tout en considérant que le microbiote peut évoluer en fonction de la croissance de

Salmonella, même en conditions *in vitro*. Au contraire, lors de notre échantillonnage, le microbiote était déjà établi pour chaque carcasse, qu'elle soit positive ou négative à la présence de *Salmonella*. Ainsi, un plus large échantillonnage sur plusieurs mois serait envisageable pour permettre d'augmenter la quantité d'échantillons de carcasses provenant de différents lots, pour ainsi obtenir une prévalence de carcasses ou de produits de viandes positifs plus élevés par rapport à ceux négatifs

Deux études ont prouvé l'utilité des méthodes de séquençage de l'ARNr 16S pour identifier des marqueurs microbiens associés à la présence de *Salmonella* dans l'environnement d'abattage et de transformation [35], ainsi que des marqueurs associés à la présence de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement de découpe porcins [274]. En effet, dans une étude conduite dans un abattoir en France, Bridier *et al.* ont utilisé le séquençage de l'ARNr 16S pour déterminer les changements du microbiote entre des échantillons positifs et négatifs à *Salmonella* prélevés au niveau de la machine à épiler, des fouets de la machine à gratter ou encore au niveau de la scie circulaire permettant d'ouvrir la carcasse [35]. L'analyse LEFSE a permis de d'établir que les genres *Enhydrobacter*, *Chryseobacterium*, *Aeromonas*, *Paracoccus*, *Stenotrophomonas* et *Soowooa* étaient significativement plus abondants dans les échantillons négatifs pour la présence de *Salmonella*. Au contraire, les genres *Acinetobacter*, *Hydrogenophilus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus* et *Comamonas* étaient significativement plus abondants dans les échantillons hébergeant *Salmonella*. La dominance du genre *Enhydrobacter* était corrélée à une absence de *Salmonella* lors de toutes les visites [35]. De plus, il a été démontré que l'utilisation des méthodes de séquençage de l'ARNr 16S a permis d'identifier un taxon microbien, *Veillonella*, comme déterminant de la présence de *Listeria monocytogenes* sur les surfaces de convoyeurs dans le même établissement d'abattage que celui visité dans le cadre de notre étude [274].

Caractériser la distribution bactérienne et identifier des marqueurs microbiens en fonction de la présence ou de l'absence d'agents pathogènes spécifiques d'origine alimentaire permettrait alors d'identifier des indicateurs possibles de la contamination des carcasses dans le but d'anticiper la

présence de ces dangers microbiens. De plus, il serait envisageable par la suite d'isoler les potentiels marqueurs microbiens et de tester l'existence d'interactions spécifiques avec les pathogènes pour confirmer que l'absence de ces derniers est due à une interaction antagoniste spécifique avec les marqueurs microbiens, indépendamment des étapes du processus d'abattage et de transformation qui permettent de réduire la contamination microbienne.

En ce qui concerne les résultats de séquençage de l'ARNr 16S, parmi les genres retrouvés à la surface des carcasses et des longes de porc, *Campylobacter* spp. et *Yersinia* spp., peuvent contenir des espèces pathogènes d'origine alimentaire. En effet, *Campylobacter jejuni* et *Yersinia enterocolitica* sont responsables de toxi-infections alimentaires chez l'humain [73].

Dans notre étude, le genre *Campylobacter* a été retrouvé à la surface des carcasses seulement avant le refroidissement. Il est connu que les porcs sont des porteurs asymptomatiques de l'espèce *Campylobacter coli* dans leur tractus intestinal. Bien que *Campylobacter jejuni* soit plus répandu chez les volailles, il a également été observé que cette espèce peut être retrouvée chez le porc [275–277]. Contrairement à *Salmonella*, l'épidémiologie de ce pathogène bactérien est mal connue chez le porc. Peu d'études ont établi la prévalence de ces deux espèces de *Campylobacter* à la surface des carcasses porcines [278–280]. Il a été constaté que les carcasses de porc étaient beaucoup plus souvent contaminées par *C. coli* que par *C. jejuni*. Récemment, les auteurs Wieczorek *et al.* ont identifié 34 % et 2 % d'échantillons positifs à *C. coli* et à *C. jejuni*, respectivement, sur des carcasses de porc [279]. De plus, aux États-Unis, il a été observé que 100 % des porcs étaient contaminés par *Campylobacter* à l'arrivée à l'abattoir (dans des échantillons rectaux), mais que la bactérie n'était plus détectée à la surface des carcasses après 24 heures de refroidissement [281]. Les viandes de porc peuvent aussi être contaminées et il a été rapporté dans deux études, en 2019 et 2015, des prévalences similaires d'environ 11 % [282,283]. Contrairement aux carcasses, les auteurs Korsak *et al.* ont observé que *C. jejuni* était l'espèce de *Campylobacter* la plus répandue dans les produits de viande de porc (69 %) [283].

Quant à *Yersinia*, une séquence assignée à ce genre a été identifiée dans le microbiote de surface des longes de porc emballées sous vide et entreposées à une température de $-1,5^{\circ}\text{C}$ dans notre étude. Grâce à un alignement de séquences avec l'outil BLAST, cette séquence a été identifiée comme appartenant à *Yersinia enterocolitica*. Il s'agit également d'une bactérie responsable de maladies humaines d'origine alimentaire et elle se retrouve naturellement dans les amygdales des porcs [24,284]. Il a été démontré *in vitro* que *Y. enterocolitica* est capable de survivre dans des viandes de porc emballées sous vide et entreposées à des températures de 2°C pendant 5 semaines, sans une augmentation de la charge bactérienne [19]. Les auteurs ont également suggéré que la croissance de *Y. enterocolitica* était inhibée par le pH, lorsque celui-ci est en dessous de 3, et que la présence de bactéries lactiques n'avait pas d'effet sur cette inhibition. Il a également été démontré que la bactérie est capable de survivre à des températures allant jusqu'à -5°C dans des conditions *in vitro*, mais également dans du porc haché non emballé sous vide et congelé à -20°C , lorsque la viande était inoculée avec une concentration de 10^7 UFC/g de *Yersinia*.

Cette thèse observe pour la première fois que le genre *Yersinia* est identifié dans des longes de porc emballées sous vide entreposées à des températures inférieures à 0°C . Sachant que certaines souches de *Y. enterocolitica* sont capables de croître et de survivre à des températures inférieures à 0°C (jusqu'à -2°C en fonction du pH), cela pourrait expliquer que dans notre étude, il a été observé que le genre *Yersinia* était plus fréquemment détecté sur des échantillons prélevés au jour 56 (42 %) par rapport au jour 1 (21 %). De plus, au jour 56, 38 % et 45 % des échantillons du groupe contrôle et ceux qui ont subi une augmentation de température, respectivement, contenaient la séquence de *Yersinia*.

De futures études en utilisant des méthodes de culture classique sur les produits de viande de porc dans cet établissement d'abattage seraient envisageables pour permettre de déterminer le taux de contamination des viandes par ces pathogènes. Les résultats obtenus avec les analyses de séquençage ne permettent pas de déterminer ce taux, mais ont pu alerter l'industriel sur le risque de contamination des carcasses et des viandes par *Campylobacter* et *Yersinia enterocolitica*. De futures études seraient envisageables pour évaluer l'effet de ces légers écarts de température

sur la présence et la croissance de *Yersinia* dans les viandes de porc entreposées à des températures inférieures à 0°C.

Complémentaire des méthodes de culture classique d'usage actuel à l'abattoir, les méthodes d'analyse taxonomique à l'aide du séquençage d'ADN de nouvelle génération se sont avérées utiles et avantageuses pour obtenir un portrait beaucoup plus exhaustif et précis de la diversité bactérienne retrouvée à la surface des carcasses et des longes de porc emballées sous vide et pour évaluer l'impact de différents facteurs.

Les résultats obtenus sont spécifiques de l'établissement d'abattage choisi. Il serait donc intéressant et pertinent d'étudier si ces résultats sont observés dans d'autres abattoirs porcins au Québec et si la composition bactérienne retrouvée dans nos études est représentative des carcasses et des produits finis de porc qui sont abattus et produits au Québec.

Il est important de mentionner que l'implantation de méthodes de séquençage directement dans les établissements d'abattage n'est pas réaliste à l'heure actuelle. Plusieurs défis demeurent importants avant de mettre à profit l'utilisation de ces méthodes dans l'industrie alimentaire. En effet, le besoin de formaliser et de normaliser les techniques d'échantillonnage, ainsi que le traitement et la gestion des données sont primordiales pour être en mesure de comparer les ensembles de données du microbiote des carcasses et des viandes à grande échelle. De plus, les coûts associés à l'utilisation des techniques de nouvelle génération sont encore relativement élevés, même s'ils diminuent depuis les dernières années. La quantité de données générées et la complexité des analyses à effectuer nécessitent des ressources spécialisées (personnel, équipements). L'utilisation de ces techniques dans le domaine de la qualité alimentaire peut présenter des avantages économiques potentiels. Par exemple, en février 2019, au Canada, il a été rapporté que l'utilisation du séquençage du génome entier, en remplacement des méthodes de typages classiques, permettant de détecter plus rapidement et précisément les salmonelles et de déterminer la sensibilité aux antimicrobiens en une seule analyse, pourrait réduire de 5

millions à 90 millions de dollars par an le coût global de la prise en charge des soins de santé liés aux éclosions de *Salmonella* associées aux produits frais, à la volaille et aux œufs [285].

Néanmoins, le séquençage de l'ARN 16S est un outil rapide qui peut ponctuellement s'avérer avantageux pour les industriels afin de connaître et mieux contrôler la composition et la diversité bactérienne attendues à chacune des étapes du procédé d'abattage et de transformation, et de comparer cette diversité en fonction du temps. De plus, cette méthode permettrait par exemple d'évaluer rapidement l'impact d'un nouveau procédé d'abattage ou de transformation sur la diversité bactérienne, autant sur les carcasses que dans l'environnement. Bien que le principal but des nouveaux procédés mis en place à l'abattoir (nouvelle procédure de désinfection, changement de la température d'échaudage par exemple) soit de réduire la contamination microbienne et par conséquent la charge bactérienne, la caractérisation du microbiote permet de déterminer l'impact de ces nouveaux procédés sur la diversité des bactéries potentiellement pathogènes ou responsable de l'altération.

Chapitre 8 – Conclusion

Le microbiote de surface de carcasses de porc et de produits finis entreposés à des températures de $-1,5^{\circ}\text{C}$ ont été pour la première fois caractérisés dans un abattoir de porc situé au Québec, Canada. Dans cette thèse, nous avons pu décrire la variabilité du microbiote de surface de carcasses en utilisant le séquençage à haut débit des gènes codant pour l'ARNr 16S, ainsi que des méthodes dépendantes de la culture bactérienne, et évaluer si ce microbiote variait et pouvait être associé à la ferme d'origine des animaux à la suite de l'abattage et l'habillage des carcasses. Nous avons observé que le microbiote de surface de carcasses de porc provenant de différents élevages et abattues sur une même journée était uniformisé lors du processus de transformation primaire, jusqu'à la douche précédent le refroidissement, et que les principaux genres bactériens retrouvés à la surface étaient des bactéries généralement associées aux microbiotes oral et intestinal des porcs.

Le deuxième objectif a permis de décrire l'évolution du microbiote de carcasses de porc sur une période de quatre semaines, et d'étudier l'impact du refroidissement sur ce microbiote. Les résultats obtenus par les méthodes de microbiologie classique nous ont permis d'observer que le procédé de transformation était maîtrisé lors des quatre semaines d'échantillonnage au regard des critères microbiologiques applicables aux carcasses et que la contamination microbienne était plus élevée dans les zones d'échantillonnage correspondant au cou de l'animal. Les résultats associés au séquençage nous ont permis d'observer que la diversité bactérienne était plus élevée dans les zones d'échantillonnage correspondant au jambon et que la composition et la structure du microbiote de surface des carcasses différaient en fonction de la journée d'abattage et du quart du travail. Le refroidissement des carcasses a été associé à une diminution légère de la contamination ainsi que de la diversité du microbiote.

Enfin, la caractérisation du microbiote de longes de porc emballées sous vide et soumises à différentes fluctuations de températures pendant 56 jours d'entreposage, selon une méthodologie correspondant au transport de produits carnés frais vers l'étranger, a permis de

montrer qu'un léger écart de température, suivi d'un retour à la normale, n'était pas suffisant pour affecter la diversité, ainsi que la composition et la structure de ce microbiote. Il n'a pas été possible de mettre en évidence des marqueurs microbiens associés à ces écarts de la température d'entreposage. De plus, le microbiote de surface provenant de huit différents lots de production était différent entre ces mêmes huit lots à la fin de l'entreposage, tandis qu'il apparaissait similaire au début de cette période d'entreposage. Ainsi, l'effet du lot semblait avoir un impact plus important sur le microbiote que les écarts de température appliqués aux longes pendant l'entreposage.

La prévalence de *Salmonella* et de *Listeria monocytogenes* était très faible, ce qui ne nous a pas permis de définir un potentiel lien entre la présence de bactéries pathogènes et certains membres de la communauté microbienne de la carcasse. La caractérisation du microbiote a permis d'identifier des genres bactériens potentiellement pathogènes pour l'humain qui n'étaient pas pris en compte par l'industriel, tels que *Campylobacter* spp. et *Yersinia* spp., tant à la surface des carcasses que celle des longes de porc. La caractérisation du microbiote nous a permis de déterminer que des bactéries du microbiote des carcasses telles qu'*Escherichia/Shigella* et *Lactobacillales_unclassified*, semblaient contribuer au microbiote retrouvé à la surface des longes de porc emballées sous vide, autant au début qu'à la fin de l'entreposage.

Les résultats obtenus offrent de nouvelles perspectives pour la mise en place de futures stratégies pour un contrôle plus précis de la qualité microbiologique des carcasses et de la viande de porc. L'identification de marqueurs microbiens spécifiques potentiellement associés à l'altération et/ou à la présence de pathogènes alimentaires pourrait améliorer l'évaluation de la qualité microbiologique des carcasses et des produits finis, et ainsi mener au développement de stratégies de prévention de la détérioration de la viande.

Références bibliographiques

1. OECD; Food and Agriculture Organization of the United Nations *OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031*; OECD-FAO Agricultural Outlook; OECD, 2022; ISBN 978-92-64-58870-7.
2. Gouvernement du Canada Porc Available online: <https://agriculture.canada.ca/fr/secteur/production-animale/information-marche-viandes-rouges/porc>.
3. Gouvernement du Québec Portrait-Diagnostic Sectoriel de l'industrie Porcine Available online: https://cdn-contenu.quebec.ca/cdn-contenu/adm/min/agriculture-pecheries-alimentation/agriculture/types-de-productions/ED_portrait_diagnostic_industrie_porcine_MAPAQ.pdf.
4. Doulgeraki, A.I.; Ercolini, D.; Villani, F.; Nychas, G.-J.E. Spoilage Microbiota Associated to the Storage of Raw Meat in Different Conditions. *International Journal of Food Microbiology* **2012**, *157*, 130–141, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020.
5. Baer, A.A.; Miller, M.J.; Dilger, A.C. Pathogens of Interest to the Pork Industry: A Review of Research on Interventions to Assure Food Safety: Pathogens of Pork Industry... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2013**, *12*, 183–217, doi:10.1111/1541-4337.12001.
6. Borch, E.; Kant-Muermans, M.-L.; Blixt, Y. Bacterial Spoilage of Meat and Cured Meat Products. *International Journal of Food Microbiology* **1996**, *33*, 103–120, doi:10.1016/0168-1605(96)01135-X.
7. Casaburi, A.; Piombino, P.; Nychas, G.-J.; Villani, F.; Ercolini, D. Bacterial Populations and the Volatilome Associated to Meat Spoilage. *Food Microbiology* **2015**, *45*, 83–102, doi:10.1016/j.fm.2014.02.002.
8. Gram, L.; Ravn, L.; Rasch, M.; Bruhn, J.B.; Christensen, A.B.; Givskov, M. Cen. *International Journal of Food Microbiology* **2002**, *78*, 79–97, doi:10.1016/S0168-1605(02)00233-7.
9. Nychas, G.-J.E.; Skandamis, P.N.; Tassou, C.C.; Koutsoumanis, K.P. Meat Spoilage during Distribution. *Meat Science* **2008**, *78*, 77–89, doi:10.1016/j.meatsci.2007.06.020.

10. Arguello, H.; Álvarez-Ordoñez, A.; Carvajal, A.; Rubio, P.; Prieto, M. Role of Slaughtering in Salmonella Spreading and Control in Pork Production. *Journal of Food Protection* **2013**, *76*, 899–911, doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-404.
11. Self, J.L.; Luna-Gierke, R.E.; Fothergill, A.; Holt, K.G.; Vieira, A.R. Outbreaks Attributed to Pork in the United States, 1998–2015. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 2980–2990, doi:10.1017/S0950268817002114.
12. Agence de la santé publique du Canada, Guelph (Ontario), 2022. *Programme Intégré Canadien de Surveillance de La Résistance Aux Antimicrobiens (PICRA) 2019 : Porcs.*; 2022;
13. Cayuela, J.; Gil, M.; Bañón, S.; Garrido, M. Effect of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on the Quality of Pork Loin. *Eur Food Res Technol* **2004**, *219*, doi:10.1007/s00217-004-0970-x.
14. Blixt, Y.; Borch, E. Comparison of Shelf Life of Vacuum-Packed Pork and Beef. *Meat Science* **2002**, *60*, 371–378, doi:10.1016/S0309-1740(01)00145-0.
15. Gómez, M.; Lorenzo, J.M. Effect of Packaging Conditions on Shelf-Life of Fresh Foal Meat. *Meat Science* **2012**, *91*, 513–520, doi:10.1016/j.meatsci.2012.03.007.
16. Qian, S.; Li, X.; Wang, H.; Sun, Z.; Zhang, C.; Guan, W.; Blecker, C. Effect of Sub-Freezing Storage (–6, –9 and –12 °C) on Quality and Shelf Life of Beef. *Int J Food Sci Technol* **2018**, *53*, 2129–2140, doi:10.1111/ijfs.13800.
17. Chenoll, E.; Macián, M.C.; Elizaquível, P.; Aznar, R. Lactic Acid Bacteria Associated with Vacuum-Packed Cooked Meat Product Spoilage: Population Analysis by RDNA-Based Methods. *J Appl Microbiol* **2007**, *102*, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03081.x.
18. Djordjević, J.; Bošković, M.; Starčević, M.; Ivanović, J.; Karabasil, N.; Dimitrijević, M.; Lazić, I.B.; Baltić, M.Ž. Survival of Salmonella Spp. in Minced Meat Packaged under Vacuum and Modified Atmosphere. *Brazilian Journal of Microbiology* **2018**, *49*, 607–613, doi:10.1016/j.bjm.2017.09.009.
19. Hayashidani, H.; Iwata, T.; Yamaguchi, S.; Hara-Kudo, Y.; Okatani, T.A.; Watanabe, M.; Lee, K.-I.; Kumagai, S. Survival of Pathogenic Yersinia Enterocolitica in Vacuum-Packed or Non-Vacuum-Packed Pork at Low Temperature. *Biocontrol Sci.* **2008**, *13*, 139–144, doi:10.4265/bio.13.139.

20. Holley, R.A.; Peirson, M.D.; Lam, J.; Tan, K.B. Microbial Profiles of Commercial, Vacuum-Packaged, Fresh Pork of Normal or Short Storage Life. *International Journal of Food Microbiology* **2004**, *97*, 53–62, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.029.
21. Pennacchia, C.; Ercolini, D.; Villani, F. Spoilage-Related Microbiota Associated with Chilled Beef Stored in Air or Vacuum Pack. *Food Microbiology* **2011**, *28*, 84–93, doi:10.1016/j.fm.2010.08.010.
22. Bolton, D.J.; Pearce, R.A.; Sheridan, J.J.; Blair, I.S.; McDowell, D.A.; Harrington, D. Washing and Chilling as Critical Control Points in Pork Slaughter Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems. *J Appl Microbiol* **2002**, *92*, 893–902, doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01599.x.
23. Gill, C.O.; Bryant, J. The Contamination of Pork with Spoilage Bacteria during Commercial Dressing, Chilling and Cutting of Pig Carcasses. *International Journal of Food Microbiology* **1992**, *16*, 51–62, doi:10.1016/0168-1605(92)90125-M.
24. Laukkanen, R.; Martínez, P.O.; Siekkinen, K.-M.; Ranta, J.; Maijala, R.; Korkeala, H. Contamination of Carcasses with Human Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* 4/O:3 Originates from Pigs Infected on Farms. *Foodborne Pathogens and Disease* **2009**, *6*, 681–688, doi:10.1089/fpd.2009.0265.
25. Piras, F.; Fois, F.; Mazza, R.; Putzolu, M.; Delogu, M.L.; Lochi, P.G.; Pani, S.P.; Mazzette, R. Salmonella Prevalence and Microbiological Contamination of Pig Carcasses and Slaughterhouse Environment. *Ital J Food Safety* **2014**, *3*, doi:10.4081/ijfs.2014.4581.
26. Rivas, T.; Vizcaíno, J.A.; Herrera, F.J. Microbial Contamination of Carcasses and Equipment from an Iberian Pig Slaughterhouse. *Journal of Food Protection* **2000**, *63*, 1670–1675, doi:10.4315/0362-028X-63.12.1670.
27. Spescha, C.; Stephan, R.; Zweifel, C. Microbiological Contamination of Pig Carcasses at Different Stages of Slaughter in Two European Union–Approved Abattoirs. *Journal of Food Protection* **2006**, *69*, 2568–2575, doi:10.4315/0362-028X-69.11.2568.
28. Wheatley, P.; Giotis, E.S.; McKeivitt, A.I. Effects of Slaughtering Operations on Carcass Contamination in an Irish Pork Production Plant. *irvetj* **2014**, *67*, 1, doi:10.1186/2046-0481-67-1.

29. Zweifel, C.; Fischer, R.; Stephan, R. Microbiological Contamination of Pig and Cattle Carcasses in Different Small-Scale Swiss Abattoirs. *Meat Science* **2008**, *78*, 225–231, doi:10.1016/j.meatsci.2007.06.025.
30. Bonardi, S.; Bolzoni, L.; Brindani, F.; Scaltriti, E.; Cavallini, P.; Giuseppe, C.; Pongolini, S. *Salmonella* Detection and Counting on Pig Carcasses and Cutting Lines in Italian Slaughterhouses. *Foodborne Pathogens and Disease* **2018**, *15*, 339–345, doi:10.1089/fpd.2017.2375.
31. Borch, E.; Nesbakken, T.; Christensen, H. Hazard Identification in Swine Slaughter with Respect to Foodborne Bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **1996**, *30*, 9–25, doi:10.1016/0168-1605(96)00988-9.
32. Botteldoorn, N.; Heyndrickx, M.; Rijpens, N.; Grijspeerdt, K.; Herman, L. Salmonella on Pig Carcasses: Positive Pigs and Cross Contamination in the Slaughterhouse. *J Appl Microbiol* **2003**, *95*, 891–903, doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02042.x.
33. Warriner, K.; Aldsworth, T.G.; Kaur, S.; Dodd, C.E.R. Cross-Contamination of Carcasses and Equipment during Pork Processing. *Journal of Applied Microbiology* **2002**, *93*, 169–177, doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01678.x.
34. Zwirzitz, B.; Wetzels, S.U.; Dixon, E.D.; Stessl, B.; Zaiser, A.; Rabanser, I.; Thalgueter, S.; Pinior, B.; Roch, F.-F.; Strachan, C.; et al. The Sources and Transmission Routes of Microbial Populations throughout a Meat Processing Facility. *npj Biofilms Microbiomes* **2020**, *6*, 26, doi:10.1038/s41522-020-0136-z.
35. Bridier, A.; Le Grandois, P.; Moreau, M.-H.; Prénom, C.; Le Roux, A.; Feurer, C.; Soumet, C. Impact of Cleaning and Disinfection Procedures on Microbial Ecology and Salmonella Antimicrobial Resistance in a Pig Slaughterhouse. *Sci Rep* **2019**, *9*, 12947, doi:10.1038/s41598-019-49464-8.
36. Basse, A.P.; Chen, Y.; Boateng, E.F.; Zhang, Y.; Diao, X.; Nasiru, M.M.; Tang, C.; Ye, K.; Li, C.; Zhou, G. Evaluation of Physicochemical, Microbiological, and Sensory Profiles of Vacuum-Packed Cooked Low-Salt Pork Belly under Refrigeration and Room-Temperature Storage. *LWT* **2022**, *167*, 113847, doi:10.1016/j.lwt.2022.113847.

37. Ercolini, D.; Russo, F.; Torrieri, E.; Masi, P.; Villani, F. Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Appl Environ Microbiol* **2006**, *72*, 4663–4671, doi:10.1128/AEM.00468-06.
38. Iulietto, M.F.; Sechi, P.; Borgogni, E.; Cenci-Goga, B.T. Meat Spoilage: A Critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. *Italian Journal of Animal Science* **2015**, *14*, 4011, doi:10.4081/ijas.2015.4011.
39. Gouvernement du Canada Consommation de Viande et Protéine Animale Available online: <https://agriculture.canada.ca/fr/secteur/production-animale/information-marche-viandes-rouges/consommation-viande-proteine-animale>.
40. MAPAQ VIANDES À L'ÉPICERIE : PRÉFÉRENCES DES QUÉBÉCOIS PENDANT LA PANDÉMIE DE COVID-19 ET EN CONTEXTE INFLATIONNISTE 2022.
41. Pluske, J.R.; Mullan, B.P.; Kim, J.C.; Hampson, D.J. Differential Impacts of Cereal and Protein Sources Fed to Pigs after Weaning on Diarrhoea and Faecal Shedding of Escherichia Coli, Production, and Total Tract Apparent Digestibility. *Animals* **2023**, *13*, 863, doi:10.3390/ani13050863.
42. pork checkoff Life Cycle of a Market Pig Available online: <https://porkcheckoff.org/pork-branding/facts-statistics/life-cycle-of-a-market-pig/>.
43. Gouvernement du Canada Règlement Sur La Salubrité Des Aliments Au Canada. PARTIE 6 Exigences Propres à Certaines Denrées. SECTION 7 Produits de Viande et Animaux Pour Alimentation Humaine Available online: <https://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/DORS-2018-108/page-10.html>.
44. Gouvernement du Québec Document d'orientation Sur Les Postes d'inspection de l'Agence Canadienne d'inspection Des Aliments Lors Des Opérations d'abattage Des Animaux Pour Alimentation Humaine et Leurs Produits de Viande Available online: <https://inspection.canada.ca/exigences-et-documents-d-orientation-relatives-a-c/produits-de-viande-et-animaux-pour-alimentation-hu/l-acia-lors-des-operations-d-abattage/fra/1550250803810/1550250952413>.
45. ACIA Mechanical, Electrical or Gas Stunning; Slaughter Methods and Monitoring Signs of Unconsciousness or Consciousness Available online: [265](https://inspection.canada.ca/food-

</div>
<div data-bbox=)

guidance-by-commodity/meat-products-and-food-animals/slaughter-methods-and-monitoring/eng/1539372028443/1539372028884?chap=0.

46. ACIA Chapitre 17 - Procédures Ante Mortem et Post Mortem, Dispositions, Surveillance et Contrôles - Animaux à Viande Rouge, Autruches, Nandous et Émeus. 17.6 Opérations d'abattage Available online: <https://inspection.canada.ca/salubrite-alimentaire-pour-l-industrie/directives-archivees-sur-les-aliments/produits-de-viande-et-de-volaille/manuel-des-methodes/chapitre-17/fra/1367723343665/1367723573062?chap=7>.
47. Gouvernement du Canada Exigences En Matière d'étiquetage Des Produits de Viande et de Volaille Available online: <https://inspection.canada.ca/etiquetage-des-aliments/etiquetage/industrie/produits-de-viande-et-de-volaille/fra/1632494849908/1632495277194>.
48. MAPAQ Viandes et Volailles ExigEncEs RégEmEntairEs Pour ExportEr Aux États-Unis Available online: https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Viandes_et_volailles.pdf.
49. Cheroual, E.A. Les Altérations Alimentaires Available online: <https://fmedecine.univ-setif.dz/ProgrammeCours/Les%20altérations%20alimentaires%202020%20Cours%20hydr-obromatologie%205eme%20année%20pharmacie%20Dr%20CHEROUAL.pdf>.
50. Cenci-Goga, B.T.; Karama, M.; Sechi, P.; Iulietto, M.F.; Novelli, S.; Mattei, S. *Journal of Dairy Science* **2014**, *97*, 6708–6718, doi:10.3168/jds.2014-8611.
51. Koutsoumanis, K. Modeling Food Spoilage in Microbial Risk Assessment. *Journal of Food Protection* **2009**, *72*, 425–427, doi:10.4315/0362-028X-72.2.425.
52. Remenant, B.; Jaffrès, E.; Dousset, X.; Pilet, M.-F.; Zagorec, M. Bacterial Spoilers of Food: Behavior, Fitness and Functional Properties. *Food Microbiology* **2015**, *45*, 45–53, doi:10.1016/j.fm.2014.03.009.
53. Dimassi, O.; Rizq, M.; Akiki, R.; Hajj, F.E.; Rached, M.; Kaddoura, I. Generation Time, D and Z - Values of *Pseudomonas Fluorescens* under Different Temperature, Water Activity and PH Conditions. *IJAEMS* **2020**, *6*, 117–123, doi:10.22161/ijaems.63.3.
54. Lick, S.; Kröckel, L.; Wibberg, D.; Winkler, A.; Blom, J.; Bantleon, A.; Goesmann, A.; Kalinowski, J. *Pseudomonas Carnis* Sp. Nov., Isolated from Meat. *International Journal of*

Systematic and Evolutionary Microbiology **2020**, *70*, 1528–1540, doi:10.1099/ijsem.0.003928.

55. Casaburi, A.; Nasi, A.; Ferrocino, I.; Di Monaco, R.; Mauriello, G.; Villani, F.; Ercolini, D. Spoilage-Related Activity of Carnobacterium Maltaromaticum Strains in Air-Stored and Vacuum-Packed Meat. *Appl Environ Microbiol* **2011**, *77*, 7382–7393, doi:10.1128/AEM.05304-11.
56. Stanborough, T.; Fegan, N.; Powell, S.M.; Tamplin, M.; Chandry, P.S. Insight into the Genome of Brochothrix Thermosphacta, a Problematic Meat Spoilage Bacterium. *Appl Environ Microbiol* **2017**, *83*, e02786-16, doi:10.1128/AEM.02786-16.
57. Zagorec, M.; Champomier-Vergès, M.-C. Meat Microbiology and Spoilage. In *Lawrie's Meat Science*; Elsevier, 2023; pp. 195–218 ISBN 978-0-323-85408-5.
58. Zhao, F.; Zhou, G.; Ye, K.; Wang, S.; Xu, X.; Li, C. Microbial Changes in Vacuum-Packed Chilled Pork during Storage. *Meat Science* **2015**, *100*, 145–149, doi:10.1016/j.meatsci.2014.10.004.
59. Cauchie, E.; Delhalle, L.; Taminiau, B.; Tahiri, A.; Korsak, N.; Burtéau, S.; Fall, P.A.; Farnir, F.; Baré, G.; Daube, G. Assessment of Spoilage Bacterial Communities in Food Wrap and Modified Atmospheres-Packed Minced Pork Meat Samples by 16S RDNA Metagenetic Analysis. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 3074, doi:10.3389/fmicb.2019.03074.
60. Hernández-Macedo, M.L.; Contreras-Castillo, C.J.; Tsai, S.M.; Da Cruz, S.H.; Sarantopoulos, C.I.G.L.; Padula, M.; Dias, C.T.S. Gases and Volatile Compounds Associated with Micro-Organisms in Blown Pack Spoilage of Brazilian Vacuum-Packed Beef. *Lett Appl Microbiol* **2012**, *55*, 467–475, doi:10.1111/lam.12004.
61. Organisation Mondiale de la Santé * Sécurité Sanitaire Des Aliments Available online: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
62. Agence de la santé publique du Canada Infographique : Maladies d'origine Alimentaire, Hospitalisations et Décès Au Canada Available online: <https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/healthy-canadians/migration/publications/eating-nutrition/foodborne-illness-infographic-maladies-origine-alimentaire-infographie/alt/pub-fra.pdf>.

63. Santé Canada Maladie d'origine Alimentaire Au Canada Available online: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladie-origine-alimentaire-canada/estimations-annuelles-maladies-origine-alimentaire-canada.html>.
64. Burall, L.S.; Grim, C.J.; Mammel, M.K.; Datta, A.R. A Comprehensive Evaluation of the Genetic Relatedness of *Listeria Monocytogenes* Serotype 4b Variant Strains. *Front. Public Health* **2017**, *5*, 241, doi:10.3389/fpubh.2017.00241.
65. Ramaswamy, V.; Cresence, V.M.; Rejitha, J.S.; Lekshmi, M.; Dharsana, K.; Prasad, S.P.; Vijila, H.M. *Listeria*—Review of Epidemiology and Pathogenesis. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* **2007**, *40* 1, 4–13.
66. Hoffmann, S.; Ahn, J.W. *Updating Economic Burden of Foodborne Diseases Estimates for Inflation and Income Growth*; USDA, 2021; p. (No. 1962-2021-3214).;
67. Santé Canada Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – *Salmonella Enterica* Spp. Available online: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/salmonella-enterica.html>.
68. Bonardi, S. *Salmonella* in the Pork Production Chain and Its Impact on Human Health in the European Union. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 1513–1526, doi:10.1017/S095026881700036X.
69. Eng, S.-K.; Pusparajah, P.; Ab Mutalib, N.-S.; Ser, H.-L.; Chan, K.-G.; Lee, L.-H. *Salmonella* : A Review on Pathogenesis, Epidemiology and Antibiotic Resistance. *Frontiers in Life Science* **2015**, *8*, 284–293, doi:10.1080/21553769.2015.1051243.
70. Bergholz, T.M.; Shah, M.K.; Burall, L.S.; Rakic-Martinez, M.; Datta, A.R. Genomic and Phenotypic Diversity of *Listeria Monocytogenes* Clonal Complexes Associated with Human Listeriosis. *Appl Microbiol Biotechnol* **2018**, *102*, 3475–3485, doi:10.1007/s00253-018-8852-5.
71. Chlebicz, A.; Ślizewska, K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *IJERPH* **2018**, *15*, 863, doi:10.3390/ijerph15050863.

72. Sabina, Y.; Rahman, A.; Ray, R.C.; Montet, D. *Yersinia Enterocolitica* : Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. *Journal of Pathogens* **2011**, *2011*, 1–10, doi:10.4061/2011/429069.
73. Bari, Md.L.; Hossain, M.A.; Isshiki, K.; Ukuku, D. Behavior of *Yersinia Enterocolitica* in Foods. *Journal of Pathogens* **2011**, *2011*, 1–13, doi:10.4061/2011/420732.
74. Grimont, P.A.D.; Weill, F.X. Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars. **2007**, *9th Edition*, World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris.
75. ANSES Attribution Des Sources Des Maladies Infectieuses d'origine Alimentaire Partie 2 : Analyse Des Données Épidémiologiques; 2018;
76. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA* **2022**, *20*, doi:10.2903/j.efsa.2022.7666.
77. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA* **2021**, *19*, doi:10.2903/j.efsa.2021.6406.
78. Ayres Hutter, J.; Arsenault, J.; Bekal, S.; Brassard, J.; Gariépy, C. *Portrait Des Zoonoses Entériques Au Québec, 2000-2017*; Institut national de santé publique du Québec, 2020;
79. ACIA FoodNet Canada: Site Sentinelle de La Montérégie Available online: <https://extranet.santemonteregie.qc.ca/userfiles/file/sante-publique/maladies-infectieuses/Bilan-FoodNet-Vol2-2019.pdf>.
80. Biasino, W.; De Zutter, L.; Mattheus, W.; Bertrand, S.; Uyttendaele, M.; Van Damme, I. Correlation between Slaughter Practices and the Distribution of Salmonella and Hygiene Indicator Bacteria on Pig Carcasses during Slaughter. *Food Microbiology* **2018**, *70*, 192–199, doi:10.1016/j.fm.2017.10.003.
81. Agence de la santé publique du Canada *FOODNET CANADA RAPPORT ANNUEL 2018*; 2019;
82. Prescott, L.M.; Willey, J.M.; Sherwood, L.M.; Woolverton, C.J. *Microbiologie*; De Boeck Supérieur.; 2018;

83. MAPAQ Lignes Directrices et Normes Pour l'interprétation Des Résultats Analytiques En Microbiologie Alimentaire 2019.
84. Regulation (EC) No 2073/2005 Règlement (CE) No 2073/2005 de La Commission Du 15 Novembre 2005 Concernant Les Critères Microbiologiques Applicables Aux Denrées Alimentaires (Texte Présentant de l'intérêt Pour l'EEE). *Journal officiel de l'Union européenne* 2005.
85. ISO 6579-1:2017 Microbiologie de La Chaîne Alimentaire — Méthode Horizontale Pour La Recherche, Le Dénombrement et Le Sérotypage Des Salmonella — Partie 1: Recherche Des Salmonella Spp. Available online: <https://www.iso.org/fr/standard/56712.html#:~:text=ISO%206759%2D1%3A2017%20spécifie,la%20manutention%20de%20denrées%20alimentaires>.
86. ISO 4833-2:2013 Microbiologie de La Chaîne Alimentaire — Méthode Horizontale Pour Le Dénombrement Des Micro-Organismes — Partie 2: Comptage Des Colonies à 30 °C Par La Technique d'ensemencement En Surface Available online: <https://www.iso.org/fr/standard/59509.html>.
87. ISO 21528-2:2004 Microbiologie Des Aliments — Méthodes Horizontales Pour La Recherche et Le Dénombrement Des Enterobacteriaceae — Partie 2: Méthode Par Comptage Des Colonies Available online: <https://www.iso.org/fr/standard/34566.html#:~:text=L%27ISO%2021528%2D2%3A,et%20la%20distribution%20des%20aliments>.
88. ACIA Annexe T-1 : Directive de Conformité – Exigences de Surveillance Microbiologique Des Procédés Dans Les Abattoirs de Bétail et de Ratites Available online: <https://inspection.canada.ca/exportation-d-aliments-de-plantes-ou-d-animaux/exportations-d-aliments/exigences/exigences-d-exportation-pour-les-produits-de-viand/annexe-t-1/fra/1594664700798/1594664701605>.
89. Mrdovic, B.; Raseta, M.; Brankovic-Lazic, I.; Milijasevic, M.; Baltic, B.; Nastasijevic, I. Pigs and Cattle Slaughter Process Hygiene in a Large-Scale and Small-Scale Abattoir: A Report from One County in Serbia. *Scientific journal "Meat Technology&quot;*; **2018**, *58*, 65–72.

90. Lenahan, M.; Crowley, H.; O'Brien, S.B.; Byrne, C.; Sweeney, T.; Sheridan, J.J. The Potential Use of Chilling to Control the Growth of *Enterobacteriaceae* on Porcine Carcasses and the Incidence of *E. Coli* O157:H7 in Pigs. *Journal of Applied Microbiology* **2009**, *106*, 1512–1520, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04112.x.
91. Pearce, R.A.; Bolton, D.J.; Sheridan, J.J.; McDowell, D.A.; Blair, I.S.; Harrington, D. Studies to Determine the Critical Control Points in Pork Slaughter Hazard Analysis and Critical Control Point Systems. *International Journal of Food Microbiology* **2004**, 331–339.
92. Moura-Alves, M.; Carvalho, M.; Baggio Ribeiro, D.H.; Barbosa, J.; Silveira, L.; Pista, Â.; Pinto, H.P.; Saraiva, C.; Teixeira, P.; Esteves, A. Hygiene Indicators and Salmonellae on Surfaces of Swine Carcasses from Two Slaughterhouses in Northern Portugal. *Journal of Food Protection* **2022**, *85*, 1566–1575, doi:10.4315/JFP-21-312.
93. Zweifel, C.; Baltzer, D.; Stephan, R. Microbiological Contamination of Cattle and Pig Carcasses at Five Abattoirs Determined by Swab Sampling in Accordance with EU Decision 2001/471/EC. *Meat Science* **2005**, *69*, 559–566, doi:10.1016/j.meatsci.2004.10.007.
94. Bueno López, R.; Vargas, D.A.; Jimenez, R.L.; Casas, D.E.; Miller, M.F.; Brashears, M.M.; Sanchez-Plata, M.X. Quantitative Bio-Mapping of Salmonella and Indicator Organisms at Different Stages in a Commercial Pork Processing Facility. *Foods* **2022**, *11*, 2580, doi:10.3390/foods11172580.
95. Van Ba, H.; Seo, H.-W.; Seong, P.-N.; Kang, S.-M.; Cho, S.-H.; Kim, Y.-S.; Park, B.-Y.; Moon, S.-S.; Kang, S.-J.; Choi, Y.-M.; et al. The Fates of Microbial Populations on Pig Carcasses during Slaughtering Process, on Retail Cuts after Slaughter, and Intervention Efficiency of Lactic Acid Spraying. *International Journal of Food Microbiology* **2019**, *294*, 10–17, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.015.
96. Bohaychuk, V.M.; Gensler, G.E.; Barrios, P.R. Microbiological Baseline Study of Beef and Pork Carcasses from Provincially Inspected Abattoirs in Alberta, Canada. *Can. Vet. J.* **2011**, *52*, 1095–1100.
97. Betic, N.; Baltic, T.; Ciric, J.; Bajcic, A.; Raseta, M.; Mrdovic, B.; Karabasil, N. Process Hygiene of Pig Carcasses in One Large-Scale Slaughterhouse in the West of Serbia, during 48

- Months. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **2019**, 333, 012046, doi:10.1088/1755-1315/333/1/012046.
98. Petruzzelli, A.; Osimani, A.; Pasquini, M.; Clementi, F.; Vetrano, V.; Paolini, F.; Fogliani, M.; Micci, E.; Paoloni, A.; Tonucci, F. Trends in the Microbial Contamination of Bovine, Ovine and Swine Carcasses in Three Small-Scale Abattoirs in Central Italy: A Four-Year Monitoring. *Meat Science* **2016**, 111, 53–59, doi:10.1016/j.meatsci.2015.08.016.
99. Visciano, P.; Schirone, M.; Olivastri, A.M.A.; Verdecchia, E.; Paparella, A. Levels of Microbial Contamination of Swine Carcasses along the Slaughtering Process Line. *J Consum Prot Food Saf* **2020**, 15, 271–276, doi:10.1007/s00003-020-01276-z.
100. Rizzotto, D.; Montes, J.H.; Kich, J.D.; Peripolli, V.; Bianchi, I.; Oliveira Júnior, J.M. de; Duval, E.H.; Schwegler, E.; Moreira, F. Salmonella Enterica and Enterobacteria in Pig Carcasses Processed on Different Slaughter Days. *Pesq. agropec. bras.* **2022**, 57, e02813, doi:10.1590/s1678-3921.pab2022.v57.02813.
101. Bryant, J.; Brereton, D.A.; Gill, C.O. Implementation of a Validated HACCP System for the Control of Microbiological Contamination of Pig Carcasses at a Small Abattoir. *Can Vet J* **2003**, 44, 51–55.
102. Namvar, A.; Warriner, K. Application of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus–Polymerase Chain Reaction to Trace the Fate of Generic Escherichia Coli within a High Capacity Pork Slaughter Line. *International Journal of Food Microbiology* **2006**, 108, 155–163, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.006.
103. Peruzzy, M.F.; Houf, K.; Joossens, M.; Yu, Z.; Proroga, Y.T.R.; Murru, N. Evaluation of Microbial Contamination of Different Pork Carcass Areas through Culture-Dependent and Independent Methods in Small-Scale Slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* **2021**, 336, 108902, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108902.
104. Hamilton, D.; Holds, G.; Lorimer, M.; Kiermeier, A.; Kidd, C.; Slade, J.; Pointon, A. Slaughterfloor Decontamination of Pork Carcasses with Hot Water or Acidified Sodium Chlorite - A Comparison in Two Australian Abattoirs: Slaughterfloor Decontamination of Pork Carcasses. *Zoonoses and Public Health* **2010**, 57, 16–22, doi:10.1111/j.1863-2378.2010.01359.x.

105. Tomović, V.M.; Petrović, L.S.; Džinić, N.R. Effects of Rapid Chilling of Carcasses and Time of Deboning on Weight Loss and Technological Quality of Pork Semimembranosus Muscle. *Meat Science* **2008**, *80*, 1188–1193, doi:10.1016/j.meatsci.2008.05.013.
106. Li, N.; Zhang, Y.; Wu, Q.; Gu, Q.; Chen, M.; Zhang, Y.; Sun, X.; Zhang, J. High-Throughput Sequencing Analysis of Bacterial Community Composition and Quality Characteristics in Refrigerated Pork during Storage. *Food Microbiology* **2019**, *83*, 86–94, doi:10.1016/j.fm.2019.04.013.
107. Stellato, G.; La Stora, A.; De Filippis, F.; Borriello, G.; Villani, F.; Ercolini, D. Overlap of Spoilage-Associated Microbiota between Meat and the Meat Processing Environment in Small-Scale and Large-Scale Retail Distributions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 4045–4054, doi:10.1128/AEM.00793-16.
108. Wang, X.; Deng, Y.; Sun, J.; Ding, Y.; Liu, Y.; Tian, T. Unraveling Characterizations of Bacterial Community and Spoilage Profiles Shift in Chilled Pork during Refrigerated Storage. *Food Sci. Technol* **2022**, *42*, e80321, doi:10.1590/fst.80321.
109. Zhao, F.; Wei, Z.; Zhou, G.; Kristiansen, K.; Wang, C. Effects of Different Storage Temperatures on Bacterial Communities and Functional Potential in Pork Meat. *Foods* **2022**, *11*, 2307, doi:10.3390/foods11152307.
110. Andritsos, N.D.; Mataragas, M.; Mavrou, E.; Stamatiou, A.; Drosinos, E.H. The Microbiological Condition of Minced Pork Prepared at Retail Stores in Athens, Greece. *Meat Science* **2012**, *91*, 486–489, doi:10.1016/j.meatsci.2012.02.036.
111. Koo, O.-K.; Baker, C.A.; Kim, H.-J.; Park, S.H.; Ricke, S.C. Metagenomic Assessment of the Microbial Diversity in Ground Pork Products from Markets in the North Central Region of South Korea. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **2016**, *51*, 622–627, doi:10.1080/03601234.2016.1181910.
112. Luong, N.-D.M.; Jeuge, S.; Coroller, L.; Feurer, C.; Desmonts, M.-H.; Moriceau, N.; Anthoine, V.; Gavignet, S.; Rapin, A.; Frémaux, B.; et al. Spoilage of Fresh Turkey and Pork Sausages: Influence of Potassium Lactate and Modified Atmosphere Packaging. *Food Research International* **2020**, *137*, 109501, doi:10.1016/j.foodres.2020.109501.

113. Martínez, L.; Djenane, D.; Cilla, I.; Beltrán, J.A.; Roncalés, P. Effect of Varying Oxygen Concentrations on the Shelf-Life of Fresh Pork Sausages Packaged in Modified Atmosphere. *Food Chemistry* **2006**, *94*, 219–225, doi:10.1016/j.foodchem.2004.11.007.
114. Peruzý, M.F.; Murru, N.; Yu, Z.; Cnockaert, M.; Joossens, M.; Proroga, Y.T.R.; Houf, K. Determination of the Microbiological Contamination in Minced Pork by Culture Dependent and 16S Amplicon Sequencing Analysis. *International Journal of Food Microbiology* **2019**, *290*, 27–35, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.025.
115. Pérez-Rodríguez, F.; Castro, R.; Posada-Izquierdo, G.D.; Valero, A.; Carrasco, E.; García-Gimeno, R.M.; Zurera, G. Evaluation of Hygiene Practices and Microbiological Quality of Cooked Meat Products during Slicing and Handling at Retail. *Meat Science* **2010**, *86*, 479–485, doi:10.1016/j.meatsci.2010.05.038.
116. Raimondi, S.; Nappi, M.R.; Sirangelo, T.M.; Leonardi, A.; Amaretti, A.; Ulrici, A.; Magnani, R.; Montanari, C.; Tabanelli, G.; Gardini, F.; et al. Bacterial Community of Industrial Raw Sausage Packaged in Modified Atmosphere throughout the Shelf Life. *International Journal of Food Microbiology* **2018**, *280*, 78–86, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.041.
117. Jiang, Y.; Gao, F.; Xu, X.L.; Su, Y.; Ye, K.P.; Zhou, G.H. Changes in the Bacterial Communities of Vacuum-Packaged Pork during Chilled Storage Analyzed by PCR–DGGE. *Meat Science* **2010**, *86*, 889–895, doi:10.1016/j.meatsci.2010.05.021.
118. Knox, B.L.; van Laack, R.L.J.M.; Davidson, P.M. Relationships between Ultimate PH and Microbial, Chemical, and Physical Characteristics of Vacuum-Packaged Pork Loins. *J Food Science* **2008**, *73*, M104–M110, doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00667.x.
119. Hultman, J.; Rahkila, R.; Ali, J.; Rousu, J.; Björkroth, K.J. Meat Processing Plant Microbiome and Contamination Patterns of Cold-Tolerant Bacteria Causing Food Safety and Spoilage Risks in the Manufacture of Vacuum-Packaged Cooked Sausages. *Appl Environ Microbiol* **2015**, *81*, 7088–7097, doi:10.1128/AEM.02228-15.
120. University of Belgrade, Department of Food Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia; Djordjević, J.; Bošković, M.; Branković Lazić, I.; Djordjević, V.; Baltić, T.; Laudanović, M.; Baltić, M. Spoilage-Related Bacteria of Pork and Beef Minced Meat under Vacuum and

- Modified Atmosphere. *Rom Biotechnol Lett.* **2019**, *24*, 658–668, doi:10.25083/rbl/24.4/658.668.
121. Bassey, A.P.; Chen, Y.; Zhu, Z.; Odeyemi, O.A.; Gao, T.; Olusola, O.O.; Ye, K.; Li, C.; Zhou, G. Evaluation of Spoilage Indexes and Bacterial Community Dynamics of Modified Atmosphere Packaged Super-Chilled Pork Loins. *Food Control* **2021**, *130*, 108383, doi:10.1016/j.foodcont.2021.108383.
 122. Bassey, A.P.; Chen, Y.; Zhu, Z.; Odeyemi, O.A.; Frimpong, E.B.; Ye, K.; Li, C.; Zhou, G. Assessment of Quality Characteristics and Bacterial Community of Modified Atmosphere Packaged Chilled Pork Loins Using 16S rRNA Amplicon Sequencing Analysis. *Food Research International* **2021**, *145*, 110412, doi:10.1016/j.foodres.2021.110412.
 123. Geeraerts, W.; Pothakos, V.; De Vuyst, L.; Leroy, F. Diversity of the Dominant Bacterial Species on Sliced Cooked Pork Products at Expiration Date in the Belgian Retail. *Food Microbiology* **2017**, *65*, 236–243, doi:10.1016/j.fm.2017.03.007.
 124. Liu, F.; Yang, R.-Q.; Li, Y.-F. Correlations between Growth Parameters of Spoilage Micro-Organisms and Shelf-Life of Pork Stored under Air and Modified Atmosphere at –2, 4 and 10°C. *Food Microbiology* **2006**, *23*, 578–583, doi:10.1016/j.fm.2005.10.002.
 125. Torrieri, E.; Russo, F.; Di Monaco, R.; Cavella, S.; Villani, F.; Masi, F. Shelf Life Prediction of Fresh Italian Pork Sausage Modified Atmosphere Packed. *Food sci. technol. int.* **2011**, *17*, 223–232, doi:10.1177/1082013210382328.
 126. Zhao, S.; Li, N.; Li, Z.; He, H.; Zhao, Y.; Zhu, M.; Wang, Z.; Kang, Z.; Ma, H. Shelf Life of Fresh Chilled Pork as Affected by Antimicrobial Intervention with Nisin, Tea Polyphenols, Chitosan, and Their Combination. *International Journal of Food Properties* **2019**, *22*, 1047–1063, doi:10.1080/10942912.2019.1625918.
 127. Bruckner, S.; Albrecht, A.; Petersen, B.; Kreyenschmidt, J. Influence of Cold Chain Interruptions on the Shelf Life of Fresh Pork and Poultry: Influence of Cold Chain Interruptions. *International Journal of Food Science & Technology* **2012**, *47*, 1639–1646, doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03014.x.
 128. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Growth of Spoilage Bacteria during Storage and Transport of Meat. *EFSA* **2016**, *14*, doi:10.2903/j.efsa.2016.4523.

129. Koutsoumanis, K.; Taoukis, P. Meat Safety, Refrigerated Storage and Transport: Modeling and Management. In *Improving the Safety of Fresh Meat*; Sofos, J., Ed.; CRC Press, 2005 ISBN 978-0-8493-3427-6.
130. Kreyenschmidt, J.; Hübner, A.; Beierle, E.; Chonsch, L.; Scherer, A.; Petersen, B. Determination of the Shelf Life of Sliced Cooked Ham Based on the Growth of Lactic Acid Bacteria in Different Steps of the Chain. *Journal of Applied Microbiology* **2010**, *108*, 510–520, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04451.x.
131. Lee, H.J.; Kwon, J.A.; Kim, M.; Lee, Y.E.; Ryu, M.; Jo, C. Effect of Supercooling on Storage Ability of Different Beef Cuts in Comparison to Traditional Storage Methods. *Meat Science* **2023**, *199*, 109137, doi:10.1016/j.meatsci.2023.109137.
132. Stonehouse, G.G.; Evans, J.A. The Use of Supercooling for Fresh Foods: A Review. *Journal of Food Engineering* **2015**, *148*, 74–79, doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.08.007.
133. You, Y.; Her, J.-Y.; Shafel, T.; Kang, T.; Jun, S. Supercooling Preservation on Quality of Beef Steak. *Journal of Food Engineering* **2020**, *274*, 109840, doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.109840.
134. Ding, D.; Zhou, C.; Ge, X.; Ye, K.; Wang, P.; Bai, Y.; Zhou, G. The Effect of Different Degrees of Superchilling on Shelf Life and Quality of Pork during Storage. *J Food Process Preserv* **2020**, *44*, doi:10.1111/jfpp.14394.
135. Luong, N.-D.M.; Coroller, L.; Zagorec, M.; Membré, J.-M.; Guillou, S. Spoilage of Chilled Fresh Meat Products during Storage: A Quantitative Analysis of Literature Data. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1198, doi:10.3390/microorganisms8081198.
136. Viana, E.S.; Gomide, L.A.M.; Vanetti, M.C.D. Effect of Modified Atmospheres on Microbiological, Color and Sensory Properties of Refrigerated Pork. *Meat Science* **2005**, *71*, 696–705, doi:10.1016/j.meatsci.2005.05.013.
137. Michelakou, E.; Giaouris, E.; Doultzos, D.; Nasopoulou, C.; Skandamis, P. Evaluation of the Microbial Stability and Shelf Life of 50% NaCl-Reduced Traditional Greek Pork Meat Product “Syglino of Monemvasia” Stored under Vacuum at Different Temperatures. *Heliyon* **2021**, *7*, e08296, doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08296.

138. Argüello, H.; Rubio, P.; Jaramillo, A.; Barrios, V.; García, M.; Carvajal, A. Evaluation of Cleaning and Disinfection Procedures against *Salmonella* Enterica at Swine Farms, Transport and Lairage Facilities. In Proceedings of the International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork; Iowa State University, Digital Press: Maastricht, Netherlands, 2011; pp. 254–257.
139. De Busser, E.V.; Maes, D.; Houf, K.; Dewulf, J.; Imberechts, H.; Bertrand, S.; De Zutter, L. Detection and Characterization of *Salmonella* in Lairage, on Pig Carcasses and Intestines in Five Slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* **2011**, *145*, 279–286, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.009.
140. Mannion, C.; Fanning, J.; McLernon, J.; Lendrum, L.; Gutierrez, M.; Duggan, S.; Egan, J. The Role of Transport, Lairage and Slaughter Processes in the Dissemination of *Salmonella* Spp. in Pigs in Ireland. *Food Research International* **2012**, *45*, 871–879, doi:10.1016/j.foodres.2011.02.001.
141. Hurd, H.S.; McKean, J.D.; Griffith, R.W.; Wesley, I.V.; Rostagno, M.H. *Salmonella* Enterica Infections in Market Swine with and without Transport and Holding. *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68*, 2376–2381, doi:10.1128/AEM.68.5.2376-2381.2002.
142. Bouvet, J.; Bavai, C.; Rossel, R.; Le Roux, A.; Montet, M.; Mazuy, C.; Vernozy-Rozand, C. Evolution of Pig Carcass and Slaughterhouse Environment Contamination by *Salmonella*. *Revue Méd. Vét.* 2003, 775–779.
143. Deane, A.; Murphy, D.; Leonard, F.C.; Byrne, W.; Clegg, T.; Madigan, G.; Griffin, M.; Egan, J.; Prendergast, D.M. Prevalence of *Salmonella* Spp. in Slaughter Pigs and Carcasses in Irish Abattoirs and Their Antimicrobial Resistance. *Ir Vet J* **2022**, *75*, 4, doi:10.1186/s13620-022-00211-y.
144. Gomes-Neves, E.; Antunes, P.; Tavares, A.; Themudo, P.; Cardoso, M.F.; Gärtner, F.; Costa, J.M.; Peixe, L. *Salmonella* Cross-Contamination in Swine Abattoirs in Portugal: Carcasses, Meat and Meat Handlers. *International Journal of Food Microbiology* **2012**, *157*, 82–87, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.015.

145. Hald, T.; Wingstrand, A.; Swanenburg, M.; Von Altröck, A.; Thorberg, B.-M. The Occurrence and Epidemiology of *Salmonella* in European Pig Slaughterhouses. *Epidemiol. Infect.* **2003**, *131*, 1187–1203, doi:10.1017/S0950268803001171.
146. Morgan, I.R.; Krautil, F.L.; Craven, J.A. Bacterial Populations on Dressed Pig Carcasses. *Epidemiol. Infect.* **1987**, *98*, 15–24.
147. Nauta, M.; Barfod, K.; Hald, T.; Sørensen, A.H.; Emborg, H.-D.; Aabo, S. Prediction of Salmonella Carcass Contamination by a Comparative Quantitative Analysis of E. Coli and Salmonella during Pig Slaughter. *International Journal of Food Microbiology* **2013**, *166*, 231–237, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.014.
148. Zeng, H.; Rasschaert, G.; De Zutter, L.; Mattheus, W.; De Reu, K. Identification of the Source for Salmonella Contamination of Carcasses in a Large Pig Slaughterhouse. *Pathogens* **2021**, *10*, 77, doi:10.3390/pathogens10010077.
149. Pesciaroli, M.; Cucco, L.; De Luca, S.; Massacci, F.R.; Maresca, C.; Medici, L.; Panicià, M.; Scoccia, E.; Staffolani, M.; Pezzotti, G.; et al. Association between Pigs with High Caecal Salmonella Loads and Carcass Contamination. *International Journal of Food Microbiology* **2017**, *242*, 82–86, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.021.
150. Duggan, S.J.; Mannion, C.; Prendergast, D.M.; Leonard, N.; Fanning, S.; Gonzales-Barron, U.; Egan, J.; Butler, F.; Duffy, G. Tracking the Salmonella Status of Pigs and Pork from Lairage through the Slaughter Process in the Republic of Ireland. *Journal of Food Protection* **2010**, *73*, 2148–2160, doi:10.4315/0362-028X-73.12.2148.
151. Sanchez-Maldonado, A.F.; Aslam, M.; Service, C.; Narváez-Bravo, C.; Avery, B.P.; Johnson, R.; Jones, T.H. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Salmonella Isolated from Two Pork Processing Plants in Alberta, Canada. *International Journal of Food Microbiology* **2017**, *241*, 49–59, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.004.
152. Arguello, H.; Carvajal, A.; Collazos, J.A.; García-Feliz, C.; Rubio, P. Prevalence and Serovars of Salmonella Enterica on Pig Carcasses, Slaughtered Pigs and the Environment of Four Spanish Slaughterhouses. *Food Research International* **2012**, *45*, 905–912, doi:10.1016/j.foodres.2011.04.017.

153. Gonzales-Barron, U.; Cadavez, V.; Sheridan, J.J.; Butler, F. Modelling the Effect of Chilling on the Occurrence of Salmonella on Pig Carcasses at Study, Abattoir and Batch Levels by Meta-Analysis. *International Journal of Food Microbiology* **2013**, *163*, 101–113, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.006.
154. Bonardi, S.; Bassi, L.; Brindani, F.; D’Incau, M.; Barco, L.; Carra, E.; Pongolini, S. Prevalence, Characterization and Antimicrobial Susceptibility of Salmonella Enterica and Yersinia Enterocolitica in Pigs at Slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology* **2013**, *163*, 248–257, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.012.
155. Prendergast, D.M.; Duggan, S.J.; Fanning, S.; Cormican, M.; Gonzales-Barron, U.; Butler, F.; Duffy, G. Prevalence and Numbers of *Salmonella* Spp. and Enterobacteriaceae on Pork Cuts in Abattoirs in the Republic of Ireland. *Journal of Applied Microbiology* **2008**, *105*, 1209–1219, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03854.x.
156. Giaouris, E.; Heir, E.; Hébraud, M.; Chorianopoulos, N.; Langsrud, S.; Møretrø, T.; Habimana, O.; Desvaux, M.; Renier, S.; Nychas, G.-J. Attachment and Biofilm Formation by Foodborne Bacteria in Meat Processing Environments: Causes, Implications, Role of Bacterial Interactions and Control by Alternative Novel Methods. *Meat Science* **2014**, *97*, 298–309, doi:10.1016/j.meatsci.2013.05.023.
157. Wen, X.; James S., D. Survival of Campylobacter Jejuni and Salmonella Enterica Typhimurium in Vacuum-Packed, Moisture-Enhanced Pork. *Journal of Food Protection* **2012**, *75*, 576–579, doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-343.
158. Wang, C.; Yang, J.; Zhu, X.; Lu, Y.; Xue, Y.; Lu, Z. Effects of Salmonella Bacteriophage, Nisin and Potassium Sorbate and Their Combination on Safety and Shelf Life of Fresh Chilled Pork. *Food Control* **2017**, *73*, 869–877, doi:10.1016/j.foodcont.2016.09.034.
159. Kim, J.H.; Hur, S.J.; Yim, D.G. Monitoring of Microbial Contaminants of Beef, Pork, and Chicken in HACCP Implemented Meat Processing Plants of Korea. *Korean J Food Sci Anim Resour* **2018**, *38*, 282–290, doi:10.5851/kosfa.2018.38.2.282.
160. ACIA L’approche Du Programme d’amélioration de La Salubrité Des Aliments Pour Établir Un Plan de Contrôle Préventif Available online: <https://inspection.canada.ca/controles->

preventifs/plans-de-controle-preventif/programme-d-amelioration-de-la-salubrite-des-alime/fra/1525869691902/1525869759693.

161. Zdolec, N.; Kotsiri, A.; Houf, K.; Alvarez-Ordóñez, A.; Blagojevic, B.; Karabasil, N.; Salines, M.; Antic, D. Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Interventions Applied during Primary Processing to Reduce Microbial Contamination on Pig Carcasses. *Foods* **2022**, *11*, 2110, doi:10.3390/foods11142110.
162. Pothakos, V.; Samapundo, S.; Devlieghere, F. Total Mesophilic Counts Underestimate in Many Cases the Contamination Levels of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria (LAB) in Chilled-Stored Food Products at the End of Their Shelf-Life. *Food Microbiology* **2012**, *32*, 437–443, doi:10.1016/j.fm.2012.07.011.
163. Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. Phylogenetic Identification and in Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol Rev* **1995**, *59*, 143–169, doi:10.1128/mr.59.1.143-169.1995.
164. Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1986**, *51*, 263–273, doi:10.1101/SQB.1986.051.01.032.
165. Clarridge, J.E. Impact of 16S RRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* **2004**, *17*, 840–862, doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
166. Cocolin, L.; Rajkovic, A.; Rantsiou, K.; Uyttendaele, M. The Challenge of Merging Food Safety Diagnostic Needs with Quantitative PCR Platforms. *Trends in Food Science & Technology* **2011**, *22*, S30–S38, doi:10.1016/j.tifs.2011.02.009.
167. Fakruddin, Md.; Mannan, K.S.B.; Andrews, S. Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. *ISRN Microbiology* **2013**, *2013*, 1–6, doi:10.1155/2013/703813.
168. Stackebrandt, E.; Goebel, B.M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S RRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **1994**, *44*, 846–849, doi:10.1099/00207713-44-4-846.

169. Links, M.G.; Dumonceaux, T.J.; Hemmingsen, S.M.; Hill, J.E. The Chaperonin-60 Universal Target Is a Barcode for Bacteria That Enables De Novo Assembly of Metagenomic Sequence Data. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49755, doi:10.1371/journal.pone.0049755.
170. Ogier, J.-C.; Pagès, S.; Galan, M.; Barret, M.; Gaudriault, S. RpoB, a Promising Marker for Analyzing the Diversity of Bacterial Communities by Amplicon Sequencing. *BMC Microbiol* **2019**, *19*, 171, doi:10.1186/s12866-019-1546-z.
171. Poirier, S.; Rué, O.; Peguilhan, R.; Coeuret, G.; Zagorec, M.; Champomier-Vergès, M.-C.; Loux, V.; Chaillou, S. Deciphering Intra-Species Bacterial Diversity of Meat and Seafood Spoilage Microbiota Using GyrB Amplicon Sequencing: A Comparative Analysis with 16S rDNA V3-V4 Amplicon Sequencing. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204629, doi:10.1371/journal.pone.0204629.
172. Klappenbach, J.A. Rrndb: The Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, 181–184, doi:10.1093/nar/29.1.181.
173. Větrovský, T.; Baldrian, P. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57923, doi:10.1371/journal.pone.0057923.
174. Chaban, B.; Albert, A.; Links, M.G.; Gardy, J.; Tang, P.; Hill, J.E. Characterization of the Upper Respiratory Tract Microbiomes of Patients with Pandemic H1N1 Influenza. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69559, doi:10.1371/journal.pone.0069559.
175. Costa, M.O.; Chaban, B.; Harding, J.C.S.; Hill, J.E. Characterization of the Fecal Microbiota of Pigs before and after Inoculation with “*Brachyspira Hampsonii*.” *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106399, doi:10.1371/journal.pone.0106399.
176. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 5463–5467, doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
177. Venter, J.C.; Adams, M.D.; Myers, E.W.; Li, P.W.; Mural, R.J.; Sutton, G.G.; Smith, H.O.; Yandell, M.; Evans, C.A.; Holt, R.A.; et al. The Sequence of the Human Genome. *Science* **2001**, *291*, 1304–1351, doi:10.1126/science.1058040.
178. Schuster, S.C. Next-Generation Sequencing Transforms Today’s Biology. *Nat Methods* **2008**, *5*, 16–18, doi:10.1038/nmeth1156.

179. Kim, M.; Morrison, M.; Yu, Z. Evaluation of Different Partial 16S rRNA Gene Sequence Regions for Phylogenetic Analysis of Microbiomes. *Journal of Microbiological Methods* **2011**, *84*, 81–87, doi:10.1016/j.mimet.2010.10.020.
180. Wang, Y.; Qian, P.-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7401, doi:10.1371/journal.pone.0007401.
181. Bukin, Yu.S.; Galachyants, Yu.P.; Morozov, I.V.; Bukin, S.V.; Zakharenko, A.S.; Zemskaya, T.I. The Effect of 16S rRNA Region Choice on Bacterial Community Metabarcoding Results. *Sci Data* **2019**, *6*, 190007, doi:10.1038/sdata.2019.7.
182. Marizzoni, M.; Gurry, T.; Provasi, S.; Greub, G.; Lopizzo, N.; Ribaldi, F.; Festari, C.; Mazzelli, M.; Mombelli, E.; Salvatore, M.; et al. Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences in Human Fecal Samples. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1262, doi:10.3389/fmicb.2020.01262.
183. Soriano-Lerma, A.; Pérez-Carrasco, V.; Sánchez-Marañón, M.; Ortiz-González, M.; Sánchez-Martín, V.; Gijón, J.; Navarro-Mari, J.M.; García-Salcedo, J.A.; Soriano, M. Influence of 16S rRNA Target Region on the Outcome of Microbiome Studies in Soil and Saliva Samples. *Sci Rep* **2020**, *10*, 13637, doi:10.1038/s41598-020-70141-8.
184. Teng, F.; Darveekaran Nair, S.S.; Zhu, P.; Li, S.; Huang, S.; Li, X.; Xu, J.; Yang, F. Impact of DNA Extraction Method and Targeted 16S-rRNA Hypervariable Region on Oral Microbiota Profiling. *Sci Rep* **2018**, *8*, 16321, doi:10.1038/s41598-018-34294-x.
185. Willis, C.; Desai, D.; LaRoche, J. Influence of 16S rRNA Variable Region on Perceived Diversity of Marine Microbial Communities of the Northern North Atlantic. *FEMS Microbiology Letters* **2019**, *366*, fnz152, doi:10.1093/femsle/fnz152.
186. Rajeev, M.; Sushmitha, T.J.; Toleti, S.R.; Pandian, S.K. Sediment-Associated Bacterial Community and Predictive Functionalities Are Influenced by Choice of 16S Ribosomal RNA Hypervariable Region(s): An Amplicon-Based Diversity Study. *Genomics* **2020**, *112*, 4968–4979, doi:10.1016/j.ygeno.2020.09.006.

187. Behjati, S.; Tarpey, P.S. What Is next Generation Sequencing? *Archives of disease in childhood - Education & practice edition* **2013**, *98*, 236–238, doi:10.1136/archdischild-2013-304340.
188. Van Dijk, E.L.; Auger, H.; Jaszczyszyn, Y.; Thermes, C. Ten Years of Next-Generation Sequencing Technology. *Trends in Genetics* **2014**, *30*, 418–426, doi:10.1016/j.tig.2014.07.001.
189. Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W.E.; Attiya, S.; Bader, J.S.; Bemben, L.A.; Berka, J.; Braverman, M.S.; Chen, Y.-J.; Chen, Z.; et al. Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors. *Nature* **2005**, *437*, 376–380, doi:10.1038/nature03959.
190. Rothberg, J.M.; Hinz, W.; Rearick, T.M.; Schultz, J.; Mileski, W.; Davey, M.; Leamon, J.H.; Johnson, K.; Milgrew, M.J.; Edwards, M.; et al. An Integrated Semiconductor Device Enabling Non-Optical Genome Sequencing. *Nature* **2011**, *475*, 348–352, doi:10.1038/nature10242.
191. Head, S.R.; Komori, H.K.; LaMere, S.A.; Whisenant, T.; Van Nieuwerburgh, F.; Salomon, D.R.; Ordoukhanian, P. Library Construction for Next-Generation Sequencing: Overviews and Challenges. *BioTechniques* **2014**, *56*, 61–77, doi:10.2144/000114133.
192. Durazzi, F.; Sala, C.; Castellani, G.; Manfreda, G.; Remondini, D.; De Cesare, A. Comparison between 16S rRNA and Shotgun Sequencing Data for the Taxonomic Characterization of the Gut Microbiota. *Sci Rep* **2021**, *11*, 3030, doi:10.1038/s41598-021-82726-y.
193. Goodwin, S.; McPherson, J.D.; McCombie, W.R. Coming of Age: Ten Years of next-Generation Sequencing Technologies. *Nat Rev Genet* **2016**, *17*, 333–351, doi:10.1038/nrg.2016.49.
194. Hu, T.; Chitnis, N.; Monos, D.; Dinh, A. Next-Generation Sequencing Technologies: An Overview. *Human Immunology* **2021**, *82*, 801–811, doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012.
195. Illumina, Inc. Illumina Sequencing Technology Available online: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.
196. Illumina, Inc. Illumina Sequencing by Synthesis Available online: <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>.

197. Illumina Specifications for the MiSeq System Available online: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/specifications.html>.
198. Stoler, N.; Nekrutenko, A. Sequencing Error Profiles of Illumina Sequencing Instruments. *NAR Genomics and Bioinformatics* **2021**, *3*, lqab019, doi:10.1093/nargab/lqab019.
199. Schloss, P.D.; Wescott, S.L.; Ryabin, T. Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities 2009.
200. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat Biotechnol* **2019**, *37*, 852–857, doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
201. Illumina Quality Scores for Next-Generation Sequencing Available online: https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf.
202. Multinu, F.; Harrington, S.C.; Chen, J.; Jeraldo, P.R.; Johnson, S.; Chia, N.; Walther-Antonio, M.R. Systematic Bias Introduced by Genomic DNA Template Dilution in 16S rRNA Gene-Targeted Microbiota Profiling in Human Stool Homogenates. *mSphere* **2018**, *3*, e00560-17, doi:10.1128/mSphere.00560-17.
203. Vaginal Microbiome Consortium (additional members); Brooks, J.P.; Edwards, D.J.; Harwich, M.D.; Rivera, M.C.; Fettweis, J.M.; Serrano, M.G.; Reris, R.A.; Sheth, N.U.; Huang, B.; et al. The Truth about Metagenomics: Quantifying and Counteracting Bias in 16S rRNA Studies. *BMC Microbiol* **2015**, *15*, 66, doi:10.1186/s12866-015-0351-6.
204. Sze, M.A.; Schloss, P.D. The Impact of DNA Polymerase and Number of Rounds of Amplification in PCR on 16S rRNA Gene Sequence Data. *mSphere* **2019**, *4*, e00163-19, doi:10.1128/mSphere.00163-19.
205. Schloss, P.D.; Gevers, D.; Westcott, S.L. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27310, doi:10.1371/journal.pone.0027310.
206. Kozich, J.J.; Westcott, S.L.; Baxter, N.T.; Highlander, S.K.; Schloss, P.D. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence

- Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 5112–5120, doi:10.1128/AEM.01043-13.
207. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat Methods* **2016**, *13*, 581–583, doi:10.1038/nmeth.3869.
208. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Holmes, S.P. Exact Sequence Variants Should Replace Operational Taxonomic Units in Marker-Gene Data Analysis. *ISME J* **2017**, *11*, 2639–2643, doi:10.1038/ismej.2017.119.
209. Schloss, P.D.; Handelsman, J. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71*, 1501–1506, doi:10.1128/AEM.71.3.1501-1506.2005.
210. Schloss, P.D. Reintroducing Mothur: 10 Years Later. *Appl Environ Microbiol* **2020**, *86*, e02343-19, doi:10.1128/AEM.02343-19.
211. Edgar, R.C. Updating the 97% Identity Threshold for 16S Ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 2371–2375, doi:10.1093/bioinformatics/bty113.
212. Navas-Molina, J.A.; Peralta-Sánchez, J.M.; González, A.; McMurdie, P.J.; Vázquez-Baeza, Y.; Xu, Z.; Ursell, L.K.; Lauber, C.; Zhou, H.; Song, S.J.; et al. Advancing Our Understanding of the Human Microbiome Using QIIME. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2013; Vol. 531, pp. 371–444 ISBN 978-0-12-407863-5.
213. Prodan, A.; Tremaroli, V.; Brolin, H.; Zwinderman, A.H.; Nieuwdorp, M.; Levin, E. Comparing Bioinformatic Pipelines for Microbial 16S RRNA Amplicon Sequencing. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0227434, doi:10.1371/journal.pone.0227434.
214. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of RRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 5261–5267, doi:10.1128/AEM.00062-07.
215. Balvočiūtė, M.; Huson, D.H. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — How Do These Taxonomies Compare? *BMC Genomics* **2017**, *18*, 114, doi:10.1186/s12864-017-3501-4.
216. Chiarello, M.; McCauley, M.; Villéger, S.; Jackson, C.R. Ranking the Biases: The Choice of OTUs vs. ASVs in 16S RRNA Amplicon Data Analysis Has Stronger Effects on Diversity

- Measures than Rarefaction and OTU Identity Threshold. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0264443, doi:10.1371/journal.pone.0264443.
217. Sims, D.; Sudbery, I.; Illott, N.E.; Heger, A.; Ponting, C.P. Sequencing Depth and Coverage: Key Considerations in Genomic Analyses. *Nat Rev Genet* **2014**, *15*, 121–132, doi:10.1038/nrg3642.
218. Willis, A.D. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2407, doi:10.3389/fmicb.2019.02407.
219. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e61217, doi:10.1371/journal.pone.0061217.
220. Kim, B.-R.; Shin, J.; Guevarra, R.B.; Lee, J.H.; Kim, D.W.; Seol, K.-H.; Lee, J.-H.; Kim, H.B.; Isaacson, R.E. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2017**, *27*, 2089–2093, doi:10.4014/jmb.1709.09027.
221. Chao, A.; Chazdon, R.L.; Colwell, R.K.; Shen, T.-J. A New Statistical Approach for Assessing Similarity of Species Composition with Incidence and Abundance Data: A New Statistical Approach for Assessing Similarity. *Ecology Letters* **2004**, *8*, 148–159, doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00707.x.
222. Chao, A.; Lee, S.-M. Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. *Journal of the American Statistical Association* **1992**, *87*, 210–217, doi:10.1080/01621459.1992.10475194.
223. Shannon, C.E. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal* **1948**, *27*, 379–423, doi:10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.
224. Simpson, E.H. Measurement of Diversity. *Nature* **1949**, *163*, 688–688, doi:10.1038/163688a0.
225. Lozupone, C.; Lladser, M.E.; Knights, D.; Stombaugh, J.; Knight, R. UniFrac: An Effective Distance Metric for Microbial Community Comparison. *ISME J* **2011**, *5*, 169–172, doi:10.1038/ismej.2010.133.

226. Anderson, M.J.; Ellingsen, K.E.; McArdle, B.H. Multivariate Dispersion as a Measure of Beta Diversity. *Ecol Letters* **2006**, *9*, 683–693, doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00926.x.
227. Legendre, P.; De Cáceres, M. Beta Diversity as the Variance of Community Data: Dissimilarity Coefficients and Partitioning. *Ecol Lett* **2013**, *16*, 951–963, doi:10.1111/ele.12141.
228. Bray, J.R.; Curtis, J.T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **1957**, *27*, 325–349, doi:10.2307/1942268.
229. Gower, J.C. Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis 1966, 325–338.
230. Holland, S.M. Non-Metric Multidimensional Scaling (NMS) 2008.
231. Anderson, M.J.; Walsh, D.C.I. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel Test in the Face of Heterogeneous Dispersions: What Null Hypothesis Are You Testing? *Ecological Monographs* **2013**, *83*, 557–574, doi:10.1890/12-2010.1.
232. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic Biomarker Discovery and Explanation. *Genome Biol* **2011**, *12*, R60, doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.
233. Mallick, H.; Rahnavard, A.; McIver, L.J.; Ma, S.; Zhang, Y.; Nguyen, L.H.; Tickle, T.L.; Weingart, G.; Ren, B.; Schwager, E.H.; et al. *Multivariable Association Discovery in Population-Scale Meta-Omics Studies*; Microbiology, 2021;
234. Isaacson, R.; Kim, H.B. The Intestinal Microbiome of the Pig. *Animal Health Research Reviews* **2012**, *13*, 100–109, doi:10.1017/S1466252312000084.
235. Kim, H.B.; Isaacson, R.E. The Pig Gut Microbial Diversity: Understanding the Pig Gut Microbial Ecology through the next Generation High Throughput Sequencing. *Veterinary Microbiology* **2015**, *177*, 242–251, doi:10.1016/j.vetmic.2015.03.014.
236. Kraemer, J.G.; Aebi, S.; Oppliger, A.; Hilty, M. The Indoor-Air Microbiota of Pig Farms Drives the Composition of the Pig Farmers' Nasal Microbiota in a Season-Dependent and Farm-Specific Manner. *Appl Environ Microbiol* **2019**, *85*, e03038-18, doi:10.1128/AEM.03038-18.
237. Wen, C.; Van Dixhoorn, I.; Schokker, D.; Woelders, H.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Rebel, J.M.J.; Smidt, H. Environmentally Enriched Housing Conditions Affect Pig Welfare, Immune

- System and Gut Microbiota in Early Life. *anim microbiome* **2021**, *3*, 52, doi:10.1186/s42523-021-00115-2.
238. Fohse, J.M.; Zijlstra, R.T.; Willing, B.P. The Role of Gut Microbiota in the Health and Disease of Pigs. *Animal Frontiers* **2016**, *6*, 30–36, doi:10.2527/af.2016-0031.
239. Khanal, P.; Maltecca, C.; Schwab, C.; Fix, J.; Tiezzi, F. Microbiability of Meat Quality and Carcass Composition Traits in Swine. *J Anim Breed Genet* **2021**, *138*, 223–236, doi:10.1111/jbg.12504.
240. Richards, J.D.; Gong, J.; De Lange, C.F.M. The Gastrointestinal Microbiota and Its Role in Monogastric Nutrition and Health with an Emphasis on Pigs: Current Understanding, Possible Modulations, and New Technologies for Ecological Studies. *Can. J. Anim. Sci.* **2005**, *85*, 421–435, doi:10.4141/A05-049.
241. Suo, C.; Yin, Y.; Wang, X.; Lou, X.; Song, D.; Wang, X.; Gu, Q. Effects of Lactobacillus Plantarum ZJ316 on Pig Growth and Pork Quality. *BMC Vet Res* **2012**, *8*, 89, doi:10.1186/1746-6148-8-89.
242. Vasquez, R.; Oh, J.K.; Song, J.H.; Kang, D.-K. Gut Microbiome-Produced Metabolites in Pigs: A Review on Their Biological Functions and the Influence of Probiotics. *J Anim Sci Technol* **2022**, *64*, 671–695, doi:10.5187/jast.2022.e58.
243. Zhao, G.; Xiang, Y.; Wang, X.; Dai, B.; Zhang, X.; Ma, L.; Yang, H.; Lyu, W. Exploring the Possible Link between the Gut Microbiome and Fat Deposition in Pigs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2022**, *2022*, 1–13, doi:10.1155/2022/1098892.
244. McCormack, U.M.; Curião, T.; Buzoianu, S.G.; Prieto, M.L.; Ryan, T.; Varley, P.; Crispie, F.; Magowan, E.; Metzler-Zebeli, B.U.; Berry, D.; et al. Exploring a Possible Link between the Intestinal Microbiota and Feed Efficiency in Pigs. *Appl Environ Microbiol* **2017**, *83*, e00380-17, doi:10.1128/AEM.00380-17.
245. Zhao, W.; Wang, Y.; Liu, S.; Huang, J.; Zhai, Z.; He, C.; Ding, J.; Wang, J.; Wang, H.; Fan, W.; et al. The Dynamic Distribution of Porcine Microbiota across Different Ages and Gastrointestinal Tract Segments. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117441, doi:10.1371/journal.pone.0117441.

246. Luo, Y.; Ren, W.; Smidt, H.; Wright, A.-D.G.; Yu, B.; Schyns, G.; McCormack, U.M.; Cowieson, A.J.; Yu, J.; He, J.; et al. Dynamic Distribution of Gut Microbiota in Pigs at Different Growth Stages: Composition and Contribution. *Microbiol Spectr* **2022**, *10*, e00688-21, doi:10.1128/spectrum.00688-21.
247. Wang, X.; Tsai, T.; Deng, F.; Wei, X.; Chai, J.; Knapp, J.; Apple, J.; Maxwell, C.V.; Lee, J.A.; Li, Y.; et al. Longitudinal Investigation of the Swine Gut Microbiome from Birth to Market Reveals Stage and Growth Performance Associated Bacteria. *Microbiome* **2019**, *7*, 109, doi:10.1186/s40168-019-0721-7.
248. De Filippis, F.; La Stora, A.; Villani, F.; Ercolini, D. Strain-Level Diversity Analysis of *Pseudomonas Fragri* after *In Situ* Pangenome Reconstruction Shows Distinctive Spoilage-Associated Metabolic Traits Clearly Selected by Different Storage Conditions. *Appl Environ Microbiol* **2019**, *85*, e02212-18, doi:10.1128/AEM.02212-18.
249. Demaître, N.; De Reu, K.; Haegeman, A.; Schaumont, D.; De Zutter, L.; Geeraerd, A.; Rasschaert, G. Study of the Transfer of *Listeria Monocytogenes* during the Slaughter of Cattle Using Molecular Typing. *Meat Science* **2021**, *175*, 108450, doi:10.1016/j.meatsci.2021.108450.
250. Nastasijevic, I.; Milanov, D.; Velebit, B.; Djordjevic, V.; Swift, C.; Painset, A.; Lakicevic, B. Tracking of *Listeria Monocytogenes* in Meat Establishment Using Whole Genome Sequencing as a Food Safety Management Tool: A Proof of Concept. *International Journal of Food Microbiology* **2017**, *257*, 157–164, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.015.
251. Cherifi, T.; Carrillo, C.; Lambert, D.; Miniaï, I.; Quessy, S.; Larivière-Gauthier, G.; Blais, B.; Fravallo, P. Genomic Characterization of *Listeria Monocytogenes* Isolates Reveals That Their Persistence in a Pig Slaughterhouse Is Linked to the Presence of Benzalkonium Chloride Resistance Genes. *BMC Microbiol* **2018**, *18*, 220, doi:10.1186/s12866-018-1363-9.
252. Jagadeesan, B.; Gerner-Smidt, P.; Allard, M.W.; Leuillet, S.; Winkler, A.; Xiao, Y.; Chaffron, S.; Van Der Vossen, J.; Tang, S.; Katase, M.; et al. The Use of next Generation Sequencing for Improving Food Safety: Translation into Practice. *Food Microbiology* **2019**, *79*, 96–115, doi:10.1016/j.fm.2018.11.005.

253. Jakobsen, A.M.; Bahl, M.I.; Buschhardt, T.; Hansen, T.B.; Al-Soud, W.A.; Brejnrod, A.D.; Sørensen, S.J.; Nesbakken, T.; Aabo, S. Bacterial Community Analysis for Investigating Bacterial Transfer from Tonsils to the Pig Carcass. *International Journal of Food Microbiology* **2019**, *295*, 8–18, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.003.
254. Li, M.Y.; Zhou, G.H.; Xu, X.L.; Li, C.B.; Zhu, W.Y. Changes of Bacterial Diversity and Main Flora in Chilled Pork during Storage Using PCR-DGGE. *Food Microbiology* **2006**, *23*, 607–611, doi:10.1016/j.fm.2006.01.004.
255. Xu, Y.; Yang, G.; Xu, J.; Guan, X.; Li, R.; Wang, S. Influence of the Combination of Cinnamon Essential Oil Nanoemulsions and Epsilon-Polylysine on Microbial Community and Quality of Pork during Refrigerated Period and Radio Frequency Cooking. *International Journal of Food Microbiology* **2022**, *381*, 109911, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109911.
256. Zhang, P.; Ward, P.; McMullen, L.M.; Yang, X. A Case of ‘Blown Pack’ Spoilage of Vacuum-packaged Pork Likely Associated with *Clostridium Estertheticum* in Canada. *Lett Appl Microbiol* **2020**, *70*, 13–20, doi:10.1111/lam.13236.
257. Zhou, Y.; Zhou, Y.; Wan, J.; Zhu, Q.; Liu, L.; Gu, S.; Li, H. Effects of Sorbitol-Mediated Curing on the Physicochemical Properties and Bacterial Community Composition of Loin Ham during Fermentation and Ripening Stages. *Food Chemistry: X* **2023**, *17*, 100543, doi:10.1016/j.fochx.2022.100543.
258. Belloch, C.; Neef, A.; Salafia, C.; López-Diez, J.J.; Flores, M. Microbiota and Volatilome of Dry-Cured Pork Loins Manufactured with Paprika and Reduced Concentration of Nitrite and Nitrate. *Food Research International* **2021**, *149*, 110691, doi:10.1016/j.foodres.2021.110691.
259. Hasan, N.; Yang, H. Factors Affecting the Composition of the Gut Microbiota, and Its Modulation. *PeerJ* **2019**, *7*, e7502, doi:10.7717/peerj.7502.
260. Bokulich, N.A.; Subramanian, S.; Faith, J.J.; Gevers, D.; Gordon, J.I.; Knight, R.; Mills, D.A.; Caporaso, J.G. Quality-Filtering Vastly Improves Diversity Estimates from Illumina Amplicon Sequencing. *Nat Methods* **2013**, *10*, 57–59, doi:10.1038/nmeth.2276.
261. Schloss, P.D. *Removal of Rare Amplicon Sequence Variants from 16S RRNA Gene Sequence Surveys Biases the Interpretation of Community Structure Data*; Microbiology, 2020;

262. Glassman, S.I.; Martiny, J.B.H. Broadscale Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact Sequence Variants versus Operational Taxonomic Units. *mSphere* **2018**, *3*, e00148-18, doi:10.1128/mSphere.00148-18.
263. Trudeau, S.; Thibodeau, A.; Côté, J.-C.; Gaucher, M.-L.; Fravallo, P. Contribution of the Broiler Breeders' Fecal Microbiota to the Establishment of the Eggshell Microbiota. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 666, doi:10.3389/fmicb.2020.00666.
264. Hung, Y.-M.; Lyu, W.-N.; Tsai, M.-L.; Liu, C.-L.; Lai, L.-C.; Tsai, M.-H.; Chuang, E.Y. To Compare the Performance of Prokaryotic Taxonomy Classifiers Using Curated 16S Full-Length RRNA Sequences. *Computers in Biology and Medicine* **2022**, *145*, 105416, doi:10.1016/j.combiomed.2022.105416.
265. Crespo-Piazuelo, D.; Estellé, J.; Revilla, M.; Criado-Mesas, L.; Ramayo-Caldas, Y.; Óvilo, C.; Fernández, A.I.; Ballester, M.; Folch, J.M. Characterization of Bacterial Microbiota Compositions along the Intestinal Tract in Pigs and Their Interactions and Functions. *Sci Rep* **2018**, *8*, 12727, doi:10.1038/s41598-018-30932-6.
266. Fan, P.; Liu, P.; Song, P.; Chen, X.; Ma, X. Moderate Dietary Protein Restriction Alters the Composition of Gut Microbiota and Improves Ileal Barrier Function in Adult Pig Model. *Sci Rep* **2017**, *7*, 43412, doi:10.1038/srep43412.
267. Quan, J.; Cai, G.; Ye, J.; Yang, M.; Ding, R.; Wang, X.; Zheng, E.; Fu, D.; Li, S.; Zhou, S.; et al. A Global Comparison of the Microbiome Compositions of Three Gut Locations in Commercial Pigs with Extreme Feed Conversion Ratios. *Sci Rep* **2018**, *8*, 4536, doi:10.1038/s41598-018-22692-0.
268. Liang, C.; Zhang, D.; Wen, X.; Li, X.; Chen, L.; Zheng, X.; Fang, F.; Li, J.; Hou, C. Effects of Chilling Rate on the Freshness and Microbial Community Composition of Lamb Carcasses. *LWT* **2022**, *153*, 112559, doi:10.1016/j.lwt.2021.112559.
269. Bekhit, A.E.-D.A.; Holman, B.W.B.; Giteru, S.G.; Hopkins, D.L. Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) and Its Role in Meat Spoilage: A Review. *Trends in Food Science & Technology* **2021**, *109*, 280–302, doi:10.1016/j.tifs.2021.01.006.

270. Yang, H.; Xiao, Y.; Wang, J.; Xiang, Y.; Gong, Y.; Wen, X.; Li, D. Core Gut Microbiota in Jinhua Pigs and Its Correlation with Strain, Farm and Weaning Age. *J Microbiol.* **2018**, *56*, 346–355, doi:10.1007/s12275-018-7486-8.
271. Shedleur-Bourguignon, F.; Duchemin, T.; P. Thériault, W.; Longpré, J.; Thibodeau, A.; Hocine, M.N.; Fravallo, P. Distinct Microbiotas Are Associated with Different Production Lines in the Cutting Room of a Swine Slaughterhouse. *Microorganisms* **2023**, *11*, 133, doi:10.3390/microorganisms11010133.
272. Argüello, H.; Estellé, J.; Leonard, F.C.; Crispie, F.; Cotter, P.D.; O’Sullivan, O.; Lynch, H.; Walia, K.; Duffy, G.; Lawlor, P.G.; et al. Influence of the Intestinal Microbiota on Colonization Resistance to *Salmonella* and the Shedding Pattern of Naturally Exposed Pigs. *mSystems* **2019**, *4*, e00021-19, doi:10.1128/mSystems.00021-19.
273. Garrido, V.; Migura-García, L.; Gaitán, I.; Arrieta-Gisasola, A.; Martínez-Ballesteros, I.; Fraile, L.; Grilló, M.J. Prevalence of Salmonella in Free-Range Pigs: Risk Factors and Intestinal Microbiota Composition. *Foods* **2021**, *10*, 1410, doi:10.3390/foods10061410.
274. Shedleur-Bourguignon, F.; Thériault, W.P.; Longpré, J.; Thibodeau, A.; Fravallo, P. Use of an Ecosystem-Based Approach to Shed Light on the Heterogeneity of the Contamination Pattern of *Listeria Monocytogenes* on Conveyor Belt Surfaces in a Swine Slaughterhouse in the Province of Quebec, Canada. *Pathogens* **2021**, *10*, 1368, doi:10.3390/pathogens10111368.
275. Alban, L.; Nielsen, E.O.; Dahl, J. A Human Health Risk Assessment for Macrolide-Resistant *Campylobacter* Associated with the Use of Macrolides in Danish Pig Production. *Preventive Veterinary Medicine* **2008**, *83*, 115–129, doi:10.1016/j.prevetmed.2007.06.006.
276. Humphrey, T.; O’Brien, S.; Madsen, M. *Campylobacters* as Zoonotic Pathogens: A Food Production Perspective. *International Journal of Food Microbiology* **2007**, *117*, 237–257, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006.
277. Quintana-Hayashi, M.P.; Thakur, S. Longitudinal Study of the Persistence of Antimicrobial-Resistant *Campylobacter* Strains in Distinct Swine Production Systems on Farms, at Slaughter, and in the Environment. *Appl Environ Microbiol* **2012**, *78*, 2698–2705, doi:10.1128/AEM.07723-11.

278. Biasi, R.S.; Freitas De Macedo, R.E.; Scaranello Malaquias, M.A.; Franchin, P.R. Prevalence, Strain Identification and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Spp. Isolated from Slaughtered Pig Carcasses in Brazil. *Food Control* **2011**, *22*, 702–707, doi:10.1016/j.foodcont.2010.10.005.
279. Wieczorek, K.; Bocian, Ł.; Osek, J. Bovine and Pig Carcasses as a Source of *Campylobacter* in Poland: A Reservoir for Antimicrobial-Resistant *Campylobacter Coli*. *Foodborne Pathogens and Disease* **2021**, *18*, 462–468, doi:10.1089/fpd.2020.2914.
280. Wieczorek, K.; Osek, J. Characteristics and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Isolated from Pig and Cattle Carcasses in Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **2013**, *16*, 501–508, doi:10.2478/pjvs-2013-0070.
281. Pearce, R.A.; Wallace, F.M.; Call, J.E.; Dudley, R.L.; Oser, A.; Yoder, L.; Sheridan, J.J.; Luchansky, J.B. Prevalence of *Campylobacter* within a Swine Slaughter and Processing Facility. *Journal of Food Protection* **2003**, *66*, 1550–1556, doi:10.4315/0362-028X-66.9.1550.
282. Andrzejewska, M.; Szczepańska, B.; Śpica, D.; Klawe, J.J. Prevalence, Virulence, and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Spp. in Raw Milk, Beef, and Pork Meat in Northern Poland. *Foods* **2019**, *8*, 420, doi:10.3390/foods8090420.
283. Korsak, D.; Maćkiw, E.; Rozynek, E.; Żyłowska, M. Prevalence of *Campylobacter* Spp. in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef Meat in Poland between 2009 and 2013. *Journal of Food Protection* **2015**, *78*, 1024–1028, doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-353.
284. Vanantwerpen, G.; Van Damme, I.; De Zutter, L.; Houf, K. Seroprevalence of Enteropathogenic *Yersinia* Spp. in Pig Batches at Slaughter. *Preventive Veterinary Medicine* **2014**, *116*, 193–196, doi:10.1016/j.prevetmed.2014.05.011.
285. Jain, S.; Mukhopadhyay, K.; Thomassin, P.J. An Economic Analysis of *Salmonella* Detection in Fresh Produce, Poultry, and Eggs Using Whole Genome Sequencing Technology in Canada. *Food Research International* **2019**, *116*, 802–809, doi:10.1016/j.foodres.2018.09.014.