

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de
La recherche scientifique
Université de Jijel
Faculté des sciences
Département de biochimie et de microbiologie

MB 12/04

03
53

Memoire

En vue de l'obtention du diplôme
D'études supérieures en biologie
Option: Microbiologie

Thème

*Evolution de la flore banale et pathogène de la
Viande hachée en fonction du temps et de la
Température de conservation*

Membre de jury:

ROULA sadjia

IDOUI Tayeb

ADOUI Mounira

: Président

: Examineur

: Encadreur

Présenté par :

CHAOUACHE SOFIANE

GUEHAM NOUARA

SDIRA NIHAD



Promotion 2004



Sommaire

SOMMAIRE

Partie bibliographique

Introduction.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I: L'ASPECT SANITAIRE ET COMMERCIALE DES PRODUITS ALIMENTAIRES

I-1. Flore microbienne des aliments	2
I-1-1. Modifications microbienne des aliments.....	2
Incidenece sur la qualité	
I-1-2. Incidence sanitaire de la présence des microorganismes.....	2
a-Intoxications alimentaires.....	3
b-les intoxications alimentaires.....	3
c-toxiinfections alimentaires.....	3
I-2. Methodes d'analyses microbiologiques.....	3
I-2-1. Qualité hygiénique.....	3
I-2-2. Qualité commerciale.....	4
I-2-3. Le contrôle microbiologique.....	4
a-Contrôle préventif.....	4
b-Contrôle au cours de la fabrication.....	4
c-Contrôle des produits finis.....	4
I-2-4. Principe et stratégies du contrôle	5
- Au niveau sanitaire	

CHAPITRE II: ETUDE DE LA FELIERE VIANDE (BOVINE)

II-La viande.....	6
II-1. Définitions.....	6
II-2. Composition de la viande.....	6
II-3. Valeur alimentaire de la viande	6
II-4. Microflore de la viande.....	7
II-4-1. Contamination initiale.....	7

a-Contamination du muscle avant la mort.....	7
(contamination profonde)	
b-Contamination agonique et postmortem.....	7
(profonde et superficielle)	
II-4-2.Multiplication de la microflore initiale.....	8
a-Facteurs intrinsèques	8
b- Facteur extrinsèques.....	9
II-5.Conservation des viandes	9
II-5-1.Conservation traditionnelle.....	10
a-Fumigation.....	10
b-Salaison.....	10
II-5-2.Con,sertation de viande fraîche.....	10
a-La réfrigération.....	10
b-La congélation	10
II-6.Viandes hachées.....	10
II-6-1. Définition	10
II-6-2. Condition du production.....	11
II-6-3. Composition du viandes hachées.....	11

CHAPITRE III:

LES GERMES RESPONSABLES DES INTOXICATIONS ET TOXIINFECTIONS PAR LA VIANDE

III-1.Le genre <i>Salmonella</i>	12
III-1-1.Position systématique.....	12
III-1-2.Caractères morphologiques.....	12
III-1-3.Caractères cultureux.....	12
III-1-4.Caractères biochimiques.....	12
III-1-5. Habitat.....	13
III-1-6.Rôle pathogène.....	13
III-1-7.Recherche des <i>Salmonelles</i>	14
a-Préenrichissement.....	14

b-Enrichissement.....	14
c-Isolement.....	14
d-Identification.....	15
III-2.Les <i>Staphylocoques</i> pathogènes.....	15
III-2-1.Position systématique.....	15
III-2-2.Caractères morphologiques.....	15
III-2-3.Caractères cultureux.....	15
III-2-4.Caractères biochimiques.....	15
III-2-5. Habitat.....	16
III-2-6.Rôle pathogène.....	16
III-2-7.Recherche des <i>Staphylocoques</i> pathogène:.....	16
<i>Staphylocoques aureus</i>	
a-Enrichissement.....	16
b-Isolement.....	16
c-Identification.....	17
III-3 . <i>Escherichia coli</i>	17
III-3-1.Position systématique.....	17
III-3-2.Caractères morphologiques.....	17
III-3-3.Caractères cultureux.....	17
III-3-4.Caractères biochimiques.....	17
III-3-5. Habitat.....	18
III-3-6.Rôle pathogène.....	18
III-3-7.Recherche des <i>Escherichia coli</i>	18
a-Isolement	18
b-Identification.....	18

PARTIE PRATIQUE

1-Échantillonnage.....	19
2-Préparation de la SM et des dilutions.	19
3-Étude microbiologique.....	20
3.1. Recherche et dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM).....	20

3.2. Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et Coliformes fécaux	20
3.3. Recherche et dénombrement des <i>Staphylocoques</i> pathogènes.....	21
3.4. Recherche des <i>Salmonelles</i>	22
4- Identification des souches d' <i>E.coli</i> isolées au cours de notre étude.....	22
4.1 Coloration de Gram.....	22
a. Technique.....	22
b. Lecture	23
4.2. Étude du métabolisme glucidique.....	23
4.2.1. Utilisation des sucres.....	23
4.2.2 Mannitol mobilité.....	23
4.2.3. Fermentation des sucres en milieu TSI.....	24
4.2.4. Test IMVIC (indole/ methyl-rouge/ VP (inositol)/ citrate).....	25
a-Production d'indole.....	25
b- Réaction de rouge de méthyle.....	25
c- Réaction de Voges – Proskaur (VP).....	25
d- Utilisation du citrate de Simmons.....	26
4.3. Étude du métabolisme protéique.....	26
Recherche de l'uréase.	

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I-Evolution de la flore en fonction du temps et température.....	33
I-1. la viande fraîche.....	33
I.2. Viande hachée exposée à l'air libre.....	35
I-3. Viande hachée conservée dans des boites stériles à température ambiante.....	36
I-4. viande hachée réfrigérée.....	38
I-5. Viande hachée congelée.....	40
II- Résultats de l'identification biochimique.....	44
Conclusion générale	45
Annexes	
Bibliographie	

Liste des figures

Figure1:Schéma récapitulatif de l'origine de contamination selon Guy Leyral 2001.....	2
Figure2 : La préparation de la solution mère.....	28
Figure3 : Recherche et dénombrement du FTAM (Flore totale aérobie mésophile).....	29
Figure4 : Recherche et dénombrement des coliformes.....	30
Figure5: Recherche et dénombrement des Staphylococcus aureus.....	31
Figure6: Recherche des Salmonelles.....	32
Figure (7.8.9.10) Représentations graphiques de l'évolution de la FTAM.....	35,36,38,40
et la flore pathogène en fonction du temps	
Figure11. Résultats des tests biochimiques.....	42
Figure12 . Test d'indole	42
Figure13 . Aspect des colonies d'E. coli sur gélose désoxycolate 0.1%	43

Abréviations

Vp : Voge-Proskaur.

RM : rouge de méthyle.

TSI : milieu : Triple Sugar-iron agar : gélose glucosé-lactose-saccharose-SH₂.

Molo : Mobilité.

Man : Mannitol.

CT : Coliformes totaux.

CTT : Coliformes thermotolérants.

FTAM : Flore totale aérobie mésophiles.

ABC: Absence

H: heure.

IND: Indénombrable

SS: *Salmonella-Shigella*.

DCL: désoxycholate citrate lactose.

DCLS: désoxycholate citrate lactose saccharose.

BLBVB: Bouillon lactosé bilié ou vert brillant

EMB: éosine-bleu de méthylène

SM: solution mère.

Introduction

Introduction

L'examen bactériologique des denrées alimentaires, garde toute sa valeur dans le domaine de l'hygiène des aliments, même si actuellement les grands moyens d'information ont plutôt tendance à mettre l'action sur les pollutions d'ordre chimiques ou physico-chimiques.

En effet, les denrées d'origine animale peuvent constituer un excellent milieu pour le développement des bactéries.

Ce développement des microorganismes provoque certaines affections par l'altération des produits contaminés, particulièrement les intoxications et les toxi-infections alimentaires.

Il existe de nombreuses sources de contamination d'un bout à l'autre de la chaîne alimentaire, mais la perception de cette contamination est difficile.

L'objectif de notre travail est d'attirer l'attention des pouvoirs publics sur les dangers que peut engendrer une viande hachée mal conservée et ceci par une recherche de la flore pathogène (*Salmonella*, *Staphylocoques*, *E. coli*) en fonction du temps et de la température de conservation.

Partie

I

Partie bibliographique

Chapitres

- **L'aspect sanitaire et commercial des produits alimentaires.**
- **Étude de la filière viande (bovine).**
- **Les germes responsables des intoxications et toxi-infections alimentaires par la viande.**

Chapitre I

Aspect sanitaire et commercial
des produits alimentaires

I.1. Flore microbienne des aliments :

Les microorganismes des aliments ont trois origines possibles [9,10] :

- 1- Ils préexistent dans la matière brute ou l'aliment avant toute transformation ou manipulation (flore originelle).
- 2- Ils sont apportés accidentellement lors des manipulations ultérieures de l'aliment (flore de contamination).
- 3- Ils sont ajoutés volontairement.

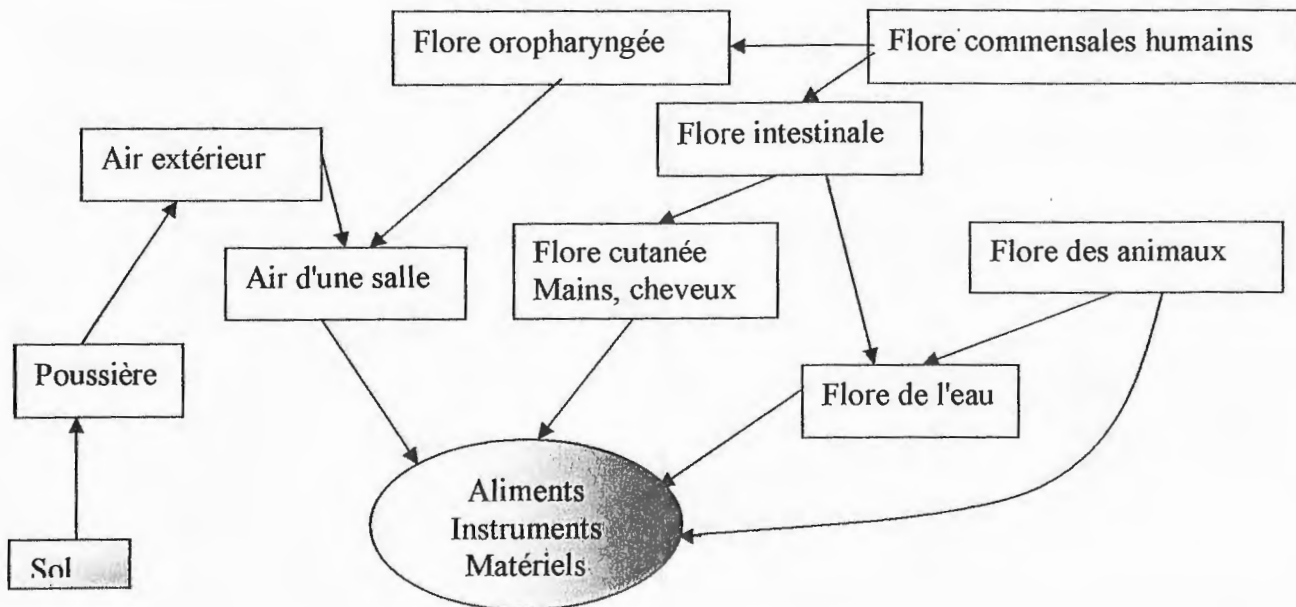


Figure1:Schéma récapitulatif de l'origine de contamination selon Guy Leyral 2001...[10]

I.1.1 Modification microbienne des aliments : Incidence sur la qualité

L'action des microorganismes sur un aliment est variée et affecte les caractères physico-chimiques, nutritif et organoleptiques.

Une prolifération microbienne entraîne de nombreuses modifications favorables ou non qui affectent l'odeur, la saveur, l'aspect, la couleur, la texture mais aussi sur la valeur nutritionnelle [9,10].

I.1.2 Incidence sanitaire de la présence des microorganismes :

La présence de germes dans les aliments peut provoquer des maladies alimentaires plus ou moins graves. On distingue trois types de maladies [9].

a. Les intoxications alimentaires :

Les germes commensaux de l'homme et des animaux qui ne posent pas de problème sanitaire lorsqu'ils sont en faible quantité, peuvent se révéler dangereux s'ils se multiplient abondamment jusqu'à 10^6 à 10^9 germes.

Ils peuvent produire des substances toxiques telle que les métabolites toxiques à partir de certains composés organiques de l'aliment : exemple des amines produites par décarboxylation des acides aminés.

b. Les intoxications alimentaires :

Elles sont provoquées par des microorganismes qui secrètent ou libèrent une ou plusieurs toxines dans l'aliment (exemple de la toxine botulinique). Dans ce cas ce n'est pas la présence du germe qui est importante mais celle de la toxine.

c- Toxi-infections alimentaires :

Il s'agit des infections locales du tube digestif ou générales, caractérisées par une prolifération plus ou moins importante de germes liée à la production de toxines (exemple le choléra) [9].

1.2. Méthodes d'analyses microbiologiques :

Les aliments sont riches en éléments nutritifs et peuvent être le siège d'une prolifération microbienne et des transformations qu'elles entraînent. Ces activités ont une grande incidence sur la qualité intrinsèque et donc commerciale des produits qui peut être améliorée ou abaissée, mais également sur la qualité hygiénique [9].

La qualité bactériologique d'un aliment est appréciée en fonction d'un résultat d'analyse ou figurent l'identification et la numération d'une ou plusieurs catégories de germes [1].

Elle se présente sous deux aspects : La qualité hygiénique et la qualité commerciale.

1.2.1 Qualité hygiénique.

Elle se définit par rapport à une charge microbienne, correspondant à l'absence ou à la présence des germes pathogènes ou des toxines, et à la limitation de la flore globale et des flores indicatrices. Elle a pour objectif la garantie de la santé du consommateur.

Un aliment de bonne qualité hygiénique veut dire qu'il ne contient ni quantitativement beaucoup de bactéries, ni qualitativement des bactéries pathogènes comme *Salmonella* [4].

1.2.2 Qualité commerciale.

Elle se définit par rapport à l'existence d'un risque d'altération, correspondant à la présence d'un nombre de microorganismes d'altération suffisant pour abaisser sensiblement la qualité organoleptique [1].

1.2.3 Le contrôle microbiologique.

L'analyse bactériologique des produits alimentaires est indispensable :

- ❖ pour assurer au produit une bonne qualité et une bonne conservation (contrôle de la qualité commerciale des denrées alimentaires en particuliers dans les opérations diverses de conservation).
- ❖ pour garantir la qualité hygiénique et donc la sécurité des consommateurs en permettant la détection de microorganismes et des toxines microbiennes.

Le contrôle microbiologique peut être réalisé de façon systématique (contrôle périodique) ou être réalisé à partir de cas précis (accident de fabrication, produits suspects, cas clinique) pour rechercher la cause des accidents.

L'objectif donc du contrôle microbiologique est l'obtention d'une bonne qualité par une bonne stratégie [4].

Pour atteindre une bonne qualité, il faut définir une bonne politique du contrôle qui se répartit en 3 niveaux [1] :

a-Contrôle préventif.

C'est le contrôle des matières brutes, dans le but de connaître la charge microbienne globale des produits. Son identification est évaluée la valeur sanitaire par la recherche de germes pathogènes en cas de risques graves [1].

b-Contrôle au cours de la fabrication.

C'est le contrôle du produit lui-même sur les facteurs influençant la qualité (le personnel et les conditions de préparation) [1].

c-Contrôle des produits finis.

Il sanctionne la fabrication en déterminant la qualité microbiologique des produits livrés à la consommation et sa conformité aux normes officielles établies par l'usine [1].

I.2.4.Principes et stratégies du contrôle :

Les analyses permettent de contrôler l'absence des microorganismes dangereux et le niveau de la flore tolérable.

Les résultats obtenus sont comparés aux « critères microbiologiques » établis par des commissions de spécialistes au sein d'organismes comme : **AFNOR** (Association Française de Normalisation), **OMS** (Organisation Mondiale de la Santé), **FAO** (Food and Agriculture Organisation) [9].

Les critères et les normes microbiologiques donnent en général les limites de la conformité et de la toxicité de même que les méthodes à utiliser [9, 10, 13].

Au niveau sanitaire :

Les analyses les plus couramment pratiquées en microbiologie aussi bien sur la matière première qu'en cours de fabrication ou sur le produit fini, concernent les numération de: la flore totale aérobie mésophile, des coliformes totaux et fécaux, des streptocoques, des anaérobies sulfite réducteurs, des moisissures des levures et la recherche des germes pathogènes (*Salmonella*, *Staphylococcus*...) par épreuves du type présence ou absence.

Les germes banaux de contamination n'agissent sur l'aliment et n'ont de répercussion du point de vue sanitaire que s'ils sont en grande quantité. Le facteur quantitatif va donc intervenir au niveau de l'analyse de cette flore.

Les germes pathogènes ayant de graves conséquences sur la santé ne pourront être tolérées même en petite quantité. Le contrôle à appliquer n'a pas forcément besoin d'être quantitatif [9].

Chapitre II

Étude de la filière viande (bovine)

II . La viande.

II.1. Définitions.

La viande est la partie consommable de la carcasse, c'est le produit de l'évolution. Post mortem du muscle strié [16].

La viande livrée à la consommation provient de divers animaux de boucherie bovins, ovins caprins...

Ces animaux sont tués et ils sont découpés en quartiers dans les abattoirs. Après assommage ou anesthésie, ils sont saignés puis dépouillés et éviscérés. La carcasse est parfois lavée et elle est ensuite découpée en quartiers (première transformation). Très rapidement, les quartiers sont stockés au froid ce qui aura incidence importante sur l'évolution de flore microbienne.

La découpe primaire (deuxième transformation) s'effectue au niveau des grossistes et la préparation (désossage et parage) de la viande s'effectue au stade du détaillant (troisième transformation)

II.2. Composition de la viande.

Du point de vue composition, le muscle comprend les fibres, le tissu conjonctif qui entoure les fibres, le tissu lipidique et la myoglobine qui confère au muscle la couleur rouge. Ce dernier renferme également environ 75% d'eau, 20% de protéines, 3% de lipides, 1,2% sels minéraux, les vitamines et des hormones mais il contient très peu de glucides (glycogène) [16].

Les viandes sont donc riches en protéines de hautes valeurs et en graisses mais elles contiennent très peu de glucides (glycogène).

II.3. Valeur alimentaire de la viande.

La viande est un excellent aliment protidique se classent immédiatement après l'œuf, les produits laitiers, le poisson et bien avant tous les aliments végétaux [20].

La viande est une source de certaines vitamines de complexe B comme la vitamine B₁₂ également de Zinc et de Potassium.

Les protéines de la viande sont dites complètes, par opposition à celles des végétaux dites incomplètes [2].

Vue sa composition la viande est un substrat favorable au développement des microorganismes essentiellement des microorganismes protéolytiques qui entraînent des modifications néfastes sur l'odeur, la couleur, la texture et produisent des substances toxiques.

II.4. Microflore de la viande.

Les microorganismes de la viande ont des origines diverses, ils peuvent être à l'origine d'une contamination du muscle lui-même, soit pénétrer au cours de la mort de l'animal, soit enfin être apportés par les manipulations que subissent les carcasses et produits de viande au cours de la découpe et de la distribution. Les germes se multiplient par la suite, provoquant éventuellement des altérations en rendant la viande dangereuse pour le consommateur [5,9].

II.4.1. Contamination initiale.

Les viandes sont inévitablement polluées à la sortie de l'abattoir et des ateliers de découpe, dans leur profondeur mais surtout à leur surface [5].

a-Contamination du muscle avant la mort (contamination profonde) :

La contamination ante mortem est toujours limitée. Les animaux malades sont en effet systématiquement éliminés par les services vétérinaires lors des contrôles ante et post mortem. Par contre, il arrive que des animaux apparemment sains hébergent notamment dans leur tube digestif des germes dangereux, en particuliers des salmonelles qui lors d'agressions passent dans le muscle (mauvaise conditions d'abattage, accident, traumatisme...) [5,9].

b-Contamination agonique et post mortem (profonde et superficielle) :

L'essentiel des germes est apporté au cours de l'abattage (contamination agonique) et au cours de la préparation de la carcasse (contamination post mortem) par l'environnement : matière fécale (), peau (), instruments, manipulateurs.....

La contamination profonde est généralement peu importante dans le cas d'animaux sains abattus dans de bonnes conditions de l'ordre de 1 germe par 10 grammes et le plus souvent 1 germe par 100 grammes.

Une contamination non négligeable des carcasses par les bactéries intestinales peut prendre place plusieurs heures après la mort lorsque la paroi intestinale fragilisée permet l'entrée de ces bactéries (le stress d'abattage favorise ce passage) d'où le danger d'une éviscération tardive : dans les conditions habituelles, l'éviscération est réalisée dans la demi-heure suivant la saignée [5].

La contamination superficielle des carcasses est toujours beaucoup plus importante : son niveau, très variable, se situe aux environs de 10^3 - 10^4 germes/cm². Ceux-ci proviennent essentiellement de l'animal lui-même (poils, excréments), de l'aire d'abattage (sol,

manipulateurs), des ateliers de découpe et des chambres de stockage. Leur origine exogène montrent l'importance des règles d'hygiène à respecter lors de la préparation des carcasses [5].

Parmi les germes isolés en surface, on trouve principalement : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* et un certain nombre d'entérobactéries (*Klebsella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Serratia*). On rencontre également différentes variétés de *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, des levures et des moisissures.

II.4.2 Multiplication de la microflore initiale :

Par sa composition chimique, la viande représente toujours un milieu privilégié pour la contamination microbienne. Il va dépendre de facteurs intrinsèques et extrinsèques :

Les facteurs de la croissance microbienne dans la viande sont notamment l' a_w , le rH, le pH, la température.

a. Facteurs intrinsèques.

✓ Activité de l'eau « a_w » :

Elle mesure la disponibilité en eau du milieu dans lequel se trouve la microflore. En effet plus l' a_w du milieu est élevée, c'est-à-dire proche de 1, plus la microflore est intense [5].

L' a_w de la viande fraîche est de 0,98-0,99 qui est favorable à la multiplication de toutes les espèces microbiennes. Si la profondeur de la viande conserve une a_w élevée il n'en est pas de même de la surface.

Les variations de l' a_w de la surface de la viande (liée à l'humidité relative de l'atmosphère) ont des conséquences sur la croissance des germes superficiels. Tout abaissement de cette a_w se traduit par une dessiccation qui s'oppose à la multiplication microbienne [5,9].

En effet la viande conservée dans une atmosphère ayant une humidité relative élevée (supérieure à 95 %) se conserve moins longtemps qu'une viande entreposée en ambiance sèche.

✓ pH :

Le pH du muscle vivant est voisin de la neutralité. Après la mort il descend plus ou moins rapidement pour atteindre lors de l'apparition de la rigidité cadavérique une valeur de 5,5 à 5,7. Cette valeur reste ensuite fixe, c'est celle que l'on observe dans la viande normale.

D'une façon générale, on observe que la vitesse de développement des microorganismes est réduite par tout abaissement de ce paramètre [5].

✓ Potentiel d'oxydo-réduction (rH) :

Après la mort, le muscle ayant des réserves en oxygène présente un « rH » profond élevé et positif (+250mV) ce qui est favorable à la multiplication des germes aérobies.

En suite, les réserves en O₂ n'étant plus renouvelées par le sang, le « rH » profond diminue très rapidement. Il devient négatif et en 4 à 6 h atteint une valeur de -200mv.

Les conditions réductrices ainsi créées dans la profondeur de la viande sont favorables au développement des germes anaérobies de putréfaction [5].

b. Facteurs extrinsèques.

✓ Température :

En règle général, les germes se multiplient d'autant plus lentement que la température est plus basse.

Nous notons les paliers suivants [5] :

- +10°C : Arrêt de la toxinogénèse de *Clostridium botulinum* (A et B).
- +3°C : Arrêt de tout risque de nocivité liée à la croissance des germes ou à l'élaboration de toxine (mais certains psychrotrophes se multiplient encore lentement).
- 0°C : Température souhaitée pour la conservation de la viande sous vide.
- -10°C-18°C : Croissance persistante de moisissures et levures.
- -18°C : Arrêt de toute multiplication microbienne.

Le maintien continu de la viande à des température voisine le plus possible de 0°C limite la multiplication des germes.

✓ **Atmosphère gazeuse :**

La composition de l'atmosphère gazeuse dans laquelle les viandes sont stockées peut affecter l'importance de leur charge microbienne. Le CO₂ par exemple présente un effet bactériostatique spécifique [4].

II.5 Conservation des viandes.

Les viandes sont des denrées très périssables, leur production industrielle n'est envisageable que si elle est assortie de méthodes de conservation fiables et de durée convenable [17].

II.5.1 Conservation traditionnelle.

a. Fumigation.

La fumigation est une méthode de traitement par les fumés (mélanges de gaz, de vapeur d'eau et de fines particules), qui permet d'éliminer l'essentiel de la flore initiale et en même temps de compléter leur destruction par une cuisson. C'est le principe de la stérilisation par la chaleur utilisé en conserverie [17].

b. Salaison.

La salaison, autre moyen de conservation de la viande, est l'addition de chlorure de sodium qui permet d'augmenter la pression osmotique, abaisser l'activité de l'eau et inhiber par conséquent le développement des bactéries [17].

II.5.2 Conservation de viande fraîche.

a. La réfrigération.

La réfrigération consiste à abaisser la température de la viande à une valeur légèrement supérieure à son point de congélation (4°C pour les carcasses). Le domaine de conservation par réfrigération est celui des températures comprises entre l'ambiance et la température de congélation, en principe jusqu'à 0°C [5].

b. Congélation.

La congélation repose sur un abaissement de la température au dessous de 0°C (en générale vers -18°C), de façon à transformer une grande partie de son eau en glace et maintenir cet état pendant toute la durée de la conservation.

Elle assure une stabilité du produit au cours d'un stockage prolongé [8].

II.6. Viandes hachées.

II.6.1 Définition.

Les viandes hachées sont des viandes qui ont été seulement soumises à une opération de hachage en fragments ou à un passage dans un hachoir [21].

II.6.2. Conditions de production.

Les viandes hachées doivent être fabriquées dans des ateliers pour la mise sur le marché communautaire. Les matières premières doivent provenir exclusivement d'ateliers de découpe agréés pour la mise sur le marché communautaire et être utilisées dans un délai de : six jours maximum après abattage pour la viande réfrigérée, neuf jours maximum après abattage pour la viande bovine désossée conditionnée sous vide et 18 mois pour la viande bovine congelée [21].

II.6.3. Composition des viandes hachées: [22]

Catégorie de viande hachée	Taux de matière grasse (MG en %)	Rapport collagène sur protide (μ P en %)
Viande hachée maigre	≤ 7	≤ 12
Viande hachée pour bœuf	≤ 20	≤ 15
Viande hachée pour veau	≤ 20	≤ 15
Viande hachée contenant du porc	≤ 30	≤ 18
Viande hachée d'autres espèces	≤ 25	≤ 15

Commentaires :

Le collagène est une des protéines constitutives du tissu conjonctif enveloppant les fibres musculaires. La quantité présente dans le muscle et ses propriétés qui varient avec l'espèce animale, l'âge et le type de muscle conditionnent entre autres facteurs, la tendreté de la viande. La teneur en collagène ne s'exprime pas en valeur absolue mais en pourcentage par rapport aux protéines totales (rapport C/P).

Compte tenu de la faible valeur nutritionnelle du collagène, les produits de meilleure qualité sont ceux dont le rapport C/P est le plus faible [22].

Chapitre III

Les germes responsables
des intoxications
et toxi-infections alimentaires
par la viande

Tous les types d'intoxications alimentaires sont susceptibles d'être provoqués par les viandes, cependant dans la pratique on trouve une certaine fréquence certains agents : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *E.coli* ...[15].

III.1.Le genre *Salmonella*.

III.1.1 Position systématique.

Les bactéries du genre *Salmonella* appartiennent à la famille des *Entérobactériaceae*. Elles ont en commun la fermentation du glucose, la réduction des nitrates en nitrites et d'être dépourvues d'oxydase.

Le genre *Salmonella* comprend une seule espèce *Salmonella enterica*. Plus de 2200 serovars ont été à ce jour isolés. Ils se différencient par leurs antigènes de paroi (antigènes O) et leurs antigènes flagellaires (antigènes H) [10].

III.1.2. Caractères morphologiques.

Les salmonelles sont des bâtonnets Gram négatif, mobiles grâce à une ciliature péritriche mais des mutants immobiles peuvent exister comme le sérovar *S.pullorum* qui est toujours immobile [18].

III.1.3. Caractères cultureux.

Les salmonelles sont capables de se multiplier entre 6 et 46°C mais leur optimum est aux environs de 37°C. Les salmonelles survivent très bien aux basses températures (réfrigération, congélation) mais sont relativement sensibles à la chaleur et sont détruites par la pasteurisation. Elles sont capables de se multiplier dans une plage de pH allant de 5 à 9 (optimum 7) [22].

III.1.4. Caractères biochimiques.

Les bactéries du genre *Salmonella* ont les principaux caractères biochimiques suivants [22,18]:

- L'absence d'uréase et de tryptophane désaminase.
- L'absence de production d'indole et d'acétoïne.
- La non fermentation du lactose et du saccharose.

- La production d'H₂ s à partir du Thiosulfate.
- La décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine.
- La pousse fréquente sur le milieu au citrate de Simmons.
- La fermentation du glucose avec production du gaz, à l'exception de certains serovars qui ne produisent jamais de gaz, tels que *S. typhi* et *S. pullorum* et *S. gallinarum*.
- Possession de la lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase et arginine décarboxylase.

III.1.5. Habitat.

De nombreuses espèces animales (animaux à sang froid ou à sang chaud) hébergent des salmonelles pathogènes pour l'homme, mais la source principale est le tube digestif de l'homme [1].

On peut retrouver dans les produits alimentaires comme la viande des sérotypes habituellement pathogènes de salmonelles [23].

III.1.6. Rôle pathogène.

Pour certains sérotypes, *Salmonella typhimurium* en particulier, la viande hachée insuffisamment cuite est une source bien documentée d'infection.

La contamination post mortem des viandes manipulées par les salmonelles n'est exceptionnelle. Les salmonelles sont en effet des hôtes fréquentes des espèces animales (y compris l'homme).

L'ouverture accidentelle des réservoirs digestifs d'animaux apparemment sains peut contaminer l'aire d'abattage et les carcasses.

Au cours des différents traitements, la viande peut également être contaminé par des manipulateurs porteurs de germes (malades guéris) hébergeant dans leur tube digestif des salmonelles qu'ils excrètent dans leurs matières fécales. La souillure de leurs mains est ainsi possible notamment s'ils ne respectent pas les règles d'hygiène.

Cette contamination fécale de surface est sans conséquence pour la viande qui n'est pas hachée puisque la cuisson l'élimine facilement.

Pour la viande hachée la contamination est redistribuée au centre de la matière première. Une cuisson insuffisante risque donc ne pas l'éliminer. Des erreurs dans les pratiques de

préparation et de conservation (chaîne du froid et du chaud en particulier) facilitent par ailleurs la prolifération du germe.

III.1.7. Recherche des salmonelles.

Les salmonelles ne sont présentes en général qu'en petit nombre dans la viande sauf lors de toxi-infection. Pour mettre en évidence cette contamination il est indispensable d'utiliser des techniques particulières. La recherche comporte quatre étapes successives [23] :

- Préenrichissement (6-18 heures).
- Enrichissement en milieu sélectif liquide (24-48 heures).
- Isolation sur milieu sélectif solide (24-48 heures).
- Identification.

a. Préenrichissement.

Cette phase est destinée à revivifier les cellules de façon à faciliter la culture dans les bouillons d'enrichissement [9].

Le milieu le plus employé est le Tryptone-Sel et éventuellement l'eau peptonée tamponnée.

Le préenrichissement est réalisé en broyant 25g de produits avec 100ml de Tryptone-Sel ou d'eau peptonée tamponnée et en incubant 16 à 20 heures à 37°C [11].

b. Enrichissement.

Il se réalise en transférant un volume de 10ml du milieu de préenrichissement dans 100ml de milieu d'enrichissement qui est généralement le bouillon sélénite Cystine. L'incubation se fait 37°C ou 43°C pendant 24 à 48 h [11].

c. Isolement.

S'effectue sur des milieux sélectifs solides à partir des milieux liquides d'enrichissement [11].

Les principaux milieux utilisables sont : La gélose au vert brillant, la gélose Hektoen, la gélose D.C.L.S, ou D.C.L, la gélose SS.

d. Identification :

Les colonies caractéristiques sont purifiées et identifiées biochimiquement (les galeries API) [11].

III.2. Les staphylocoques pathogènes (Coagulase positive).

III.2.1. Position systématique.

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Micrococcaceae*, l'ordre des *Micrococcales*, la classe des *Asporulales* et l'embranchement des *Fu-bacteria* [14].

la classification actuelle distingue une vingtaine d'espèces, seules les staphylocoques coagulase positive sont considérées comme potentiellement pathogènes. Trois espèces peuvent coaguler le plasma de lapin : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* [5,10].

III.2.2. Caractères morphologiques.

Les staphylocoques sont des cocci à GRAM positive, disposés en amas le plus souvent en grappes de raisin [11]. Ils sont immobiles, asporulés, parfois capsulés

III.2.3. Caractères culturels.

Aérobies anaérobies facultatifs, les *Staphylococcus* cultivent facilement sur tous les milieux ordinaires de 37°C et pH de 7,5 [11].

Staphylococcus aureus élabore un pigment caroténoïde qui donne aux colonies une coloration jaune ou orange d'intensité très variable selon les souches.

III.2.4. Caractères biochimiques.

Les bactéries du genre *Staphylococcus* ont les principaux caractères biochimiques suivants [11,13]:

- La possession d'une catalase fortement positive.
- Fermentation du mannitol : cette attaque permet d'orienter vers *Staphylococcus aureus*.
- La possession d'une Arginine-dihydrolase (ADH).
- La production d'une coagulase libre (*Staphylococcus aureus*)
- Ont une réaction d'oxydase négative.

III.2.5. Habitat.

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires. Ils peuvent être saprophytes (retrouvés dans le sol, l'air et les aliments) ou germes commensaux de la peau et les muqueuses de nombreux mammifères [13].

III.2.6. Rôle pathogène :

On rencontre occasionnellement des staphylocoques pathogènes dans des viandes fraîches contaminés par les manipulateurs humains (plaies aux mains, angine...). Toutefois, ce germe ne semble pas se développer aisément dans les conditions normales de stockage et la formation d'entérotoxine est inhibée par la flore superficielle des viandes. Par contre, les produits de salaison et les viandes hachées constituent un certain danger .

III.2.7. Recherche des staphylocoques pathogènes *Staphylococcus aureus*.

En bactériologie alimentaire, il est nécessaire d'utiliser des milieux sélectifs afin d'isoler des bactéries du genre *Staphylococcus*. Cette recherche se réalise en trois étapes successives [11] :

- L'enrichissement.
- L'isolement.
- L'identification.

a. Enrichissement.

Il se réalise dans un milieu sélectif liquide, le bouillon de **GIOLITTI** et **CANTONI** additionné de **TWEEN 80**. Les tubesensemencés sont placés à l'étude à 37H pendant 24 h [11].

b. Isolement.

L'isolement s'effectue après 24 à 48 h d'incubation sur des milieux sélectifs solides afin de mettre en évidence la présence des colonies de *Staphylococcus aureus*.

Le milieu d'isolement le plus employé en bactériologie alimentaire est le milieu de **BAIRD PARKER**. Sur ce milieu, les colonies de staphylocoques pathogènes apparaissent après 24 h d'incubation à 37°C sous forme de points noirs, convexes, brillants, avec un liseré blanc opaque entouré d'une auréole claire.

Un autre milieu utilisé est celui de **CHAPMAN** qui grâce à sa forte teneur en NaCl, inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que le staphylocoque [11].

c. Identification.

L'identification *S.aureus* est basée sur la mise en évidence de la coagulase. Des tests complémentaires doivent être effectués comme par exemple la recherche de la catalase, recherche des thermonucléas et la dégradation du mannitol.[23].

III.3.Escherichia coli.

III.3.1. Position systématique.

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, la classe de *Scotobacteria* et l'embranchement des *Graciticutes* [14].

III.3.2. Caractères morphologiques.

Ce sont des bacilles fins, mobiles par ciliature péritriche ou immobiles [3].

III.3.3. Facteurs cultureux.

Aérobie anaérobie facultatif, *E coli* cultive facilement sur les milieux ordinaires à 37°C (mais elle pousse aussi entre 15°C et 45°C) et à pH 7,5 [24].

Sur milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif [3].

III.3.4. Caractères biochimiques :

Escherichia coli ont les principaux caractères biochimiques suivant [3,7,24,6]. :

- Production de l'indole à partir du tryptophane.
- La non utilisation du citrate de Na (milieu Simmons) comme source de carbone et d'énergie
- La non production de l'acétoïne (Voges- Proskaur négatif).
- Fermentation avec production de gaz du glucose, lactose et du mannitol.
- La possession d'une lysine décarboxylase, une β galactosidase mais pas d'uréase.
- Croissance à 44°C.

III.3.5. Habitat.

Escherichia coli est un commensal du tube digestif de l'homme et animal. Il représente à lui seul une grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin [25].

III.3.6. Rôle pathogène.

Comme les salmonelles, *Escherichia coli* contamine la viande lors de l'abattage de l'animal à partir du contenu intestinal.

Les *E. coli* entérohémorragiques surtout producteurs de vérotoxines (O157:H7 en particulier) peuvent aussi être transmis par la viande hachée avec des conséquences sanitaires beaucoup plus dramatiques [12].

III.3.7. Recherche des *Escherichia coli*.

La détection des *Escherichia coli* dans les aliments peut être réalisés par la méthode classique ou alternative. Le diagnostic de contamination d'un aliment par cette bactérie nécessite trois phases dont une indispensable : la phase d'enrichissement [18].

a. L'isolement :

L'isolement par culture bactériologique sur un milieu sélectif. Il existe plusieurs milieux solides sélectifs utilisés : EMB éosine au bleu de méthylène, désoxcholate de Na ou liquides tels que BLBVB et Schubert. L'incubation se fait pendant une nuit à 37°C ou à 42°C [18].

b. Identification :

Cette confirmation nécessite : la confirmation par les tests biochimiques et la confirmation de la production de vérotoxine. Cette seconde étape reste encore réservée à des laboratoires spécialisés [18].

Partie II

Partie Pratique

Matériel et méthodes

Résumé

Ce travail a été réalisé dans laboratoire de Microbiologie de l'institut des sciences de la nature de l'université de JIJEL.

Les différentes analyses portent sur une viande hachée commercialisée et sont consacrées à l'étude de l'évolution en fonction du temps et de la température de la flore banale et la flore pathogène dans ce produit.

1. Échantillonnage.

Dans cette étude les prélèvements des échantillons ont été effectués au niveau de boucherie en face de l'université de JIJEL.

Trois échantillons ont été effectués :

- Premier échantillon le : 24/04/2004.
- Deuxième échantillon le : 06/04/2004.
- Troisième échantillon le : 13/05/2004.

Pour chaque échantillon 500 g de viande bovine sont achetés, 250g sous forme de cuisse bovine et 250g de la même viande mais hachée (hachage effectué sur place). Les échantillons mis dans des boîtes de pétri stériles sont directement acheminés au laboratoire.

2. Préparation de la SM et des dilutions. (figure2)

Le prélèvement de la viande fraîche et hachée arrivée au laboratoire nécessite le suivant :

- 1-La cautérisation au fer rouge de la surface de la viande fraîche.
- 2-Prélèvement de 10g de viande fraîche et 10g de viande hachée.
- 3-La masse prélevée de chaque type de viande est placée dans 90ml d'eau peptonée ou d'eau physiologique stérile.
- 4-Homogénéisation de chaque échantillon à l'aide d'un vortex. Les suspensions ainsi obtenues correspondent à la dilution 10^{-1}
- 5- la réalisation des dilutions à partir de la solution mère pour chaque type de viande.

3. Étude microbiologique.

Toutes les manipulations sont réalisées dans des conditions d'asepsie rigoureuse afin de limiter les éventuelles contaminations susceptibles d'influencer les analyses.

3.1. Recherche et dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM).

Principe :

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile reflète la qualité microbiologique générale d'un produit naturel et permet d'en suivre l'évolution. Il dépend des conditions de température, en général on le réalise à 30°C « germes aérobies totaux à 30°C ». Ce dénombrement est généralement réalisé en milieux solide PCA (plate countagar : gélose de dénombrement) et la gélose nutritive GN. **figure (3)**

Technique :

On ensemence 1ml de la solution mère ou ses dilutions dans la masse du milieu gélose.

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 72 h.

Lecture :

On prend en considération seulement les boîtes qui donne un nombre de colonies de 15 à 300 colonies

3.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux.

Principe :

Les coliformes regroupe un certain nombre d'espèces des *Enterobactériaceae* dont la caractéristique principale est la fermentation du lactose avec production du gaz pendant 48 h. les bactéries correspondent appartiennent aux genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsella* et *Enterobacter*.

Les coliformes fécaux ou thermotolérants sont des coliformes fermentant la lactose avec gaz à 44°C.

E.coli est un coliforme thermotolérant (ou fécal) produisant l'indole à 44°C. Il est considéré comme un bon indice de contamination fécale (donc de présomption de bactéries pathogènes) pour les produits crus; dans les autres cas, il s'agit d'un indicateur d'hygiène générale. **figure (4)**

Techniques :

Les coliformes totaux et fécaux sont cultivés par ensemencement de 1ml de la dilution 10^{-1} (viande et viande hachée) en profondeur de la gélose de désoxycholate (inhibiteur des Gram +) à la concentration de 0,1%. Une deuxième couche du même milieu (5ml) est coulée après solidification.

L'incubation a lieu pendant 24 à 48 h à 30°C pour les coliformes totaux et 44°C pour les coliformes fécaux.

Lecture :

Toutes les colonies roses sont lactose +

3.3. Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes.

Principe :

La présence des staphylocoques pathogènes dans les viandes à un taux anormal indique une mauvaise hygiène générale.

Le dénombrement des *Staphylococcus aureus* est réalisé grâce à des milieux sélectifs (Chapman ou Baird Parker)

Le milieu de Baird-Parker est le milieu de choix en microbiologie alimentaire. Il contient de chlorure de lithium, du tellurite et une grande concentration en glycine pour inhiber la flore secondaire. Les *Staphylococcus aureus* donnent des colonies noires (réduction du tellurite en tellure), avec un halo clair dû à la protéolyse des protéines du jaune d'œuf et, éventuellement, un liseré blanc opaque (précipitation des acides gras produits par lécithinase qui hydrolyse la lécithine du jaune d'œuf).

Les colonies isolées ont une taille de 0,5 à 2mm et un aspect brillant. **figure (5)**

Technique :

Un volume précis (0,1ml) de la solution mère de la viande et la viande hachée est étalé sur le milieu de Baird-Parker puis incubé pendant 24 à 48h à 37°C.

Lecture :

La présence des staphylocoques est révélée par l'apparition des colonies noires avec halo clair.

3.4. Recherche des salmonelles.

Bactéries toujours pathogènes provoquant des gastro-entérites graves. Leur recherche et leur identification permettent donc de montrer le danger possible d'un produit alimentaire.

Le nombre de Salmonella étant en général faible dans le produit, il est nécessaire de procéder à un préenrichissement et à un enrichissement dans un milieu sélectif à température éventuelle (43°C).

L'isolement des Salmonella est ensuite réalisé sur milieux sélectifs classiques (SS, DCL, HEKTOEN, gélose RPVB...). **figure (6)**

Technique :

Préenrichissement.

La recherche de Salmonelles s'effectue sur un broyage distinct de 25g de produit (viande, viande hachée) dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée (milieu non sélectif).

L'incubation est faite 16 à 20 h à 37°C.

Enrichissement sélectif :

Consiste à ensemercer avec 0,1 ml de la culture de préenrichissement, 10ml du bouillon sélénite SFB.

On incube à 37°C pendant 24 heures.

Isolement :

S'effectue à partir de chaque milieu d'enrichissement présentant un trouble. On étale 1ml sur la gélose HEKTOEN.

Le mode d'action de ce milieu est basé sur la fermentation du lactose et la production d'H₂S.

Lecture :

Les colonies suspectes seront vertes ou bleues avec ou sans centre noir

4. Identification des souches d'*E.coli* isolées au cours de notre étude.

4.1 Coloration de Gram.

a. Technique :

- ❖ Établir une goutte de la suspension bactérienne sur une lame.
- ❖ **Fixer** le frottis en séchant à température ambiante.

- ❖ Recouvrir la lame de la solution de violet de gentiane et laisser agir pendant une minute (coloration).
- ❖ Rincer à l'eau courante.
- ❖ Fischer le violet de gentiane avec du lugol.
- ❖ Décolorer l'étalement par l'alcool-acétoïne.
- ❖ Laver à l'eau.
- ❖ Recolorer par la solution de fuchsine et laisser agir 30 secondes.
- ❖ Après rinçage, sécher le frottis au papier et examiner à l'objectif (*100).

b. Lecture :

Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet.

Les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.

4.2. Étude du métabolisme glucidique

Les tests biochimiques reposent sur la recherche d'enzymes responsables de certaines réactions biochimiques, l'utilisation d'un substrat particulier ou la recherche des produits issus du métabolisme bactérien.

4.2.1. Utilisation des sucres.

Le milieu utilisé est celui de MEVAG (Milieu d ' Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) additionné de sucre.

Dans notre étude on a testé l'utilisation du glucose, lactose et saccharose à une concentration de 20% par *E. coli*.

Le sucre à tester doit être seul et la culture doit être pure.

L'utilisation des sucres est vérifiée par le changement de la couleur du milieu (l'indicateur coloré doit virer dans une bande de pH correspondant au acide formés et leurs quantités).

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48h.

4.2.2 Mannitol mobilité.

Le milieu mannitol mobilité permet de rechercher aussi bien la fermentation du mannitol que la mobilité bactérienne.

La dégradation du mannitol conduit à la formation à des acides à chaînes très courtes comme l'acide acétique et l'acide formique

Technique

Le milieu est ensemencé par piqûre centrale puis incubé à 37°C pendant 24 h.

Lecture :

La fermentation du mannitol entraîne un virage de la couleur du milieu en jaune.

La mobilité se traduit par un développement bactérien sous forme de nuage autour de la piqûre.

4.2.3. Fermentation des sucres en milieu TSI.

a. Principe :

Le milieu TSI est un milieu complexe qui permet la mise en évidence des enzymes qui sont responsables de la dégradation du glucose, du lactose et des acides aminés.

Ce milieu est utilisé pour l'identification des bacilles GRAM essentiellement les entérobactéries.

Du fait que toutes les entérobactéries fermentent le glucose. Dans un premier temps les bactéries ensemencées sur ce milieu le glucose grâce à leurs enzymes constitutives nécessaires à l'utilisation de ce sucre. La population bactérienne se développe rapidement jusqu'à épuisement du milieu du glucose et entraînant une acidification du milieu. A ce stade, deux cas sont possibles :

♦ Les bactéries capables de synthétiser les enzymes adaptatives nécessaires à l'utilisation du lactose, elles le fermentent et acidifient le milieu.

♦ Les bactéries dépourvues d'enzymes nécessaires aux métabolismes du lactose, se dirigent vers les acides aminés, dont le métabolisme engendre la formation des radicaux d'ammoniums qui alcalinisent le milieu. L' H_2S est formé à partir des acides aminés soufrés.

b. Technique :

Le culot du milieu TSI est ensemencé par piqûre centrale et la pente par stries. L'incubation se fait à 37°C durant 24 h.

c. Lecture :

- Fermentation du glucose : le culot vire au jaune.
- Fermentation du lactose : la pente devient jaune.

- Production de gaz : formation des bulles d'air dans la masse du milieu.
- Dégagement d'H₂S : noircissement de la pende et de culot.

4.2.4. Test IMVIC (indole/ methyl-rouge/ VP (inositol)/ citrate)

a-Production d'indole:

E. coli est très reconnue par sa capacité de dégrader le tryptophane en indole grâce à une tryptophanase.

Technique :

A partir des colonies isolées caractéristiques d'*E.coli*, on ensemence l'eau peptonée exempte d'indole et on incube à 37°C pendant 24h.

Après incubation on ajoute quelque goutte du réactif de Kovacs avec agitation.

Lecture :

L'apparition d'un anneau rouge en surface caractérise la production d'indole.

b. Réaction de rouge de méthyle RM

Principe :

Cette réaction permet de mettre en évidence l'acidification finale et importante d'un milieu glucosé après fermentation du glucose et production d'acides mixtes. Il s'agit d'acides organiques à courtes chaînes (acide acétique, acide formique). Ce sont des acides forts qui maintiennent le pH de la culture à un degré suffisamment bas pour que le rouge de méthyle garde sa coloration rouge.

Technique :

On prélève 1ml de la culture d' *E. coli* en milieu Clark et Lubs âgée de 24 h puis on ajoute quelques gouttes de rouge de méthyle.

Lecture :

- Réaction RM (+) : coloration rouge.
- Réaction RM (-) : coloration jaune.

c. Réaction de Voges – Proskaur (VP).

Principe :

Elle permet la mise en évidence de la production d'acétyl méthyle carbinol ou l'acétoïne à partir de la décarboxylation du pyruvate.

Technique :

On prélève 1ml de la culture d'*E. coli* en milieu Clark et Lubs âgée de 24 h puis on ajoute 0,5ml de VP1 (réactif naphtol) et 0,5ml de VP2 (NaOH à 16%). On agite et on laisse agir 10 à 15 minutes.

Lecture :

- Réaction VP (+) : coloration en rouge ou rose.
- Réaction VP (-) : aucun changement de couleur.

d. Utilisation du citrate de Simmons.

Principe :

Les bactéries possédant du citrate perméase utilisent le citrate comme seule source de carbone dans le milieu. L'utilisation de cette substance engendre la libération des ions d'ammonium (NH_4) qui seront ensuite converties en (NH_3) puis en (NH_4OH). Cela entraîne l'alcalinisation du milieu de culture qui est révélée par le virage de l'indicateur coloré (bleu de bromothymol).

Technique :

On ensemence le milieu de citrate de Simmons par en surface par des stries et on incube à 37°C pendant cinq jours.

Lecture :

L'utilisation du citrate se traduit par un développement bactérien accompagné d'un virage de la couleur du milieu de vert au bleu.

4.3. Étude du métabolisme protéique.

Recherche de l'uréase.

Principe :

Les micro-organismes utilisant l'urée comme seule source d'azote possèdent une uréase très active. Ils transforment l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium. Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu.

Technique :

À partir d'une culture d'*E.coli* on ensemence le milieu urée-indole et on incube à 37°C pendant 24 h.

Lecture :

La dégradation de l'urée se traduit par le virage de l'indicateur au rouge.

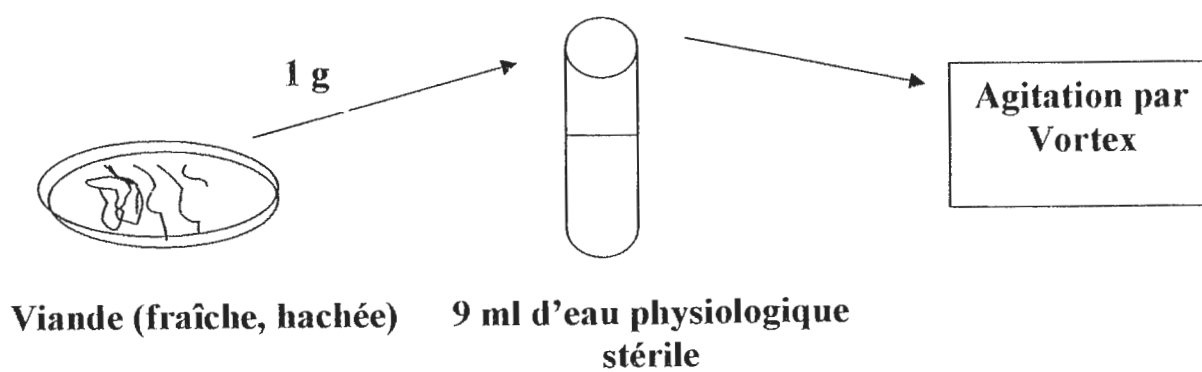
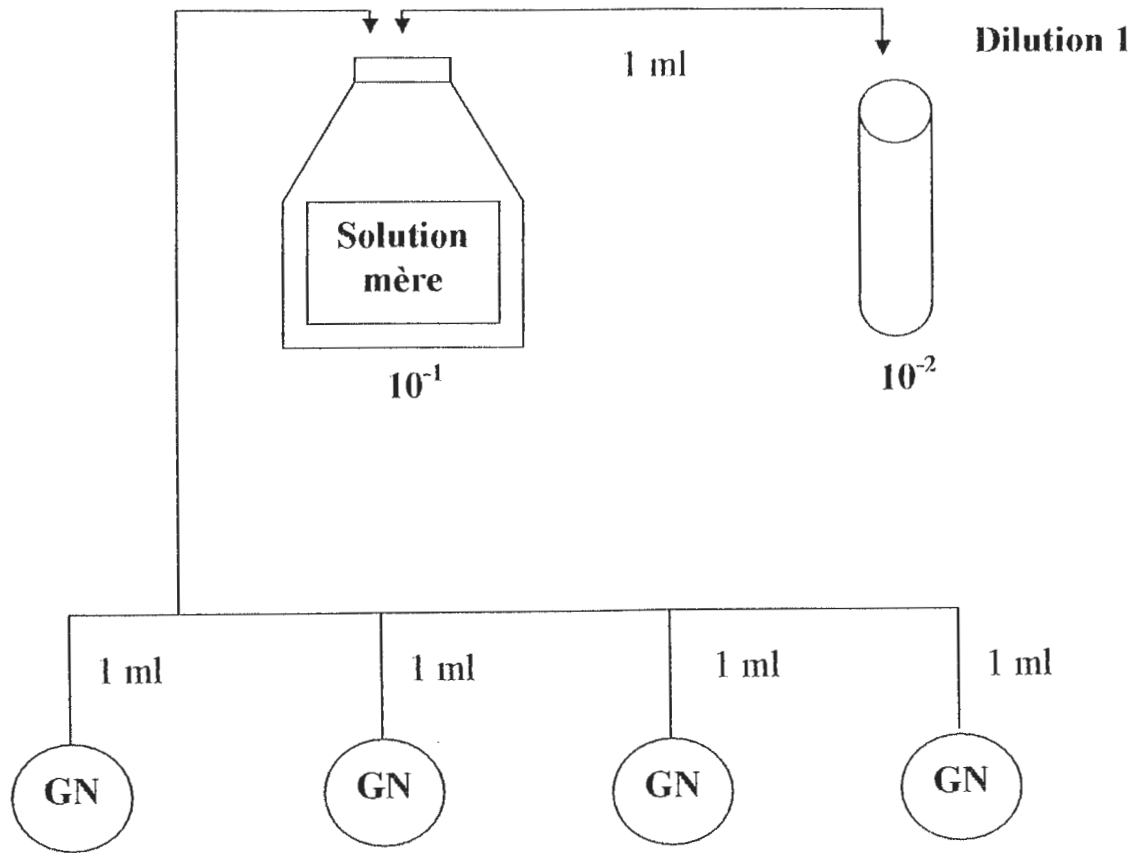


Figure.2 : La préparation de la solution mère.



FTAM : ensemencement en masse



Incubation à 37°C/72 h



Lecture

Figure.3 : Recherche et dénombrement du FTAM (Flore totale aérobie mésophile).

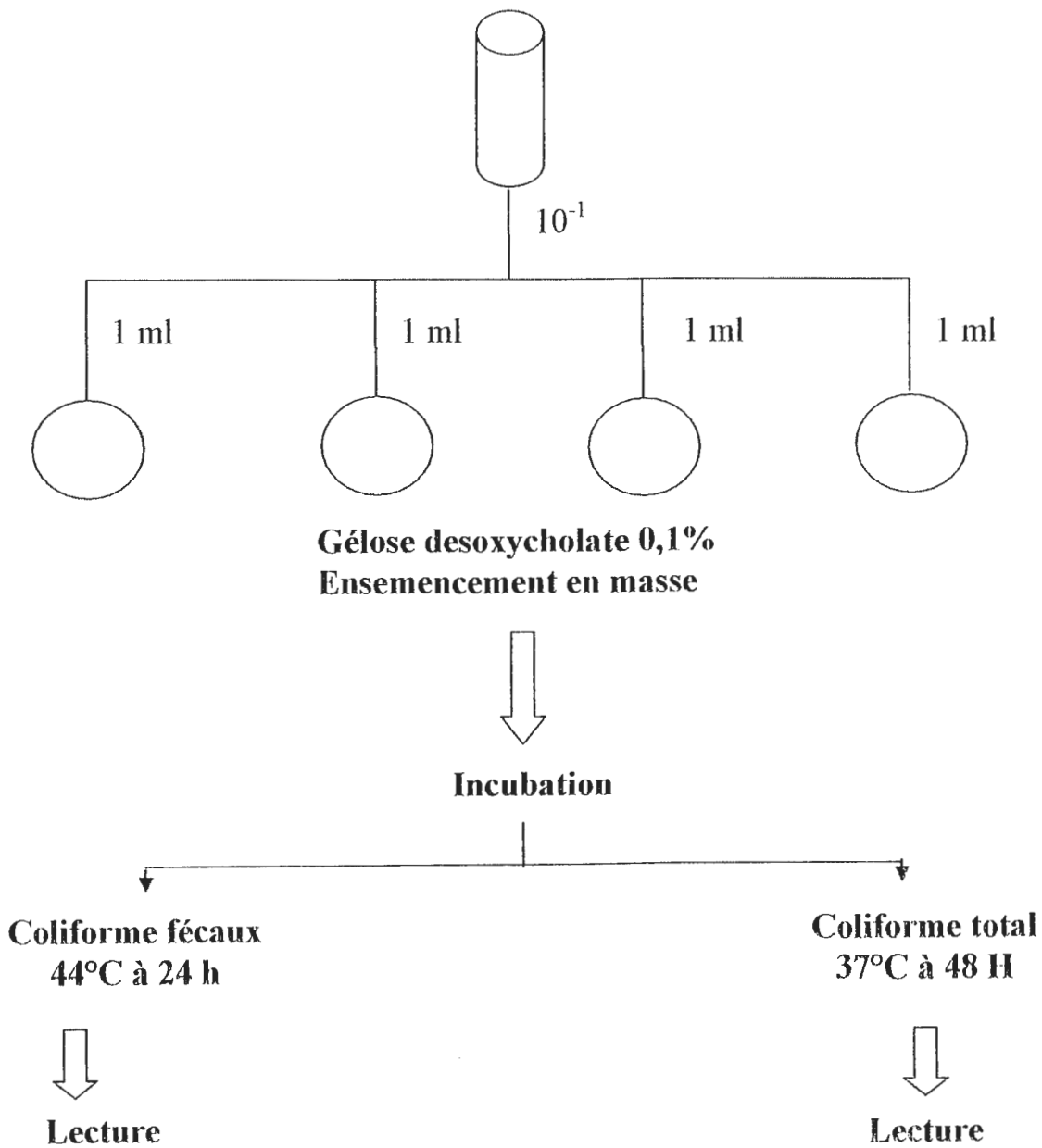
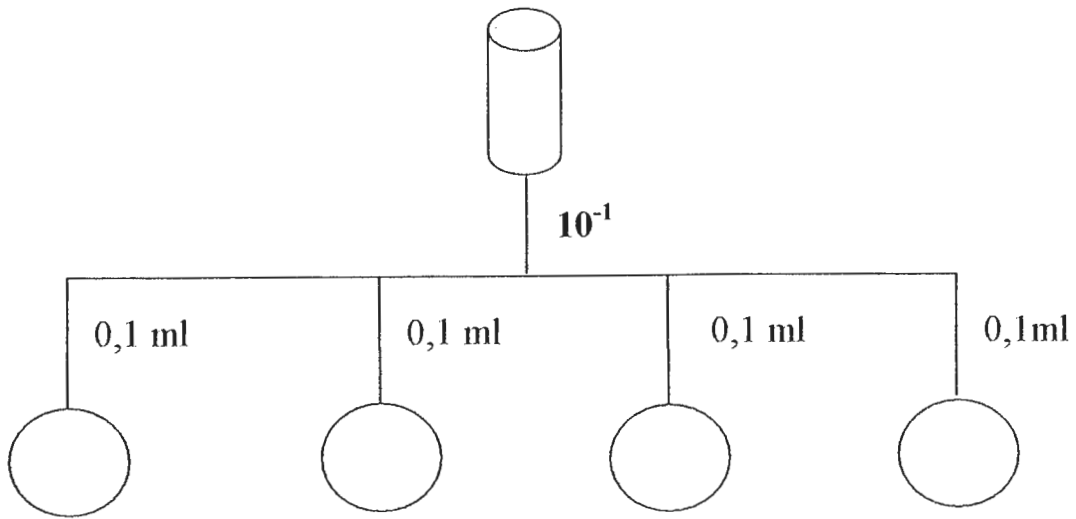


Figure.4 : Recherche et dénombrement des coliformes.



**Baird-Parker
Ensemencement en surface**



Incubation 37°C à 24h



Lecture

Figure.5 : Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*.

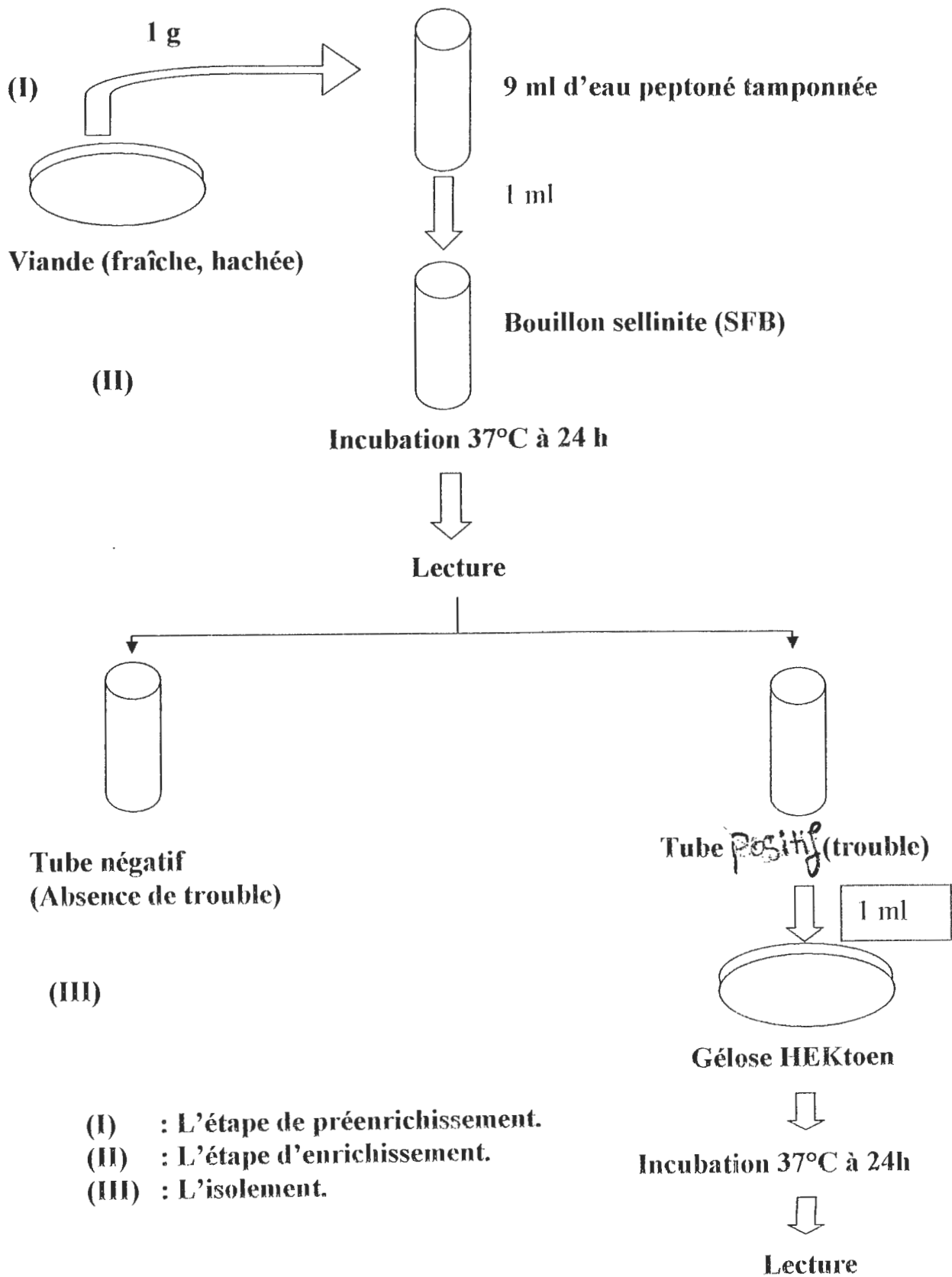


Figure.6: Recherche des Salmonelles.

Resultas et discussion

❖ RESULTATS ET DISCUSSION

I-Evolution de la flore en fonction du temps et température

I-1. la viande fraîche

Tableau 1 : dénombrement de la flore totale et pathogène dans la viande bovine fraîche

	FTAM	CT	CTT	Salmonella	Staphylocoques
Conservée dans des boîtes stériles (4h)	22,8 x10 ²	5x10 ²	3x10 ²	abs	abs
Exposée à l'air libre (4h)	28x10 ²	7x10 ²	5,6x10 ²	abs	abs
Conservée au réfrigérateur (24h) (t = -4°C)	40x10 ²	abs	abs	abs	abs
Conservée au congélateur (24h) (t = -15°C)	37,6x10 ²	abs	abs	abs	abs

Selon les normes préconisées par la législation en vigueur (J.O.R.A.N°35,1998), les résultats obtenus dans le tableau 1 des trois échantillons de viande bovine ont révélé :

- la présence d'une flore totale aérobie mésophile acceptable
- la présence d'un nombre d'*E. coli* supérieur de la norme
- l'absence de *Salmonella* et *Staphylocoques* pathogènes

✓ FTAM

la population microbienne totale FTAM enregistrée au cours de notre étude avec la viande fraîche est beaucoup plus inférieur que celle enregistrée avec la viande hachée conservée dans les mêmes conditions.

Ce résultat est expliqué par le hachage qui favorise la multiplication des germes.

Selon **Guy Leyral et R.Rosset** la viande en morceau contient tous les nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes mais ils ne constituent pas immédiatement un bon milieu de culture. Ces nutriments ne sont pas directement accessibles en raison de l'existence des barrières qu'ils faut rompre ou franchir (paroi cellulaire, graisse de couverture, tissus conjonctif).

La pénétration des germes dans la viande en carcasse ou en gros morceau est donc lente par rapport à leur pénétration dans la viande hachée.

✓ **CTT**

La présence d'*E.coli* dans la viande fraîche est un signe de contamination fécale. En effet *E.coli* vit dans l'intestin du bétail sain et peut contaminer la viande lors de l'abattage.

I.2-Viande hachée exposée à l'air libre

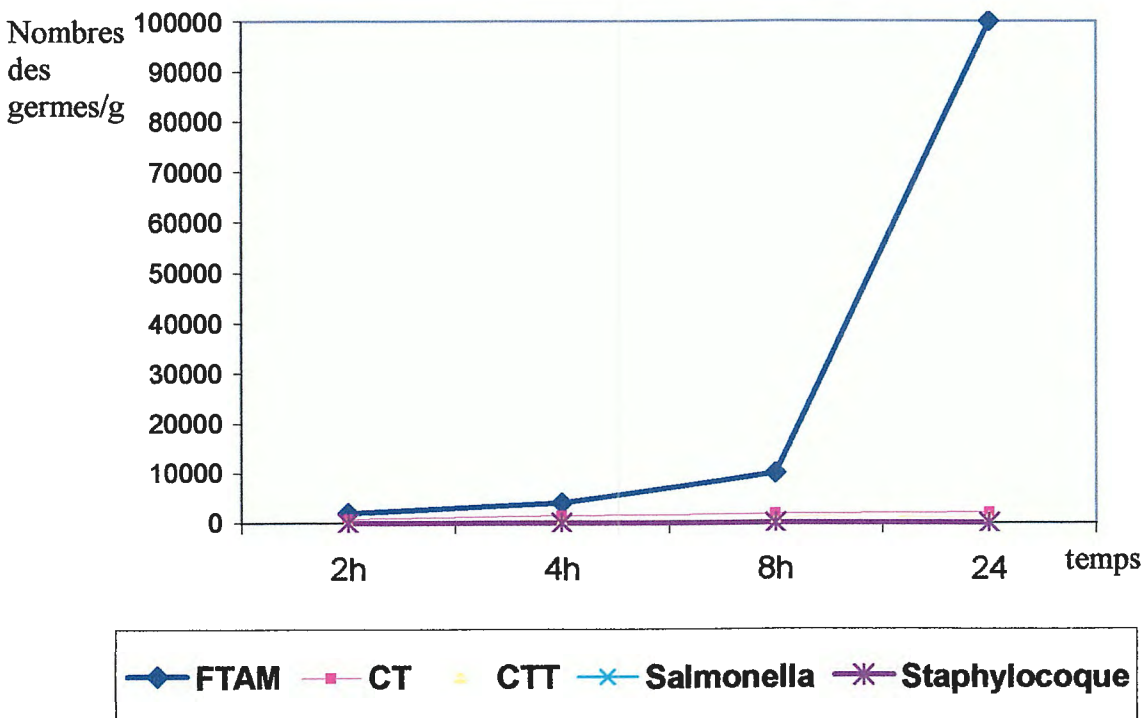
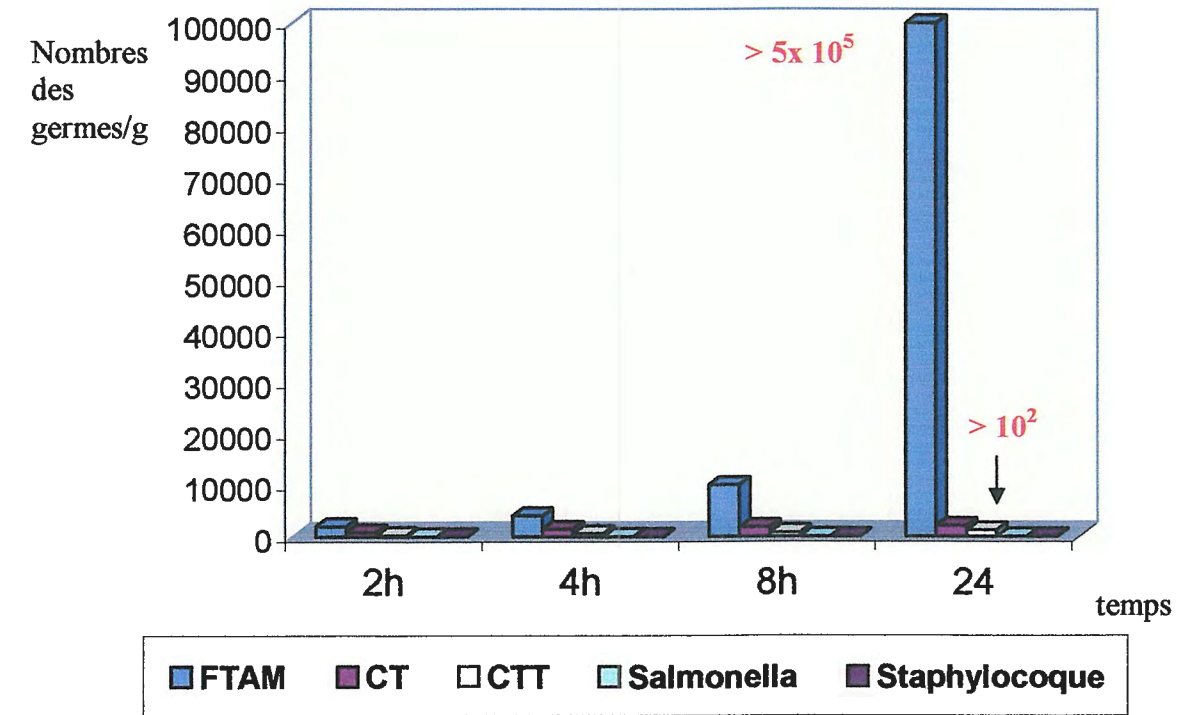


Figure 7 Représentations graphiques de l'évolution de la FTAM et la flore pathogène en fonction du temps

I-3. Viande hachée conservée dans des boîtes stériles à température ambiante

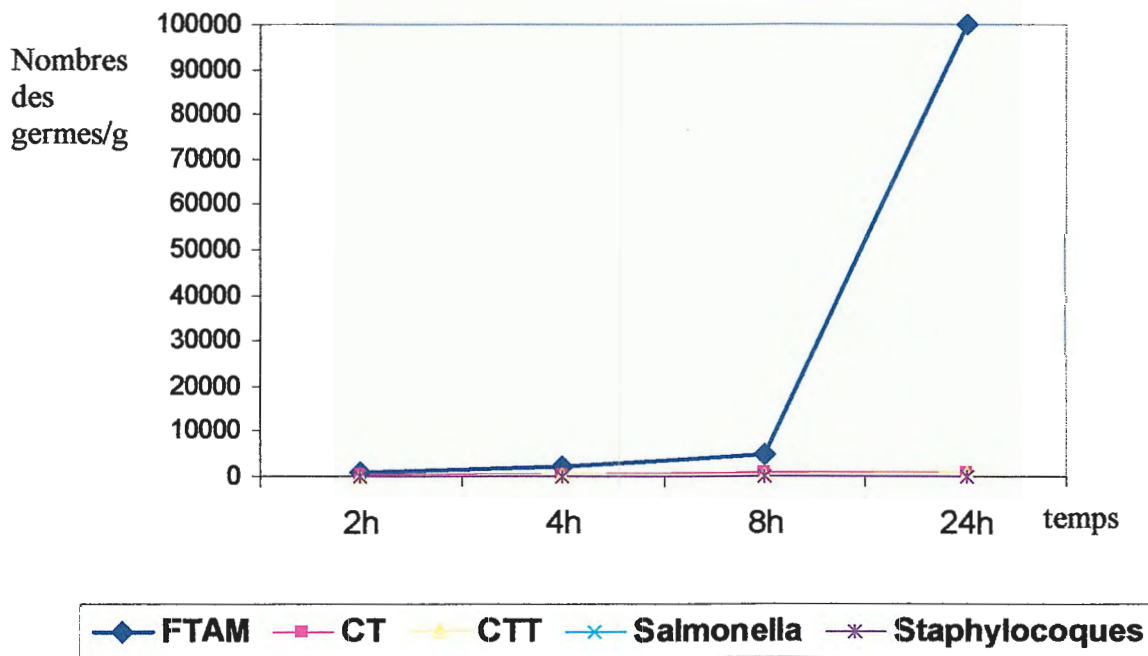
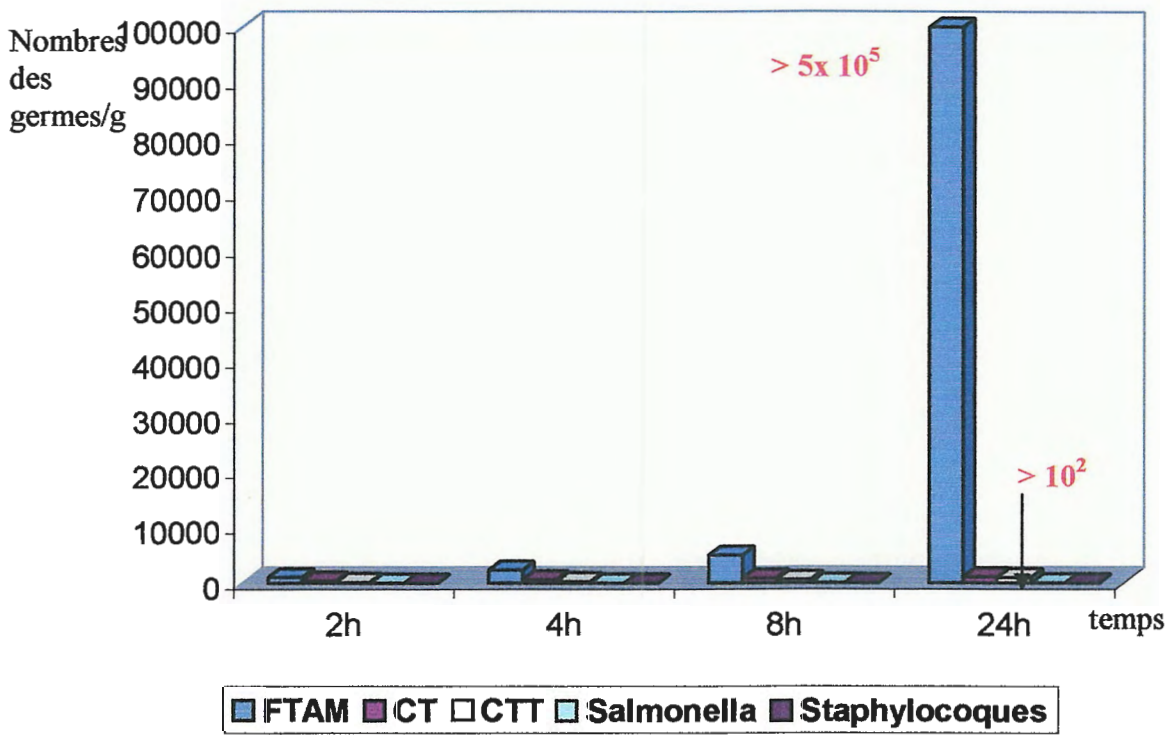


Figure 8 Représentations graphiques de l'évolution de la FTAM et la flore pathogène en fonction du temps

✓ FTAM :

Le nombre de la flore totale aérobie mésophile de la viande hachée conservée à température ambiante (exposée à l'air libre et conservée dans des boîtes stériles) évolue en fonction du temps mais reste dans la limite de l'acceptabilité. Au delà de 24h la flore devient très abondante et dépasse 5×10^5 germes/ g de produit.

Ce résultat pourrait être expliqué par la température de conservation. En effet notre étude microbiologique a duré du 24/4 jusqu'au 13/ 5/2004 où la température était de 15 à 25°C. Selon Gey Leyral , R. Rosset et J.P. Guiraud, ces conditions de température conviennent mal au développement des bactéries anaérobies telle que *Clostridium perfringens* qui se développent en profondeur. La flore d'altération est cependant représentée par des espèces aérobies en surface : *Pseudomonas*, *Micrococcus* ainsi des *Lactobacillus* et des entérobactéries en profondeur.

En plus on a travaillé dans une atmosphère humide donc une activité d'eau très favorable à la multiplication des germes. En effet plusieurs auteurs constatent qu'une viande conservée dans une atmosphère ayant une humidité relative élevée se conserve moins longtemps qu'une viande entreposée en une ambiance sèche (5,9,10).

✓ CTT :

On note une présence d'*E. coli* dès 2h de conservation à un taux qui dépasse la norme. Le hachage de la viande a favorisé beaucoup plus la multiplication d'*E. coli* puisqu'il permet le transfert de ces bactéries de la surface à l'intérieur.

I-4-viande hachée réfrigérée

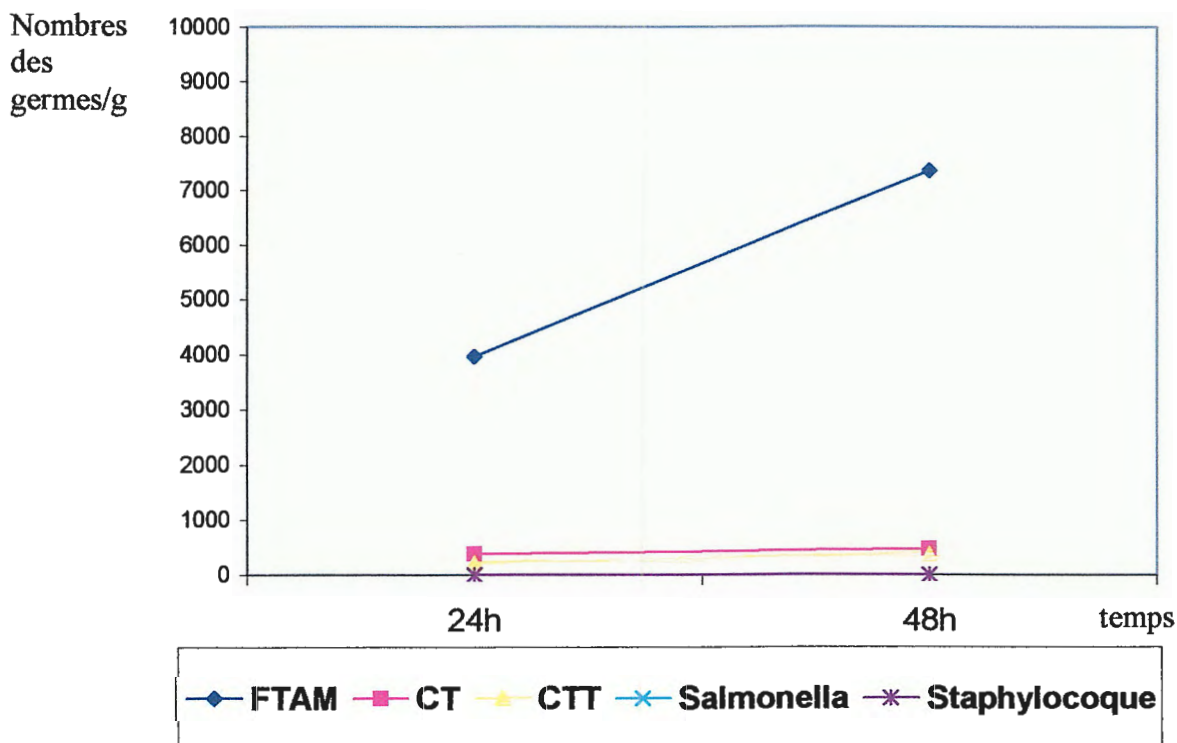
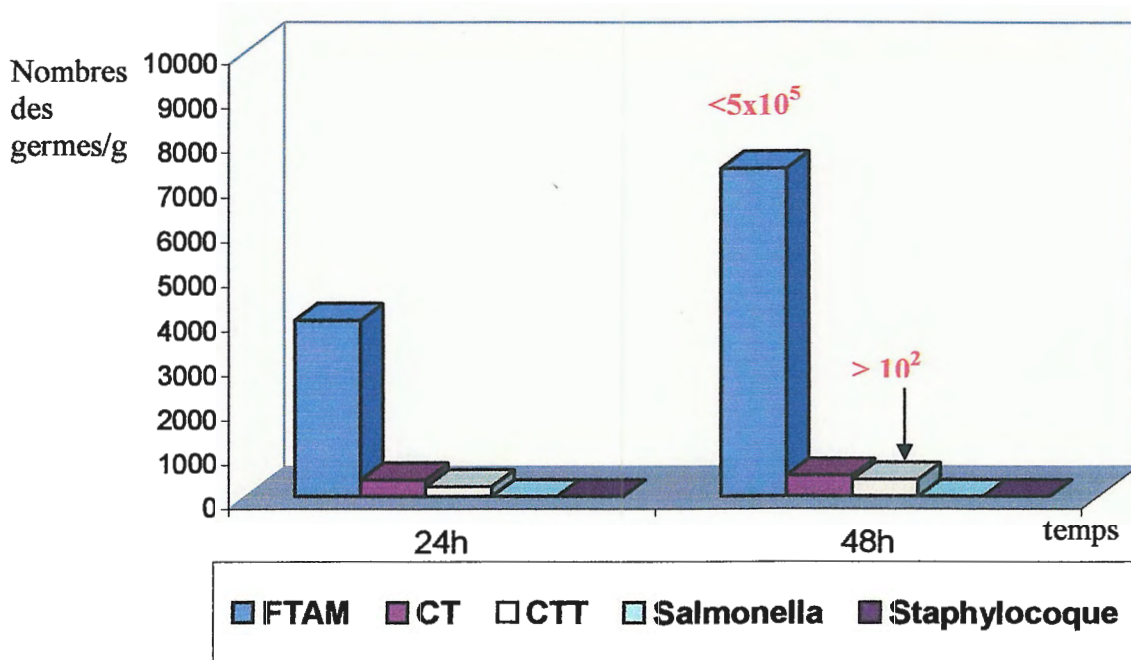


Figure 9 Représentations graphiques de l'évolution de la FTAM et la flore pathogène en fonction du temps

- ✓ **FTAM:** La charge microbienne s'accroît en fonction du temps mais reste dans la limite

jusqu'à 48h de conservation.

La réfrigération consiste à inhiber le développement des germes mésophiles dont la plupart des microorganismes pathogènes. [5]

Elle est efficace qu'à une température de 0 à 4 C° au de la de cette température l'évolution de la flore mésophile n'est que ralentie. Ce qui explique nos résultats qui montrent que la flore totale s'accroît en fonction du temps mais très lentement par rapport à celle conservée à température ambiante.

Selon (Guy leyrat), la vitesse d'altération d'une viande réfrigérée à 5 C° est deux fois plus que celle conservée à 0 C° . [10]

R. Rosset montre aussi que toute élévation, de la température s'accompagne d'une activation de la multiplication des germes : une augmentation de 5 C° multiplie la croissance des germes par deux. [5]

L'élévation de la flore s'explique aussi par le fait que la réfrigération de nos échantillon n'a été continu: vue le nombre très important des étudiants utilisant le même réfrigérateur, la réfrigération de nos échantillons a été interrompue au toute de notre étude.

- ✓ *E. coli* : le nombre d'*E.coli* augmente en fonction du temps et leurs nombre devient intolérable.
- ✓ Absence des germes pathogènes: *Salmonella* et *Staphylocoque*

I-5.Viande hachée congelée

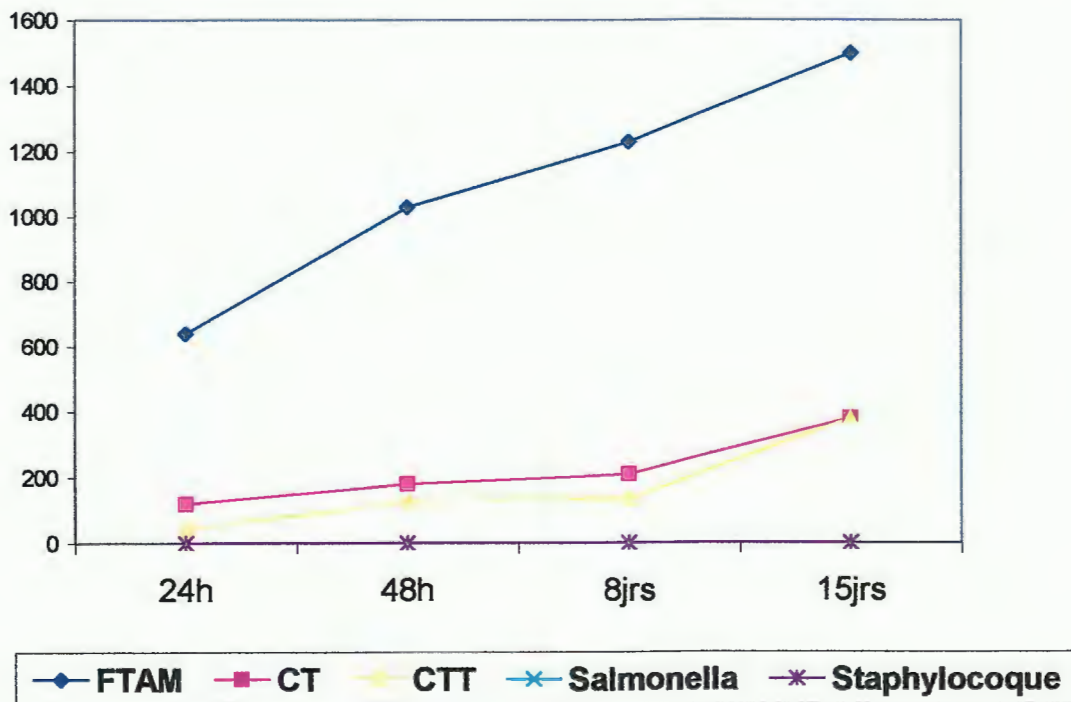
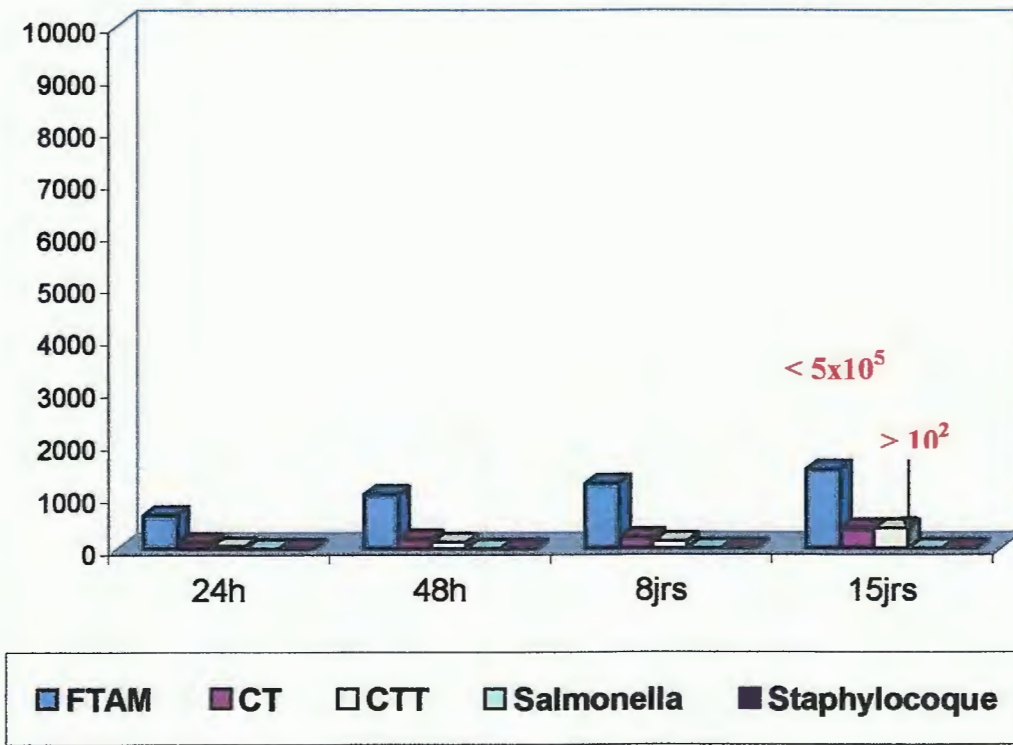


Figure 10 Représentations graphiques de l'évolution de la FTAM et la flore pathogène en fonction du temps

- ✓ **FTAM:** La charge microbienne totale s'accroît dans le temps mais reste dans la limite après 15 jours de conservation.

L'évolution de la flore congelée peut être expliquée par le processus de décongélation.

En effet les microorganismes reprennent leur croissance en se multipliant dans un premier temps dans le liquide d'exsudation qui constitue un milieu particulièrement favorable.

Cette évolution de la flore microbienne pendant la décongélation dépend de deux facteurs :

- 1- La vitesse de décongélation
- 2- La température extérieur: plus la température est élevée plus le développement des microorganisme est abondant [10].

✓ ***E.coli:***

En ce qui concerne les coliformes totaux nos résultats montrent leur absence et la présence des C.T.T (*E.coli*)

Ce résultat est expliqué par (Guy leyrat et R.Rosset) qui suggèrent que les bactéries GRAM négatif, notamment les bactéries de la contamination fécale, sont très sensibles à la congélation. Par contre 1% d'*E.coli* présente dans une viande peut survive après six semaines de congélation à -18 C°.





Figure11. Résultats des tests biochimiques.



Figure.12 . Teste d'indole

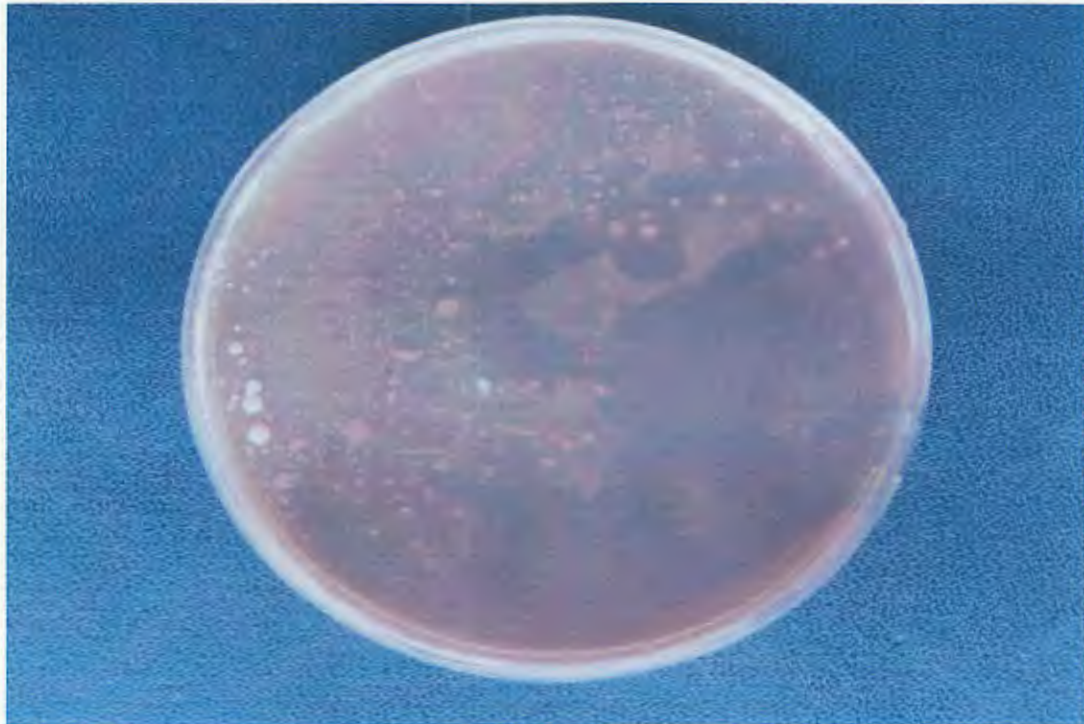


Figure13 . Aspect des colonies d'*E. coli* sur gélose désoxycolate 0.1% .

II- Résultats de l'identification biochimique

L'identification des souches isolées au cours de notre étude a donné les résultats suivants:

- ✓ Selon la coloration de GRAM: ce sont des coccobacilles GRAM (-)
- ✓ L'ensemencement sur milieu de désoxycholate de sodium a donné des colonies caractéristiques d'*E.coli* (de couleur roses). Ce sont des bactéries lactose (+). Ce résultat est confirmé par l'ensemencement sur milieu MEVAG additionné de lactose et le milieu de TSI
- ✓ L'ensemencement du milieu TSI montre que les souches isolées fermentent le glucose avec production de gaz, fermentent de lactose et ne produisent pas d' H_2S .
- ✓ Le test d'urease montre que ces bactéries ne possèdent pas l'uréase
- ✓ Le test IMIVIC a révélé qu'il s'agit de bactérie indole (+), RM (+), VP (-) et citrate (-).

Nos résultats répondent clairement aux caractères distinctifs d'*E.coli*.

Conclusion

Conclusion générale

La viande hachée de bœuf joue un rôle déterminant dans la transmission des germes pathogène : *Salmonella*, *Staphylocoques* mais aussi *E.coli* producteurs de verotoxines, qui peut être transmis par ce type d'aliment, avec des conséquences sanitaires beaucoup plus dramatiques.

Ensemble de ces faits doit donc inciter à renforcer la prévention qui doit s'exercer de l'élevage au consommateur avec un point critique particulier au niveau de labattoire pour prévenir la contamination de la viande par les éventuelles *Salmonella* et *E.coli* verotoxines.

Nos résultats montrent que la viande testée au cours de notre étude et de mauvaise qualité hygiénique (malgré l'absence des germes pathogène *Salmonella* et *Staphylocoques*). Ceci est du à la présence des C.T.T (*E.coli*) à un taux qui dépasse la normes $> 10^2$ germes/g.

La présente étude confirme aussi clairement que le hachage d'un viande favorise la multiplication des germes puisqu'il offre aux germes une surface d'étendue incomparablement plus grande favorisant leur développement.

En ce qui concerne la conservation de la viande, on constate que la viande hachée exposer à l'aire libre est facilement altérable, la réfrigération dans de bonnes conditions inhibent le développement des germes tout en augmentant sa durée de conservation et la congélation assure une stabilité microbienne n'assaièrent pas l'aliment pollué.

En fin cette étude montrent clairement le risque lié a la consommation d'une viande hachée contaminée ou male conservée. Il est nécessaire donc que les pouvoirs publiques, les services de contrôles contribuent efficacement afin que viande hachée doit être préparée:

- ❖ Sur le champs et a la vue de l'acheteur
- ❖ Selon des règles de propretés rigoureuses
- ❖ Avec une viande fraîche, entreposée en chambre froide jusqu'au moment du hachage.

Aussi, les analyses microbiologiques devraient se faire aussi fréquemment que possible, pour assurer la consommation d'un viande hachée saine et sans danger pour le consommateur .

ANNEXES

ANNEXE 1

MILIEUX DE CULTURES

Eau physiologique

Chlorure de sodium	8.5g
Eau distillée	1000ml

Gélose nutritive

Peptone	10g/l
Extrait de viande	05g/l
Chlorure de sodium	05g/l
Gélose	15g/l

pH 7.2

Auto claver 20 mn à 120 °C .

Répartir en boîtes de pétri (contenant éventuellement l'inoculum)

PCA (plate count agar)

Hydrolysate trypsique de caseine	05g/l
Extrait de levure	2.5g
Glucose	01g
Agar	09g
Eau distillée	1 litre

pH 7

Bouillon jusqu'à dissolution complète .

Introduire dans des flacons

Stériliser à 121 °C pendant 15 mn .

BAIRD-PARKER

Tryptone	10g
Extrait de viande	05g
Extrait de levure	01g
Chlorure de lithium	05g
Gélose	20g

Gélose au désoxycholate 0.1%

Peptone	10g
Lactose	10g
Citrate de sodium	01g
Desoxycholate de sodium	01g
NaCl	05g
K ₂ HPO ₄	02g
Agar	15g
Eau	1dm ³

pH 7.3

Sélénite (bouillon)

Péptone	05g
Mannitol	04g
Sélénite de sodium	04g
Phosphate de sodium	10g

pH 7.1

Gélose Hektoen

Protéose-peptone	12g
Extrait de levure	03g
Chlorure de sodium	05g
Thiosulfate de sodium	05g
Sels biliaires	09g
Citrate de fer ammoniacal	1.5g
Salicine	02g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fuschine acide	0.1g
Bleu de bromothymol	65g
Gélose	13g

pH 7.5

Gélose T.S.I

Péptone	20g
Extrait de viande	03g
Extrait de levure	03g
Chlorure de sodium	05g
Glucose	01g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Citrate de fer	0.5g
Hyposulfite de sodium	0.5g
Rouge de phénol	0.025g
Gélose	12g

pH 7.6

Milieu au Citrate Simmons

Sulfate de magnésium	0.2g
Phosphate monoammonique	01g
Phosphate bipotassique	01g
Citrate de sodium	05g
Bleu de bromothymol	0.08g
Gélose	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7-7.2

Milieu Clark et Lubs

Peptone tryptique de caséine	05g
Phosphate bipotassique	05g
Glucose	05g
Eau distillée	1000ml

pH 7

Milieu manitol-mobilité

Peptone pancréatique de viande	20g
Agar-agar	04g
Manitol	02g
Nitrate de potassium	01g
Rouge de phénol en solution à 1%	04ml
Eau distillée	1000ml

pH 8.1

Milieu urée-indole

L Tryptophane	03g
Phosphate monopotassique	01g
Phosphate dipotassique	01g
Chlorure de sodium	05g
Urée	20g
Alcool à 95°	10ml
Solution de rouge de phénol à 1%	2.5ml
Eau distillée	1000ml

pH 6.7

Réactifs, solution et Colorants**Fuchsine de ziehl**

Fuchsine basique	1g
Alcool éthylique à 90%	10ml
Phénol	5g
Eau distillée	100ml

Réactif de kovacs

Alcoolamylique ou isoamylique	150ml
P.diméthylaminobenzaldéhyde	10g
Acide chlorhydrique concentré	50g
Lugol	
Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	300ml

Réactif au rouge de méthyle

Rouge de méthyle	0.5g
Alcool éthylique à 60%	100ml

Réactif de voges prosquawer :(V_P)

V_{P1}

KOH	40g
Eau distillée	100ml

V_{P2}

Naphtol	60g
Ethanol	100ml

ANNEXE 2

Tableau 1 :

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 35 (27 mai 1998)

VIANDES	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>m</i>
* <i>Escherichia coli</i>	5	2	5.10²
* <i>Staphylococcus aureus</i>	5	1	5.10²
* <i>Salmonella</i>	5	0	abs / g

Tableau 2 – Critère applicable aux viande hachée

Analyse	Viande hachée
Micro-organisme aérobie totaux a 30°C	5.10 ⁵ par g
Coliformes 30°C	-
Coliformes thermotolérants	10 ² par g
<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 g
Anaérobies sulfitoréducteurs	30 par g
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² par g

Annexe 3

Les résultats du dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) et la flore pathogène par gramme de viande hachée sont groupés dans quatre tableaux (2,3,4,5).

I.2-Viande hachée exposée à l'air libre

Tableau2:

Germes/g	Temps (h)			
	2h	4h	8h	24h
FTAM	2.10 ³	4020	10000	Ind
CT	840	1466	1780	2100
CTT	260	565	755	1200
Salmonella	Abs	Abs	Abs	Abs
Staphylocoque	Abs	Abs	Abs	Abs

I-3. Viande hachée conservée dans des boîtes stériles à température ambiante

Tableau3:

Germes/g	Temps (h)			
	2h	4h	8h	24h
FTAM	1000	2300	5000	Ind
CT	385	620	850	1040
CTT	150	265	555	940
Salmonella	Abs	Abs	Abs	Abs
Staphylocoques	Abs	Abs	Abs	Abs

I-4-viande hachée réfrigérée

Tableau4:

Germes/g	Temps (h)	
	24h	48h
FTAM	3973	7370
CT	385	480
CTT	225	383
Salmonella	Abs	Abs
Staphylocoque	Abs	Abs

I-5.Viande hachée congelée

Tableau5:

Germes/g	Temps (h)			
	24h	48h	8jrs	15jrs
FTAM	640	1030	1230	1500
CT	120	180	210	380
CTT	40	120	130	380
Salmonella	Abs	Abs	Abs	Abs
Staphylocoque	Abs	Abs	Abs	Abs

- Ind: Indénombrable .
- Abs: Absence.
- Les résultats des tableaux 2,3,4,5 sont obtenue à partir de calcule de la valeur moyenne des trois échantillon (I,II,III).

Références bibliographique

Références bibliographique

- [1] **Ait Abdelouaheb N.**, Microbiologie alimentaire. Office du publication universitaire, 2001. P :125,126,22 .
- [2] **Amicos .**, Le guide des aliments . QUEBEC AMERIQUE INC, 1999, P : 223 .
- [3] **Avril J. L ., Dabernat H ., Denis . F ., Montiel H .**, Bactériologie clinique 2^{eme} ed . Ellipses , Paris , 1992 , P : 149 , 158 ,156.
- [4] **Bakhte O ., Sekkaoui K .**, Enquête sur la situation de la filière viande rouge dans les wilayas Khenchela et Msila , Mémoire de fin d'étude d'ingénieur d'état en nutrition et technologie agro-alimentaire ,INATA , Constantine , 2003 , P :4,14.
- [5] **Bourgeois ., Mescle ., Zucca ., R. Rosset** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Paris,1996 , P :106,241,242,243,367,482,483 .
- [6] **Carbonelle B ., Denis F ., Marmonier A ., Penon G ., Vargues R .**, Bactériologie médicale . Technique usuelles . Simaps . A . Paris , 1988 , P :124 .
- [7] **Eyquem A ., Alouf J ., Montanier L ., et al** , Traité de microbiologie clinique . Piccin nuova libraria S .P .II . Padoue , Italie , 1998 , P :1479 .
- [8] **Girard J. P ., Valin C .**, Technologie de la viande et des produits carnés . 1991 , P : 05 , 35 .
- [9] **Guiraud J . P .**, Microbiologie alimentaire . DVNOD , Paris , 1998 , P :79,107,110,253 .
- [10] **Guyleyrat ., Elisabeth vierling .**, Microbiologie et toxicologie des aliments – hygiène et sécurité alimentaires , 3^{eme} édition , 2001 , P : 101,102,106 .80
- [11] **Joffin Christiane ., Joffin Jean – Noël .**, Microbiologie alimentaire . 5^{eme} éd , ISBN , Bordeaux , 1999 , P : 35,134,135,139,140 .
- [12] **Lechere H ., Mossel DAA ., Bernier JJ .**, Microbiologie de tube digestif l'eau et les aliments . Doin éditeurs , Paris , 1989 , P : 74 .
- [13] **Larpent J.P., larpent-Gourgand M.**, Mementotechnique de microbiologie. 3^{eme} ed. Tec. Et dec.Lavoisier, 1997,P: 474
- [14] **Prescott ., Harley ., Klein .**, microbiologie . 1995 , De boeck wesmoel S.A , Bruxelles , 1995 , P : 405 .

- [15] Rosset R.,- Etat des animaux avant L'abattage ; Hygiène et technologie de la viande .1978, P:123
- [16] **Selselet Attoug .**, Technologie des viandes et des poissons . Dep, tech . Alim , Inst , NAT . Form . Sup . Agro . , Mostaganem ,1992, P : 106.
- [17] **Staront .**, Evènement agro- alimentaire . Viandes et alimentation humaine 1992, P : 52 , 54 .
- [18] **Sutra L . , Federighi M . , Jouve J . L.**, Manuel de bactériologie alimentaire . Polytechnica , 1998 , P :31,32,33,56,57,58,78,82 .

Sites d'Internet

- [19] Anonyme (2000) **Desenelose JC.**,
[www .hc.hc.gc.caffod.Aliment/fpi-ipaff](http://www.hc.hc.gc.ca/fod.Aliment/fpi-ipaff)
- [20] Anonyme : www.encyclopedia.fr.
- [21] Anonyme : www.invs.santé.fr.
- [22] Anonyme : www.super_tainette.com.
- [23] Anonyme : www.liste_hygiene.org/ESCHE.html.
- [24] Anonyme : www.CHIUPS.jussieu.fr/polys/bacteriopoly.

Présenté par : CHAUCHE SOFIANE
GUEHAM NOUARA
SDIRA NIHAD

Titre: Evolution de la flore banale et pathogène de la viande hachée en fonction du temps et de la température de conservation

Résumé:

La viande hachée joue un rôle déterminant dans la transmission des germes pathogènes dont la multiplication est favorisée le hachage.

Notre étude consiste à l'estimation de l'évolution de la flore banale et pathogène en fonction de temps et de température dans la viande hachée au cours de sa conservation.

Les résultats obtenus montrent l'absence des germes pathogènes (*Salmonella* et Staphylocoques) et la présence *E. coli* qui est un bon signe de contamination fécale.

A travers cette étude on constate que la viande hachée exposée à l'air libre est facilement altérable, la réfrigération inhibe partiellement la croissance des germes et la congélation assure une stabilité des germes.

Summary:

The chopped meat plays a role determining in the transmission of the pathogenic germs whose multiplication is encouraged the chopping.

Our study consists to the evaluation of the evolution of the banal and pathogenic flora according to time and temperature in meat chopped during its conservation.

The results show the absence of the pathogenic germs (*Salmonella* and *Staphylococci*) and the presence *E. coli* that is a good sign of fecal contamination.

To shortcoming this study one notes that the chopped meat exposed to the free air is easily alterable, the refrigeration partially inhibits the growth of the germs and the congealment assures a stability of the germs.

ملخص

اللحم المفروم يلعب دور معروف في نقل البكتيريا الممرضة حيث فرم اللحم يؤدي الى تكاثرها
دراستنا تتركز على تقدير زيادة الفلورة الدنيئة والفلورة الممرضة بدلالة الزمن و درجة حرارة اللحم المفروم خلال
عملية حفظها .

النتائج المتحصل عليه اتبين غياب البكتيريا الممرضة (*Salmonella.staphylocoque*)
و ظهور *E. coli* التي تعتبر اشارة جيدة لوجود فساد في اللحم
عبر هذه الدراسة نستنتج ان اللحم المفروم المعرض للهواء الطلق يفسد بسهولة، والتبريد يوقف جزئيا تضاعف البكتيريا
اما التجميد
يضمن استقرار البكتيريا .

Mots-clés: Viande hachée, flore pathogène, flore bannale, conservarion , temps ,
température.

Encadreur : M^{elle} .ADOULM