

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers

Département d'Ecologie et Génie de l'environnement



Polycopié de cours :

Microbiologie alimentaire

Destiné pour les étudiants de Master 1 Production et Transformation

Laitières (PTL)

Elaboré par Dr. DJAMAA Fatma

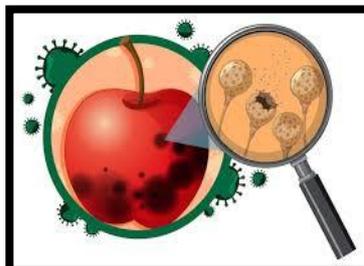


TABLE DES MATIERES

PREFACE

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : LES PRINCIPAUX GROUPES BACTERIENS INTERVENANT EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE 3

1. BACTERIES	3
1.1. Entérobactérie	3
1.1.1. Caractères généraux	3
1.1.2. Principaux groupes	4
1.1.3. Caractéristiques des principaux genres et espèces	5
1.2. Bacilles Gram - saprophytes	11
1.2.1. <i>Pseudomonas</i> et genres voisins	11
1.3. Bactéries acétiques	15
1.4. Vibrions	15
1.4.1. <i>Vibrio</i>	15
1.4.2. <i>Aeromonas – Plesiomonas</i>	17
1.4.3. <i>Campylobacter</i>	17
1.5. <i>Brucella</i> et bactéries voisines	18
1.6. Microcoques et staphylocoques	19
1.7. Streptocoques et autres coques lactiques	21
1.7.1. <i>Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus</i>	22
1.7.2. <i>Pediococcus</i>	23
1.7.3. <i>Leuconostoc</i>	24
1.8. Lactobacilles et autres bacilles lactiques	24
1.8.1. <i>Lactobacillus</i>	24
1.8.2. Autres lactobacilles et bactéries voisines	27
1.9. <i>Listeria</i>	27

1.10. Actinobactéries	28
1.10.1. Caractères généraux	28
1.10.2. Bactéries corynéformes saprophytes	29
1.10.3. <i>Propionibacterium</i>	29
1.10.4. <i>Streptomyces</i>	30
1.10.5. Mycobactéries	30
1.11. Bactéries sporulées aérobies	31
1.12. Bactéries sporulées anaérobies	33
2. LES CHAMPIGNONS	37
2.1. Moisissures	37
2.2. Levures	39
2.2.1. Fermentation alcoolique	42
2.2.2. Métabolisme respiratoire	42
2.2.3. Nutrition physiologique	42

**CHAPITRE II : INFLUENCE DES TECHNIQUES DE LA FABRICATION SUR LES
MICROORGANISMES (TRAITEMENTS APPLIQUES AUX PRODUITS
ALIMENTAIRES)** **44**

1. Destruction de la flore de fabrication sur les microbes	44
2. Facteurs chimiques (antiseptiques, fongicides, antibiotiques)	50
3. Stabilisation de la flore	52
a - Facteurs physiques (froid, congélation, lyophilisation)	52
b - Facteurs chimiques (fongiostatiques, bactériostatiques)	56
4. Activation et orientation de la flore	60
5. Recherche des conditions de milieu optimal pour le développement de la flore	61

**CHAPITRE III : LES PROBLEMES MICROBIOLOGIQUES D'UNE USINE
ALIMENTAIRE (RÔLE ET ACTION DES MICRO-ORGANISMES DANS LES
ALIMENTS)** **66**

1. Généralités	66
2. Contamination par l'air, le personnel, les matières premières etc	68
2.1. Contamination par l'air	68
2.2. Contamination par le personnel	68

2.3. Contamination par les matières premières	69
3. Les accidents de fabrication	69
CHAPITRE IV : PROCÉDES BIOTECHNOLOGIQUES, LES BACTÉRIES LACTIQUES, FERMENTATION ET PRODUITS FERMENTÉS (UTILISATION INDUSTRIELLE DES MICRO-ORGANISMES) BIOPROCÉDES INDUSTRIELS	78
1. Fermentations	78
1.1. Fermentation alcoolique	78
1.2. Fermentations lactiques	78
1.3. Fermentation acétique	79
1.4. Autres fermentations	80
2. Autres utilisations microbiennes	81
2.1. Production de biomasse	81
2.2. Production de métabolites	81
2.3. Bioconversions	84
2.4. Épuration et biodégradation	86
2.5. Production de biocarburants	86
3. Mise en œuvre des fermentations industrielles	87
3.1. Déclenchement des fermentations	87
3.2. Orientation et contrôle des fermentations	88
CHAPITRE V : LES INTOXICATIONS ET LES TOXI-INFECTIIONS (INCIDENCES SANITAIRES DE LA PRÉSENCE DE MICRO-ORGANISMES)	89
1. Caractères généraux	89
2. Principaux cas et les accidents liés à la prolifération	90
2.1. Maladies liées à la présence de germes pathogènes	91
2.2. Intoxications	92
CHAPITRE VI : ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES ALIMENTS	98
I. ANALYSE DE L'EAU	99
1. Prélèvement des échantillons	99
1.1. Volume et fréquence des prélèvements	99
1.2. Techniques de prélèvement	100

1.3. Précautions concernant l'échantillon	100
2. Méthodes d'analyse Microbiologique	101
2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux à 37 °C (germes revivifiables)	101
2.2. Recherche et dénombrement des germes de contamination fécale	104
2.3. Anaérobies sulfito-réductrices (ASR)	108
2.4. Recherche et identification des germes pathogènes	109
2.4.1. Recherche des Staphylocoques	109
2.4.2. Recherche des Salmonelles	110
2.4.3. Recherche des <i>Vibrio</i>	111
2.4.4. Recherche des Shigelles	112
2.4.5. Recherche des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	113
2.5. Recherche des levures et moisissures	114
II. ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DU LAIT	116
1. Echantillonnage	116
2. Technique de prélèvement	116
2.1. Lait en vrac	116
2.2. Lait en poudre	116
3. Transport des échantillons	116
4. Analyse bactériologique	116
III. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES LAITS FERMENTES ET FROMAGES	118
1 Prélèvement et traitement des échantillons	118
1.1.Échantillonnage	118
1.1.1. Laits fermentés et desserts lactés frais	118
1.1.2. Fromages	118
1.2. Techniques de prélèvement	119
1.2.1 Laits fermentés et desserts lactés frais	119
1.2.2. Fromages	119
3. Précautions de transport	119
IV. ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DU BEURRE ET LA MATIERE GRASSE	121
1. Prélèvement et préparation des échantillons	121
1.1. Échantillonnage	121
1.2. Techniques de prélèvement	121

1.2.1. Beurre ou margarine en vrac	121
1.2.2. Beurre ou margarine conditionnés	121
1.2.3. Autres matières grasses	121
1.3. Conservation des échantillons	121
1.4. Préparation des échantillons	122
1.4.1. Beurre et margarine	122
2. Méthodes d'analyse	122
2.1. Flores particulières	122
V. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES BOISSONS ALCOOLISEES ET NON ALCOOLISEES	124
1. Boissons non alcoolisées	124
2. Techniques de prélèvement	126
3. Techniques d'analyse microbiologique des boissons non alcoolisées	126
3.1. Essais de stabilité	126
3.2. Examen microscopique	127
3.3. Analyse des jus de fruits (et légumes), limonades, sodas etc	127
3.3.1. Préparation de l'échantillon	127
3.3.2. Dénombrement des constituants de la flore par culture classique en milieu gélosé	127
3.3.3. Méthodes par filtration	129
3.3.4. Autres méthodes	130
3.4. Analyse des concentrés et extraits de fruits (et légumes)	130
3.4.1. Préparation de l'échantillon	130
3.4.2. Dénombrement de la flore	130
VI. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES CONSERVES	132
1. Prélèvement	132
2. Examen organoleptique et physico-chimique	132
3. Examen microscopique	132
4. Analyse microbiologique	132
4.1. Préparation d'une suspension	132
4.2. Dénombrement	132
Référence bibliographiques	134

PREFACE

Ce polycopié cours est la synthèse d'années d'enseignement de Microbiologie Alimentaire, Microbiologie générale Microbiologie appliquée en industrie alimentaire. Faire acquérir des connaissances de microbiologie spécifiques au domaine alimentaire. Il est destiné à supporter l'apprentissage de Microbiologie par l'étudiant de Master en première année de Spécialité Production et transformation laitières. D'autre part, ce document pourrait aider les étudiants de Licence en Sciences Agro-alimentaires à renforcer leurs connaissances dans le domaine de la Microbiologie.

Comme tout travail, il peut être sujet d'erreurs et de manques. De ce fait, il est toujours encourageant et motivant de recevoir des corrections, conseils et recommandations de la part des collègues enseignants et chercheurs activant sur terrain.

LISTE DES TABLEAUX

N° de Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Association de différents sérovars de <i>Pseudomonas fluorescens</i> avec des produits frais et des rhizosphères de plantes (de W Blackburn, 2006).	14
Tableau 2	Association des principales espèces de <i>Pseudomonas</i> avec des aliments dérivés d'animaux (de W Blackburn, 2006).	14
Tableau 3	Principaux espèces de bactéries lactiques (Federighi, 2005).	24
Tableau 4	Aliments associés à la listériose dans le monde (Leyral et Vierling, 2007).	28
Tableau 5	Barèmes de pasteurisation (Leyral et Vierling, 2007).	48
Tableau 6	Actions des radiations sur les microorganismes (Cuq, 2007)	55
Tableau 7	Valeurs de pH selon les microorganismes (Benhalima, 2018)	62
Tableau 8	A_w de quelques microorganismes et aliments (Meyer et al., 2004).	64

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
Figure 1	Action de la T° sur les Microorganismes et leur métabolisme (Ait Abdelouahab, 2001).	53
Figure 2	Taux de croissance bactérien en fonction de la température (Benhalima, 2018)	63
Figure 3	Origine des contaminants dans les aliments (modifiée) (Leyral et Vierling, 2007).	77
Figure 4	Types de fermentation lactique, homo-fermentation des bactéries lactiques (a) et hétéro-fermentation (b) (Prescotte <i>et al.</i> , 2010).	80
Figure 5	Modalités du pouvoir toxique (Cuq, 2007).	97
Figure 6	Préparation des dilutions décimale	102
Figure 7	Protocole de recherche et dénombrement des germes totaux à 37°C dans les eaux	103
Figure 8	Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.	106
Figure 9	Protocole de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux dans les eaux	107
Figure 10	Protocole de recherche et dénombrement des spores des bactéries	109
Figure 11	Protocole opératoire de recherche et identification des staphylocoques dans les eaux	110
Figure 12	Protocole opératoire de recherche et identification des salmonelles	111
Figure 13	Protocole opératoire de recherche et identification des <i>vibrio</i> dans les eaux	112
Figure 14	Protocole opératoire de recherche et identification des Shigelles dans les eaux	113
Figure 15	Protocole opératoire de recherche et identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les eaux	114
Figure 16	Recherche et dénombrements des levures et moisissures	115

INTRODUCTION GENERALE

Le terme microbe désigne souvent cet être qui fait du mal à l'homme. Cependant, c'est un élément indispensable à la vie sur terre et aussi un allier utile. Les microorganismes sont des êtres ubiquistes, présents dans l'eau, le sol, l'air et même nos aliments. L'aliment qui est un être vivant ou une partie de lui est un écosystème favorable au développement d'une multitude de germes : bactéries, champignons, protozoaires, virus et agents subviraux, assurant ainsi leurs sources d'énergie et de carbone et trouvant les conditions idéales pour leur survie. Habitants commensaux ou pathogènes des hôtes animales et végétales, saprophytes des eaux et du sol, les microorganismes arrivent par tous les chemins à l'alimentation de l'homme, des animaux et même des insectes.

En effet, l'aliment est contaminé par les microorganismes depuis l'environnement de production : ferme d'élevage animal, champ d'agriculture ou eaux de pêche, etc. ; l'environnement industriel : matériel, manipulateur, chaîne de froid, etc. ; pour finir dans les étagères de vente commerciale au niveau du consommateur. La discipline de la microbiologie alimentaire est d'autant plus importante et nécessaire vue le développement des industries agro-alimentaires, le grand échange commerciale alimentaire régionale et mondiale.

Ce cours, décrit les principaux groupes de microorganismes contaminants les aliments, en insistant sur leur aspect d'altération de la qualité organoleptique et nutritionnel et leur aspect pathogène pour la santé humaine. Aussi, cette partie associe des exemples d'aliments à chaque catégorie de microorganismes par une approche taxonomique et une analyse des facteurs à risque de contamination.

Ce document traite les principaux facteurs physico-chimiques et nutritionnels influençant l'implantation des microorganismes dans les aliments et les moyens mis en œuvre pour lutter contre ces contaminants. Enfin, une dernière partie, aborde quelques exemples d'aliments fermentés les plus importants dans la consommation quotidienne humaine et animale.

L'objectif de ce cours c'est de :

- Connaître et comprendre les caractéristiques et le comportement des principaux micro-organismes intéressant le domaine agro-alimentaire, notamment le lait et les produits laitiers ;
- Les modes d'évaluation de la qualité sanitaire et hygiénique des laits et des produits laitiers ;
- L'importance de l'incidence des micro-organismes et des germes pathogènes sur la qualité nutritionnelle des aliments ;
- Et enfin les capacités des micro-organismes à produire des substances utiles (Bio-industries).

CHAPITRE I : LES PRINCIPAUX GROUPES BACTERIENS INTERVENANT EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

Les microorganismes contaminent de nombreux produits alimentaires et peuvent constituer un grave danger pour leurs qualités et leur conservation. Plusieurs espèces présentent un danger au point de vue sanitaire. D'autres sont des agents de fermentation très utiles et interviennent dans de nombreuses industries.

Un nombre limité de tests permet la détermination des genres ou groupes de genres intéressants (la plupart se développant bien sur gélose nutritive ordinaire) : coloration de Gram (forme, coloration spore ou non), test catalase, test oxydase, éventuellement confirmation de la sporulation par pasteurisation (10 minutes à 80 °C) et culture. Le résultat de ces tests permet d'établir une clé dichotomique simple.

1. BACTERIES

1.1. Entérobactéries

1.1.1. Caractères généraux

La famille des Entérobactéries (Enterobacteriaceae) regroupe de nombreuses espèces dont la plupart sont des hôtes normaux (commensaux) de l'intestin de l'homme et des animaux .dans l'intestin terminal, ces bactéries représentent plus de 10 percent de la flore totale et la majorité de la flore intestinale aéro-anaérobie (rappelons que la majorité de la flore intestinale totale est constituée de bactéries anaérobies strictes). Chez l'homme, l'entérobactérie intestinale prédominante est *Escherichia coli*. Les Entérobactéries sont très répandues dans la nature en raison de la contamination de l'environnement par l'intermédiaire des matières fécale animale et des eaux d'égout.

Ces bactéries sont capables de développements abondants dans un produits alimentaire et donc de dégradations importantes.

Les Entérobactéries sont des bacilles ou coccobacilles Gram (-), oxydase (-), catalase (+), sauf *shigella dysenteriae* serovar 1), asporulés. Ils réduisent les nitrates en nitrites (sauf quelques *Erwinia*) et fermentent le glucose ; ils sont anaérobies facultatifs.

Les Entérobactéries se multiplient facilement sur milieu ordinaire à pH neutre, à une température de 37°C. Elles donnent des colonies apigmentées lisses ou rugueuses de 1 à 3 mm de diamètre. Certaines espèces sont mobiles, d'autres pas. Les entérobactéries sont bien connues au point de vue immunologique. Les principaux antigènes somatiques O, Antigènes flagellaires H, antigènes de surface (ou capsulaires) K, VI ou R.

1.1.2. Principaux groupes

Les principales entérobactéries rencontrées dans l'industrie alimentaire ont traditionnellement été classées en différents tribus. Cette classification qui a tendance à être abandonnée est la suivante :

- **Salmonelleae** : *Salmonella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*.

L'espèce *Salmonella choleraesuis* (*S. enterica*) subsp. *arizonae* ou *S. arizonae* est parfois considérée comme un genre (*Arizona*). *Edwardsiella* est parfois classée dans une tribu à part (*Edwardsiellae*).

- **Escherichieae** : *Escherichia*, *Shigella*.

Ces deux espèces sont apparentées sur la base d'homologie d'ADN ; par ailleurs, certains auteurs classent *Citrobacter* et *Levinae* dans ce groupe.

- **Klebsielleae** : *Klebsiella*, *Hafnia* (= *Enterobacter* : *E. alvei*, *Hafniae*), *Enterobacter* (*Aerobacter*), *Obesumbacterium* (= *Hafnia*), *Serratia*.

Il s'agit de germes saprophytes très répandus dans la nature que l'on peut rencontrer dans l'intestin ou dans les voies respiratoires (dans les cas de *Klebsiella*).

- **Proteae** : cette tribu contient les genres *Proteus* et *Providencia* (ex *Proteus inconstans*).
- **Yersinieae** : cette tribu, correspondant au genre *Yersinia*, contient plusieurs espèces pathogènes (dont l'agent de la peste *Y. pestis*, à transmission non alimentaire).

En microbiologie alimentaire on appelle ((coliforme)) les entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 30°C. Il s'agit d'un groupe disparate issu de plusieurs tribus qui comprend les genres *Escherichia*, *Citrobacter*, entérobactérie et *Klebsiella*. Le genre *Serratia* qui fermente le lactose lentement est souvent inclus dans ce groupe. Sauf quelques biotypes

d'*Escherichia coli*, il s'agit d'espèces peu dangereuses sur le plan sanitaire et qui ne sont jamais très entéro-pathogènes .cependant, lorsqu'il sont en nombre très élevé, les coliformes peuvent provoquer des intoxications alimentaires. On utilise parfois les coliformes comme flore indicatrice de contamination fécale mais il s'agit d'un mauvais indicateur ; les coliformes sont plutôt des marqueurs de qualité hygiénique générale. on appelle coliformes thermo tolérants (et parfois coliformes fécaux), les coliformes capables de se développer à 44°C :cette catégorie inclut essentiellement *Escherichia coli*, ce qui se traduit parfois par l'appellation ((*Escherichia coli* présomptifs)).cette flore est plus spécifique de la contamination fécale que les coliformes totaux .cependant ,on rencontre des biotypes thermophiles chez d'autres espèces (*Enterobacter cloacae*, *E. agglomérant* , etc.) dont certains ne sont pas d'origine fécale . Aussi lorsque c'est possible, il est préférable d'effectuer la recherche ou le dénombrement spécifique des *Escherichia coli* comme test de contamination fécale il faut signaler que certains auteurs préconisent d'utiliser la flore ((Entérobactéries totales)) pour apprécier la qualité hygiénique d'un aliment et de la coupler la recherche d'*Escherichia coli*.

1.1.3. Caractéristiques des principaux genres et espèces

❖ *Salmonella*

Les *Salmonella* sont des Entérobactéries lactose (-). Actuellement la classification est basée sur les sérotypes (ou c are) et définit deux espèces *Salmonella* *Salmonella choleraesuis* (=S. *enterica*) qui est divisée en sous-espèces correspondant en gros aux groupes de Kauffmann : I (subsp *choleraesuis* = subsp *enterica*), II (subsp *salamae*), III divisé en ma (subsp *arizonae*) et llb (subsp *diarizonae*), IV (subsp *houtenae*) plus une sous-espèce VI (subsp *indica*) ; et *Salmonella bongori* (ex sous-espèce V). Rappelons que dans le schéma de Kauffmann, *Arizona* est considéré comme le sous-genre III. La plupart des souches isolées chez l'homme ou les animaux à sang chaud (99,8 %) appartiennent à la sous-espèce (ou sous-genre) I (*Salmonella choleraesuis* subsp *choleraesuis*).

Le genre *Salmonella* comprend plus de deux mille cinq cents sérotypes, dont une cinquantaine est vraiment importants dans nos régions. La formule antigénique est basée sur la nature des antigènes O ou antigènes somatiques, des antigènes H ou antigènes flagellaires, ainsi que sur la présence d'un antigène de type K, l'antigène Vi. Cet antigène capsulaire masque l'antigène O et est révélé après chauffage. Les antigènes o correspondent au polysaccharide du LPS. Certaines

souches peuvent perdre tout ou partie de ce pouvoir antigénique : formes R ou T. L'antigène H est soumis à un phénomène de variation de phase : il peut se trouver sous deux formes (ou phases) dénommées 1 et 2.

Les *Salmonella* sont présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux et présentent des variations importantes de pathogénicité en fonction de la nature de l'hôte. La contamination des produits alimentaires peut être originelle (animaux malades) ou provenir de manipulateurs malades ou porteurs sains de germes. En effet, après infection et guérison, une proportion variable malade reste porteuse du germe au niveau de l'intestin : elle est donc une source de contamination. Toutes les variétés d'aliments sont susceptibles d'être contaminées, mais on retrouve les *Salmonella* dans les produits d'origine animale (œufs, lait, viandes, volailles, charcuterie, poissons, etc.), l'eau polluée et les produits consommés crus. Si les conditions de développement sont favorables, elles sont aptes à se multiplier abondamment ; aux températures basses (5-10°C) la croissance est très lente mais peut être significative.

Plusieurs sérovars parmi lesquels *Typhi* et *Paratyphi A, B* et *C* (correspondant aux anciennes espèces *Salmonella typhi* et *S. paratyphi A, B* et *C*) provoquent des maladies infectieuses appelées respectivement fièvres typhoïdes ou paratyphoïdes. La dose infectante est de l'ordre de 10⁵ germes. Après une incubation de durée variable (1 à 25 jours, mais généralement 15), la maladie se déclenche avec des syndromes digestifs (diarrhées, douleurs abdominales, vomissements) avant d'entrer dans une phase septicémique lymphatique avec fièvre et torpeur (typhos) : cette manifestation est due à l'action au niveau cérébral d'une endotoxine neurotrophe (LPS). La maladie peut durer de 3 à 8 semaines. La fièvre typhoïde est assez peu courante en France, mais endémique dans de nombreux pays. Le sérovar *Typhi* produit deux entérotoxines (une de type cholérique, une de type *shiga-like*) et une cytotoxine. De nombreux facteurs chromosomiques et plasmidiques sont impliqués dans le pouvoir pathogène.

L'incubation est relativement courte (souvent 24 heures). En France, de petites épidémies localisées : elles touchent souvent des populations sensibles (enfants, vieillards) et sont dues généralement à des accidents en restauration collective. Des *Salmonella* pathogènes pour les animaux et non adaptées à l'homme peuvent aussi être à l'origine d'intoxications liées à un développement. Les *Salmonella* étant des bactéries dangereuses, pensables d'un grand nombre des troubles d'origine alimentaire, elles ne doivent pas être présentes dans un aliment. Les cas

mortels ne sont pas exceptionnels, en particulier lorsque les troubles surviennent chez des sujets diminués. Les *Salmonella* sont souvent responsables de maladies animales. La prévention des salmonelloses passe donc aussi par l'éradication chez l'animal.

❖ ***Edwardsiella - Arizona***

Les *Edwardsiella* (*E. tarda*) sont des bactéries saprophytes assez courantes dans l'environnement : on peut les rencontrer dans l'intestin, mais leur présence dans les aliments est rare. Certaines souches produisent une hémolysine Les *Arizona* sont des bactéries proches des *Salmonella* qui sont commensales de l'intestin des reptiles. Il existe 300 sérotypes d'*A. hinshawii*. Ces deux genres peuvent être responsables occasionnellement d'intoxications et de gastroentérites (douleurs abdominales, céphalée, diarrhée) à partir d'aliments et des matières fécales.

❖ ***Citrobacter***

Citrobacter est une Entérobactérie lactose +, commensale de l'intestin. Il s'agit d'un contaminant très courant, qui n'est qu'exceptionnellement entérotoxique (diarrhée, crampes abdominales, vomissements, gastro-entérites infantiles). Certaines souches de *C. freundii* possèdent une entérotoxine. Le nom de genre *Levinae* (tribu *Levinae*) est parfois utilisé pour certaines espèces (*C. intermedius*).

❖ ***Escherichia***

Il existe plusieurs espèces d'*Escherichia* mais la plus importante est *Escherichia coli*. Il s'agit d'une Entérobactérie lactose +, gazogène, réalisant une fermentation acide mixte ; elle produit de l'indole. C'est un hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux qui est très abondant dans les matières fécales (10^6 à 10^7 par gramme : chez 80 % de la flore aérobie). Comme les coliformes, cette espèce peut être responsable d'intoxications à cause d'un développement abondant. En outre, certains sérotypes (souvent sérotypes à antigène B) peuvent être considérés comme pathogènes et provoquent des troubles digestifs spécifiques. Ces *E. coli* pathogènes possèdent selon le cas, une ou plusieurs toxines (hémolysine, cytotoxine et entérotoxines). Au moins deux catégories de toxines ont un déterminisme plasmidique : hémolysines, entérotoxines. Les autres facteurs de virulence sont plasmidiques ou chromosomiques.

Les *Escherichia coli* entéropathogènes sont classés en plusieurs groupes (pathovars) :

➤ ***Escherichia coli* Entéro-Pathogènes (ECEP)** : Il s'agit d'un ensemble hétérogène de souches qui possèdent parfois des toxines de type *shiga-like* (entérotoxine cytotoxique SLT). Parmi ces souches, on trouve les *Escherichia coli* G.E.I. qui provoquent chez l'enfant des gastro-entérites sévères, les Gastro Entérites Infantiles (céphalée, fièvre, vomissements, diarrhées). Les ECEP de type I possèdent un facteur d'adhérence sous contrôle plasmidique.

➤ **Les *Escherichia coli* EntéroToxiques (ECET)** : qui provoquent des syndromes cholériformes (« diarrhée des voyageurs»). Ce sont des souches entéro-toxinogènes capable d'excréter des toxines dont le déterminisme est plasmidique :

- Soit une entérotoxine thermostable, la fraction ST, protéine thermostable de PM 2000 ou 5000 qui augmente la teneur en GMPc;

- Soit une entérotoxine thermolabile, la fraction LT, protéine thermolabile de PM d'environ 80 000 composée d'une sous-unité A de PM 25 000 et de 5 sous-unités B de PM 11 500 ; la région A active l'adénylate cyclase ; - soit les deux.

➤ **Les *Escherichia coli* Entéro-Invasifs (ECEI)** : sont des souches infectieuses provoquant des diarrhées aiguës, avec fièvre ; il s'agit de syndromes dysentériques : la souche se fixe à la muqueuse et l'infecte (des peptides membranaires sont impliqués). Le déterminisme est plasmidique.

➤ **Les *Escherichia coli* Entéro-Hémorragiques (ECEH)** : Ces souches provoquent une diarrhée sanglante et éventuellement un syndrome d'urémie hémolytique lié à la présence d'une entérocytotoxine : vérotoxine 1 (de type *shiga-like* : SLT1) et vérotoxine 2. La souche la plus dangereuse responsable d'épisodes épidémiques avec des cas mortels est le sérotype O₁₅₇ : H₇.

➤ **Les *Escherichia coli* dits DAEC (adhésion diffuse) et EAggEC (entéroaggrégants).**

• Diverses souches non classées mais avec un facteur CNF (facteur nécrosant proche de la cytotoxine Vir) ou CLDT (cytotoxine de type SLT = vérotoxine).

Par ailleurs, certains biotypes sont plus fréquemment rencontrés dans des infections urinaires (ECUP : UroPathogènes).

Des produits d'origine animale, (viande, certains produits laitiers), parfois l'eau, sont incriminés dans la contamination par *Escherichia coli*. Les différents sérotypes d'*Escherichia coli* contiennent plusieurs catégories d'antigènes :

- Antigènes somatiques O : cent quatre-vingt variétés dont une trentaine sont fréquemment rencontrées chez les souches pathogènes ECEP type I
- Antigènes capsulaires (ou d'enveloppe) K de nature polysaccharidique A ou B (une dizaine de types importants de B chez les ECEP, en particulier B4, B6, B14, etc.) ou de nature protéique L (de pili, en particulier antigènes CFA).
- Antigènes de flagelle H (importants pour les ECEH dont le sérotype le plus courant est O₁₅₇ : H₇).

❖ *Shigella*

Les *Shigella* sont des Entérobactéries lactose -, toujours pathogènes, dont le principal réservoir est l'homme (les porteurs sains de *Shigella* sont fréquents). Elles sont surtout transmises par l'eau et par les aliments crus de pH neutre (salades, légumes, etc.), mais d'autres produits peuvent être impliqués : les salades composées très "manipulées" sont fréquemment incriminées.

Les différents sérotypes sont liés à la possession d'antigènes O et K. Ils sont répartis en quatre groupes correspondant à des espèces :

- Groupe A (10 sérotypes) : *Shigella dysenteriae* ou bacille de Shiga ;
- Groupe B (6 sérotypes) : *Shigella flexnerii*;
- Groupe C (15 sérotypes) : *Shigella boydii*;
- Groupe D (1 sérotype) : *Shigella sonnei*.

La forme la plus grave de shigellose est la dysenterie bacillaire due à *Shigella dysenteriae* 1. Cette souche a des propriétés invasives et libère une entérotoxine protéique cytotoxique, appelée toxine «shiga», qui est active sur l'épithélium intestinal, ce qui provoque une diarrhée sanguinolente (syndrome dysentérioriforme) avec des troubles associés (douleurs, céphalées). Il s'agit d'un polypeptide de PM 70 000 (de type AB : une sous-unité A, cinq sous-unités B) qui est thermolabile et sensible aux enzymes protéolytiques. *Shigella dysenteriae* possède aussi une endotoxine neurotoxique de nature lipopolysaccharidique qui est libérée à la lyse des bactéries, une hémolysine et parfois une autre cytotoxine. La virulence est liée à plusieurs polypeptides et protéines d'origine plasmidique ou chromosomique. La dose infectante peut être très faible

(10 à 100 bactéries) et l'incubation est courte (de 6 heures à 2 jours). La dysenterie bacillaire est exceptionnelle en Europe mais endémique dans d'autres continents.

Les autres shigelloses sont plus fréquentes : elles se manifestent comme des gastro-entérites avec un caractère entéro-invasif. La dose infectante est de l'ordre de 200 à 104 germes ; l'incubation varie de 1 à 7 jours. Les espèces incriminées produisent de faibles quantités de toxine «shiga» et certaines possèdent une entérotoxine de type vérotoxine (SLT). *Shigella sonnei* et *S. flexnerii* sont les espèces les plus souvent impliquées. *Shigella flexnerii* produit les deux types de toxines ; *S. sonnei*, *S. boydii* un seul type.

❖ ***Klebsiella, Hafnia, Enterobacter, Obesumbacterium, Serratia***

Ces bactéries sont peu dangereuses : toutefois, certaines espèces (*Hafnia sp*, *E. cloacae*, *E. liquefaciens*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoschlerematis* etc.) sont susceptibles d'entraîner des intoxications (diarrhées, vomissements, douleurs céphalées) en cas de développement dans un aliment (pâtisseries, plats cuisinés). *K. pneumoniae* possède une hémolysine et deux entérotoxines (une thermostable, une thermolabile).

Enterobacter est un genre très fréquent, produits alimentaires. Si l'origine fécale part des souches isolées est courante signaler que l'espèce *Enterobacter agglomerans* (= *Erwinia herbicola*) est souvent rencontrés les végétaux. *Obesumbacterium proteus* (proche de *Hafnia*) est un contaminant classique en brasserie (= *Termobacterium lutescens*). *Serratia* un genre saprophyte pigmenté généralement d'origine non fécale. D'un point de vue écologique, il présente des affinités avec le groupe des bactéries Gram - saprophytes.

❖ ***Proteus-Providencia***

Les *Proteus* sont des bactéries saprophytes très répandues dans le sol et dans les eaux ; elles ne sont pas très fréquentes dans l'intestin. Il s'agit de bactéries extrêmement mobiles qui envahissent rapidement les milieux gélosés. Les *Proteus* et *Providencia* ne sont pas généralement entéropathogènes : cependant certaines souches possèdent des toxines (*Proteus mirabilis* : une hémolysine et une neurotoxine : *Proteus morgani*. une hémolysine) et sont responsables de troubles gastro intestinaux.

❖ *Yersinia*

L'espèce *Yersinia enterocolitica* est encore parfois appelée *Pasteurella enterocolitica* et a été classée dans la famille des Brucellaceae par certains auteurs dans celle des Parvobacteriaceae. Au point de vue biochimique, elle est proche des *Proteus*. Elle est largement répandue dans le sol, les eaux, les végétaux, mais certains biotypes semblent adaptés à l'homme ou à divers animaux : seules certaines souches sont pathogènes (sérotypes O : 3 et 9, et dans une moindre mesure 5 et 8). On peut rencontrer ces souches dans les aliments suite à une contamination généralement d'origine fécale : la dose infectante est d'environ 10^5 - 10^6 bactéries. *Yersinia enterocolitica* provoque la yersiniose qui se manifeste le plus souvent comme une gastro-entérite avec diarrhée et/ou adénite. Des complications plus s (septicémie, méningite, etc.) peuvent survenir pathogénicité est liée au caractère da à une invasive et à d'autres facteurs à chromosomique ou plasmidique) et a une entérotoxine de type ST (à déterminisme chromosomique) de PM 10 000 à 50 000. Des espèces voisines, *Y. Kristensenii*, *Y. frederickse* ; *Y. intermedia*, produisent également une entérotoxine. Les aliments crus (lait, produits laitiers, gateaux coquillages, viandes, en particulier de porc etc.) sont généralement impliqués car le germe est très sensible à la chaleur. *Yersinia enterocolitica* peut se développer à des températures relativement basses (produits réfrigérés) : c'est une bactérie psychrophile.

Yersinia pseudotuberculosis (= *Pasteurella pseudotuberculosis*), agent de la pseudotuberculose animale, provoque exceptionnellement chez l'homme des troubles gastro-intestinaux (vomissements, diarrhée, etc.) et/ou une adénite mésentérique (pseudo-appendicite). L'infection est liée à la consommation d'aliments crus contaminés par des déjections animales. L'espèce produit une toxine thermolabile.

1.2. Bacilles Gram - saprophytes

1.2.1. *Pseudomonas* et genres voisins

Il s'agit d'un groupe de genres bactériens très variés qui constituent une grande partie de ce que l'on appelle la flore banale. Ces bactéries sont très répandues dans la nature et en particulier dans le monde végétal où elles peuvent se révéler phytopathogènes. La plupart sont aérobies. Elles contaminent fréquemment les produits alimentaires qu'elles peuvent dégrader de façon importante. Elles ne sont pas (sauf exceptions) pathogènes pour l'homme. La plupart de ces

germes appartiennent à la famille des Pseudomonadaceae ou à des genres très voisins (coccobacilles ou bacilles Gram - aérobies) : le genre *Pseudomonas* peut être choisi comme genre type. Les bactéries acétiques agents de la fermentation du même nom peuvent être incluses dans cet ensemble. Il existe dans ce groupe quelques genres de bacilles Gram - anaérobies facultatifs qui peuvent être considérés au point de vue taxonomique plus voisins des Enterobacteriaceae que des Pseudomonadaceae. Il s'agit de toutes les bactéries Gram - « banales » trouvées dans les aliments et n'étant pas des Entérobactéries.

Cette flore regroupe des bacilles ou coccobacilles asporulés oxydase + ou oxydase -, mais fermentation du glucose -, par opposition aux Entérobactéries qui sont oxydase + et fermentation +. En général, ils se multiplient bien sur les milieux ordinaires (GNO) ; étant mésophiles ou psychrophiles, ils se développent préférentiellement entre 20 et 30 °C et certains à plus basse température : ils s'accommodent souvent mal de la température de 37 °C. Les colonies sont fréquemment pigmentées. De nombreuses espèces sont mobiles : cette mobilité dépend d'une ciliation de type variable selon les espèces. Ces germes sont très répandus dans la nature : air, eau, sol, produits végétaux. De nombreuses espèces sont des agents phytopathogènes. Elles appartiennent aux genres : *Xanthomonas*, *Photobacterium* (parfois classé comme vibrion), *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, etc. *Pseudomonas fluorescens* est souvent rencontré comme agent d'altération des végétaux de même que *P. syringae*, *P. cepacia*, *P. solanaceum*. Notons que les *Erwinia* qui sont classées comme Entérobactéries sont souvent très proches de ce groupe. Pour ces bactéries, l'examen des dégâts observés sur le matériel végétal permet souvent de les reconnaître (**Tableau 1**).

Tous les germes étudiés ici sont fréquents dans les produits alimentaires. Ils sont dotés à une grande activité métabolique, ont souvent un pouvoir protéolytique et parfois lipolytique et peuvent dégrader des substrats très variés. Les genres les plus fréquents dans les aliments sont *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. lundensis*, etc.), *Xanthomonas* (*X. maltophila* = *Pseudomonas maltophila*), *Flavobacterium*, *Alteromonas* (*A. putrefaciens*), *Acinetobacter*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes* (= *Achromobacter*) et *Aeromonas*; ces deux dernières bactéries sont commensales de l'intestin de l'homme et des animaux et *Aeromonas* est parfois classée comme *vibrion*. Les aliments incriminés sont les viandes, le lait (conservé au froid), les végétaux. Le genre *Serratia* classé parmi les Enterobacteriaceae se situe du point de vue écologique avec les bactéries étudiées ici et il est mis en évidence dans les mêmes

conditions. Le genre *Zymomonas* qui est un agent de fermentation alcoolique de liqueurs sucrées en pays chauds peut être placé dans ce groupe de même que les genres *Photobacterium* et *Halobacterium* qui sont des germes halophiles contaminant fréquemment des produits de la mer.

Ces micro-organismes ne sont en général pas pathogènes pour l'homme et les animaux. Quelques *Aeromonas* et *Alcaligenes* sont des contaminants capables de donner des troubles digestifs légers. *Pseudomonas aeruginosa* (contenant de la pyocyanine) est exceptionnellement l'agent de gastro-entérites (vomissements, diarrhées, crampes abdominales) à partir d'aliments contaminés par des lésions cutanées ou plus rarement des fèces et elle est parfois rencontrée dans l'eau conditionnée. *Pseudomonas aeruginosa* possède au moins six toxines (entérotoxine, exotoxine A, exoenzyme S, hémolysine, leucocidine et glycolipoprotéine). D'autres espèces de *Pseudomonas* (*aureofaciens*, *cepacia*) peuvent produire des toxines (hémolysine et/ou leucotoxine), mais sont très peu dangereuses par voie alimentaire. *Pseudomonas cocovenenans* a été impliquée dans des intoxications (hypoglycémie avec spasmes) en Indonésie (empoisonnement de Bongkrek à partir de noix de coco) : cette espèce produit des substances toxiques, un acide gras qui perturbe le métabolisme des glucides (acide de Bongkrek) et une toxoflavine. Il faut signaler également les espèces *P. mallei* et *P. pseudomallei* qui sont pathogènes pour l'homme et les animaux (morve, mélioïdose) et qui sont exceptionnellement transmises par voie alimentaire. Par ailleurs, certaines espèces de *Flavobacterium*, *Acinetobacter* et *Moraxella* peuvent également donner des troubles digestifs (**Tableau 2**).

Les bactéries acétiques *Acétobacter* et *Gluconobacter* (= *Acetomonas*) seront étudiées à part malgré leur appartenance logique à ce groupe.

Tableau 1 : Association de différents sérovars de *Pseudomonas fluorescens* avec des produits frais et des rhizosphères de plantes (de W Blackburn, 2006).

Sources	<i>P. fluorescens</i> identifiée
Fruits et légumes	Sérovars II, & V
Tubercules de pomme de terre, rhizosphère et tissu feuilleté	Sérovars II, & V
Tubercules de graines de pommes de terre	Sérovars I, II, IV & V
Salade fraîche	Sérovars I, II, III & V
Epinards frais	Sérovars I, IV & V
Céleri séché et le chou stockés à 1 °C	Sérovars II & V
Endive prête à l'emploi stockée à 10 °C pendant 10 jours	Sérovars I, II, III & V
Racines de tomates	Sérovars I, II, IV & V

Tableau 2 : Association des principales espèces de *Pseudomonas* avec des aliments dérivés d'animaux (de W Blackburn, 2006).

Types d'aliments	<i>Pseudomonas spp.</i> identifiées
Lait cru et lait pasteurisé	<i>P. fluorescens</i> sérovars I & III (> 70 %) <i>P. fragi</i> (20%) <i>P. lundensis</i> <i>P. putida</i>
Poissons	<i>P. fragi</i> (> 30 %) <i>P. lundensis</i> <i>P. fluorescens</i> sérovar III <i>P. putida</i>
Viandes	<i>P. fragi</i> (> 50 %) <i>P. fluorescens</i> sérovars I, II & III <i>P. aureofaciens</i> <i>P. putida</i>
Agneau, bœuf, porc	<i>P. fragi</i> (> 70 %) <i>P. fluorescens</i> sérovars I & III <i>P. putida</i>
Volailles	<i>P. fragi</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. lundensis</i>
Sol, eau	<i>P. fragi</i> (Clusters A, B1, B2 & B3) (> 50 %) <i>P. lundensis</i> <i>P. fluorescens</i> sérovars I, II, III, & IV <i>P. aureofaciens</i> <i>P. aeruginosa</i>

1.3. Bactéries acétiques

Ces bactéries font partie du groupe des bactéries Gram - saprophytes aérobies décrites précédemment. Il s'agit des bactéries appartenant aux genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* (anciennement *Acetomonas*) qui regroupe des espèces antérieurement rattachées aux *Acetobacter*. Leur métabolisme et leur intérêt industriel particulier nous conduisent à les étudier séparément contaminent les produits alcoolisés et sont utilisées pour la fabrication du vinaigre.

Ce sont des bacilles Gram - parfois allongés asporulés, généralement mobiles. Ils sont oxydase (-) aérobies et ont un métabolisme de type oxydatif. Ce sont les agents de la fermentation acétique qui est en fait une oxydation incomplète de l'éthanol. Leur caractéristique principale est production d'acide acétique à partir d'éthanol les caractères du groupe peuvent être mis en évidence par les tests suivants : coloration de Gram métabolisme respiratoire sur gélose VF semi solide, test oxydase, production d'acide à partir d'éthanol.

Les bactéries acétiques sont des contaminants fréquents des produits alcoolisés qu'elles acidifient. Dans l'industrie, elles sont utilisées pour la fabrication du vinaigre. Les variétés les plus utilisées sont celles de l'espèce *A. aceti* (vinaigrerie par procédé d'Orléans en cuve plate) et *A. pasteurianus* (vinaigrerie en cuve profonde agitée et aérée). Elles sont également utilisées dans l'industrie pour la production d'acide gluconique.

1.4. Vibrions

1.4.1. *Vibrio*

Il s'agit de bacilles incurvés (famille de Vibrionaceae et germes apparentés).

Le genre *Vibrio* regroupe des espèces souvent saprophytes des eaux et quelques espèces très pathogènes transmises par l'eau ou les produits en contact avec l'eau. Les *Vibrio* sont des bactéries asporulées Gram -, incurvées en virgule et très mobiles. Les cultures âgées présentent un certain polymorphisme. Les cultures examinées à l'état frais montrent des germes se déplaçant rapidement et en bancs. Les *Vibrio* sont oxydase +, catalase +, généralement nitrate réductase +. Ils possèdent un métabolisme fermentatif des sucres sans production de gaz. Ils sont aérobies ou anaérobies selon les espèces. Leurs colonies sont lisses, brillantes ou

translucides. Leur température optimale est de 20 - 30 °C pour les saprophytes de 37 °C pour les pathogènes. Une de leurs caractéristiques est qu'ils se multiplient bien à pH 7 à 9.

Les espèces saprophytes ou parasites des poissons sont souvent appelées globalement vibrions des eaux. Les espèces pathogènes pour l'homme sont essentiellement *Vibrio cholerae* (= *Vibrio comma*), *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*.

Vibrio cholerae est l'agent du choléra. L'espèce est constituée de biotypes, *Cholerae* et El Tor, et de sérovars, principalement O : 1, subdivisé en *types* Ogawa, Inaba, Hikojima, et O : 139 (certains sont non groupables). Ces germes contaminent l'eau, les coquillages et poissons ou divers autres produits consommés crus (lait, légumes, etc.) et ont une origine fécale. Ils sont robustes et peuvent survivre longtemps dans la nature. Les sérotypes O : 1 sont pathogènes par l'action d'enzymes lytiques extracellulaires (mucinase), d'une endotoxine glucido-lipido-protéique (antigène O), et d'une entérotoxine protéique (CT) altérant la perméabilité intestinale.

Le choléra est une toxi-infection intestinale se manifestant par des douleurs abdominales, des vomissements et surtout par une intense diarrhée (aqueuse et « riziforme ») débouchant sur une déshydratation sévère. La dose infectante est de 10^5 à 10^7 bactéries. Il existe des malades inapparents et des porteurs sains après guérison. On distingue deux types épidémiologiques de choléra : l'endémie et l'épidémie, qui sévissent dans de nombreuses régions du globe. Les vibrions non O» n'ont pas l'entérotoxine CT mais possèdent d'autres systèmes entérotoxiques : entérotoxine de type LT, ST, cytotoxine de type shiga-like, adhésines, mucinase, etc.

Vibrio parahaemolyticus (parfois classé dans le genre *Beneckeia*) est un vibron marin halophile (résistant à 3% de NaCl), responsable de toxiinfections alimentaires (gasto-entérite avec vomissements, douleurs abdominales, diarrhée muqueuse et sanguinolente, céphalées, fièvre) : l'incubation est courte (en général 12 heures) et la maladie dure de 2 à 5 jours. La plupart des souches de *V. parahaemolyticus* produisent une hémolysine (Kanagawa +), une cytotoxine de type *shiga-like* et des adhésines. Ce micro-organisme a été signalé en France avec une faible fréquence dans certains produits marins. Au Japon, il est responsable d'un grand nombre de cas de toxiinfections liées à la consommation de poissons séchés. Cette bactérie résiste bien aux opérations de congélation et de réfrigération. *Vibrio vulnificus* est un vibron proche de *V. parahaemolyticus* mais est lactose +. Il provoque des infections graves à partir de plaies : il est hautement invasif. Transmis par les huîtres, il peut donner une infection intestinale sévère avec

septicémie chez des individus diminués (dose infectante : 10^4 à 10^6). Il possède plusieurs facteurs de pathogénicité dont une cytolysine.

D'autres *Vibrio* (*alginolyticus*, *mimicus*, *fluvialis*, *furnisii*, *damsela*, etc.), transmis par des coquillages, peuvent provoquer des gastro-entérites et des infections chez des sujets diminués. Ces espèces possèdent des entérotoxines et/ou d'autres toxines (cytotoxine, cytolysine, vulnificolysine, damselysine, etc.). Parmi les espèces saprophytes, *Vibrio costicola* contamine parfois les saumures et viandes salées.

1.4.2. *Aeromonas* – *Plesiomonas*

Les *Aeromonas* sont des germes psychrophiles aquatiques. On peut les rencontrer également dans l'intestin de l'homme et des animaux. L'espèce *Aeromonas salmonicida* est parasite des poissons. Ils peuvent contaminer divers produits (viandes, poissons, volailles, lait, eau) et sont exceptionnellement agents de gastro-entérites avec diarrhée, douleurs abdominales et fièvre. *Aeromonas hydrophila* produit deux entérotoxines (une thermostable, une thermolabile), deux hémolysines (A et B), une cytotoxine. Les autres *Aeromonas* (*A. proteolytica*, *salmonicida* et *sobria*) produisent des hémolysines et/ou cytotoxines. La dose infectante est de 10^6 .

Plesiomonas (espèce principale *Plesiomonas shigelloides*, parfois classée *Aeromonas shigelloides*) est une bactérie aquatique proche des *Aeromonas* qui peut également donner des gastro-entérites à partir d'eau ou de coquillages : elle possède une entérotoxine atypique et la production d'autres agents toxiques (hémolysine, endotoxine, etc.) est suspectée.

1.4.3. *Campylobacter*

Le genre *Campylobacter* peut être également considéré comme un vibrion (il est parfois classé comme spirille). Plusieurs espèces sont très répandues dans l'intestin des animaux, en particulier des volailles. Il s'agit d'une bactérie très exigeante, ne se développant que sur milieux riches. Assez fragile et microaérophile : une atmosphère enrichie en CO_2 , favorise sa croissance. Par ailleurs, *C. jejuni* et *C. coli* ne peuvent pas se multiplier à des températures inférieures à 25 - 30 °C, ce qui limite leur possibilité de développement dans les aliments ; il faut une dose infectante supérieure à 10^2 - 10^3 cellules pour qu'il y ait danger. Les aliments incriminés sont essentiellement l'eau, les mollusques, le lait cru et les viandes, en particulier les volailles.

Campylobacter jejuni provoque la campylobactériose, maladie d'origine alimentaire assez répandue qui se manifeste habituellement comme une entérite bénigne, plus rarement comme

une entérite sévère avec diarrhée et parfois des complications méningées et articulaires. La pathogénicité est liée au pouvoir invasif (facteurs d'adhésion) et à des activités enzymatiques cytotoxiques. Cette espèce produit deux entérotoxines (une thermostable, une thermolabile) et une cytotoxine. L'entérotoxine thermolabile (CJT) a un PM de 70 000 et elle est proche des toxines LT d'*Escherichia coli* ou CT de *Vibrio cholerae*. La cytotoxine est impliquée dans les symptômes de diarrhée hémorragique.

Campylobacter coli produit deux entérotoxines (une thermostable, une thermolabile) et *Campylobacter fetus* (appelé parfois *Vibrio fetus*) en produit une. Certaines souches de *C. coli* produisent également une cytotoxine. Ces espèces peuvent provoquer des gastro-entérites (crampes, vomissements, diarrhée, fièvre) à partir de lait ou de viandes crues contaminés par des fèces. Le genre *Helicobacter*, proche de *Campylobacter*, est responsable d'ulcères gastro-duodénaux.

1.5. *Brucella* et bactéries voisines

Les *Brucella* sont des bactéries pathogènes de position taxinomique incertaine. Elles sont souvent classées dans la famille des Brucellaceae, parfois dans une famille appelée Parvobacteriaceae. Ce sont de petits coccobacilles Gram - immobiles, aérobies, à oxydase généralement positive. Leur croissance est faible et lente sur les milieux ordinaires. Ils se développent sur des milieux enrichis de sang, de sérum ou de facteurs de croissance. Le milieu trypticase-soja peut par exemple être utilisé. Toutes pathogènes, donnant une maladie animale qui transmissible à l'homme. Il s'agit de la brucellose ou fièvre de Malte, qui peut être chronique ou aiguë. Cette maladie fébrile à évolution septicémique se manifeste par divers symptômes (douleurs, frissons, céphalée, amaigrissement) est liée à un caractère invasif et à la libération d'endotoxines pyogènes. L'incubation varie de 1 à 3 semaines et la maladie et la convalescence longues. Les *Brucella* peuvent être transmises les aliments carnés : viandes, lait cru, fromages (surtout ovins). En France, les cas sont rares mais la brucellose se rencontre à l'état endémique dans diverses régions du pourtour méditerranéen Les espèces pathogènes les plus importantes dans le cadre de l'industrie alimentaire sont : *Brucella suis*, *Brucella melitensis* et *Brucella abortus*. Il existe d'autres espèces mais elles sont plus rares.

On peut citer aussi *Francisella tularensis* qui est une espèce ayant des caractéristiques proches de celles des *Brucella* : petite taille, culture difficile, caractère aérobie strict, Gram -. Cette bactérie est relativement psychrophile. Elle est l'agent de la tularémie dont quelques rares cas de contamination digestive ont été signalés (eau souillée) : dans les cas habituels, la contamination se fait par contact avec la peau. *Pasteurella multocida*, bactérie aéro-anaérobie, peut exceptionnellement donner des infections septicémiques (pasteurelose) par consommation de volailles ou de légumes contaminés par contact avec des animaux contaminés ou par contamination fécale.

Legionella, agent de la maladie du légionnaire (affection respiratoire), peut être exceptionnellement transmise par l'eau. *Streptobacillus moniliformis* est une espèce sérophile qui a p incriminée dans des infections de type à partir d'une consommation de lait cru.

1.6. Microcoques et staphylocoques

Ce sont des coques (famille des Micrococcaceae dits non lactiques par opposition aux streptocoques bien qu'ils puissent produire de l'acide lactique par fermentation. Il s'agit de bactéries commensales de la peau des animaux et de l'homme, qui contaminent fréquemment les aliments et peuvent entraîner des dégradations et des problèmes sanitaires.

Les Micrococcaceae sont des coques Gram +, immobiles, asporulés, groupes généralement en amas irréguliers. Ils sont catalase + (sauf *Sarcina*), le type respiratoire étant aérobie ou anaérobie sur gélose VF profonde. Leurs colonies sont lisses et fréquemment pigmentées. Les genres intervenant dans l'alimentation sont essentiellement *Micrococcus*, *Staphylococcus* et à un moindre degré *Sarcina*. La différenciation entre ces divers genres est basée sur l'arrangement et position chimique cellulaire, le métabolisme énergétique, la résistance à des antimicrobiens (lysosyme), la pathogénicité et l'hybridation ADN. La classification de ces germes évolue fréquemment.

Staphylococcus et *Micrococcus* sont très répandus dans la nature et ils présentent des capacités importantes de développement et de résistance : ils sont souvent thermorésistants (mais ne survivent pas à la pasteurisation), halophiles, parfois psychrophiles, peu exigeants du point de vue nutritif. Ils ont fréquemment des propriétés protéolytiques. Leur caractère saprophyte de la peau et des muqueuses des êtres vivants en fait des agents de contamination par manipulation.

Ils ont un pouvoir de dégradation intense, même dans des conditions difficiles (produits salés pour les *Micrococcus*, anaérobiose pour les *Staphylococcus*) : ils résistent au NaCl et à une faible activité d'eau. Cependant, ils sont inhibés par un pH acide (< 4 pour la croissance et < 5 pour la toxinogénèse). Les *Micrococcus* et de nombreuses espèces de *Staphylococcus* ne sont pas pathogènes. Les *Sarcina* sont des contaminants de l'environnement. *Saccharococcus thermophila* est une espèce thermophile (optimum 68 °C) saprophyte des raffineries de sucre.

Il existe de nombreuses espèces de *Staphylococcus* (27 à plus de 30 selon les auteurs) classées en six groupes génomiques. Quelques espèces de *Staphylococcus*, productrices de coagulase sont pathogènes : de nombreux biotypes de l'espèce *Staphylococcus aureus* le sont pour l'homme et quelques autres souches à position taxonomique incertaine, dont des coagulase - peuvent l'être également. Ces biotypes sont entérotoxiques par l'intermédiaire d'une toxine thermostable qui est libérée dans les aliments pendant la croissance. Cette toxine protéique, non cytotoxique, n'est pas très dangereuse. Sept types d'entérotoxines sont actuellement connus : A, B, C₁, C₂, C₃, D, E (une toxine F ou H est parfois mentionnée).

L'intoxication est caractérisée par une période d'incubation de courte durée (1 à 6 heures, en moyenne 3) puis par des symptômes variés : nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée, céphalée chute de tension artérielle, hypermobilité intestinale, quelquefois fièvre. Les troubles sont de courte durée (1 à 2 jours) et la maladie est rarement mortelle. La toxinogénèse est sous contrôle chromosomique, phagique et/ou plasmidique. Le nombre de germes nécessaires pour qu'il y ait danger d'intoxication est de l'ordre de 10⁵ à 10⁶ germes par g, la quantité de toxine dangereuse pour l'homme variant de 0,1 à 10 µg/kg. Les aliments dangereux sont nombreux : viandes, plats cuisinés, produits à base de lait ou d'œufs, pâtisseries, crèmes glacées, charcuteries, plus rarement fromages (peu acides). Ce type d'intoxication est un des plus courants dans l'alimentation. Les entérotoxines ne sont pas hydrolysées par les protéases digestives (pepsine, trypsine) et sont très résistantes aux traitements thermiques : elles sont particulièrement thermostables pour des exotoxines. Un traitement thermique du type pasteurisation (60 °C, 30 minutes) permettant de détruire les micro-organismes, ne détruira pas les toxines staphylococciques qui peuvent résister plusieurs heures à cette température (elles résistent 30 minutes à 100 °C). La contamination se fait à partir de la peau et des lésions de celle-ci (furoncles). Le caractère toxique n'est qu'une des manifestations possibles du pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* qui présente fréquemment un pouvoir infectieux (en

dehors de l'alimentation) : ce pouvoir pathogène est lié à la présence de nombreuses toxines et enzymes. *Staphylococcus aureus* possède en effet une dizaine de toxines : trois hémolysines (toxines α , β , δ), deux autres toxines antileucocytes (toxine γ , leucocydine), une exfoliatine (trois types), deux toxines pyrogènes (A et B), une toxine du syndrome du choc toxique, une entérotoxine (sept types). Par ailleurs, il possède de nombreux autres facteurs de virulence (coagulases, phosphatase, fibrinolysine, hyaluronidase, ADNases, lipase, etc.). Leur déterminisme génétique est souvent plasmidique (coagulase, hémolysine, fibrinolysine, etc.) de même que la synthèse de pigment jaune qui intervient dans la résistance à la phagocytose (par résistance à l'action de Ô).

Les *Micrococcus* ne sont pas pathogènes : ils ont parfois un rôle utile dans l'industrie, par exemple pour la maturation de certains fromages ou dans les produits salés ou en saumure.

1.7. Streptocoques et autres coques lactiques

Ils font partie du groupe des bactéries lactiques qui inclut les agents des fermentations produisant de l'acide lactique : bacilles (*Lactobacillaceae*) et coques (*Streptococcaceae*). Il s'agit de bactéries Gram + à exigences nutritives parfois complexes que l'on trouve dans les produits alimentaires riches, en particulier le lait.

La famille des *Streptococcaceae* regroupe des genres très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminants et surtout comme agents de fermentation lactique : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* (ces trois genres étant anciennement regroupés en un genre unique *Streptococcus*), *Leuconostoc* et *Pediococcus*. Il s'agit de coques Gram +, asporulés, immobiles, généralement groupés en paires et surtout en chaînes de longueur variable. Ils sont catalase - ; cependant, certains pédiocoques possèdent une pseudocatalase et peuvent apparaître catalase +. Dans ces cas douteux, il faut pratiquer la recherche de la peroxydase par le test à la benzidine. Les coques lactiques sont benzidine -. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique en quantité importante mais variable selon le genre ; certains ont des activités protéasiques et peptidasiques. La différence entre les groupes est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation lactique (homo ou hétérolactique).

1.7.1. *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus*

Ce sont des germes anaérobies facultatifs, généralement micro-aérophiles et très exigeants au point de vue nutritionnel. Ils se développent bien à 37 °C. La plupart des espèces ne sont pas en général capsulées. Leur fermentation est homolactique et donne de l'acide lactique surtout dextrogyre. Ils ont fréquemment un pouvoir hémolytique et peuvent être «groupés » par des tests sérologiques. Quelques espèces sont pathogènes en dehors du cadre alimentaire : elles peuvent cependant se retrouver dans les aliments (streptocoques de mammites dans le lait) et provoquer des infections. De nombreuses autres sont saprophytes, en particulier dans les produits laitiers. Certaines espèces sont abondamment utilisées dans les industries de fermentation lactique (laiterie, beurrerie, fromagerie, mais aussi saumure et salaisons). Ce sont les agents d'acidification et de coagulation lactiques en fromagerie.

Les streptocoques ont été classés au départ en quatre groupes d'espèces de *Streptococcus* selon les critères de Shermann. Bien qu'actuellement certains groupes et espèces aient été transformés en nouveaux genres, cette classification est encore parfois utilisée. On distingue :

❖ Le groupe *pyogenes*

Il contient des streptocoques pathogènes hémolytiques (hémolyse β) et appartenant au sérologiques de Lancefield A B C E E streptocoques peuvent occasionnellement des infections d'origine alimentaire : toujours classés comme « vrais » *Streptococcus* L'espèce type est *S. pyogenes* (groupe A). Agent d'angines et de la scarlatine. *Streptococcus pyogenes* possède deux hémolysines de type β (streptolysines O, S), une toxine érythrogyène provoque la scarlatine), des facteurs mitogènes et des enzymes lytiques (fibrinolysine) ; la protéine M localisée sur les fimbriae favorise la virulence. Les biotypes représentent une quarantaine de sérotypes au sein du groupe A. Après 1 à 3 jours d'incubation, les troubles se manifestent par des maux de gorge, céphalées, vomissements et de la fièvre. La contamination des produits est d'origine respiratoire et les aliments incriminés sont le lait, les œufs et crèmes glacées, les pâtisseries. L'espèce *S. agalactiae* (groupe B), agent de mammites, est parfois rencontrée dans l'alimentation, de même exceptionnellement *S. zooepidemicus* et *S. equisimilis* (groupe C) et plus rarement des streptocoques du groupe G. *Streptococcus agalactiae* possède une hémolysine et le facteur CAMP. Des mammites peuvent être aussi provoquées par *S. dysgalactiae* (groupe C). Dans tous les cas, la dose infectante est forte (10^8 cellules).

❖ **Le groupe *viridans***

Il comprend des streptocoques à hémolyse α ou γ non groupables par la méthode de Lancefield appartenant au groupe K. L'espèce *S. thermophilus* est un agent d'acidification fréquent dans certains fromages et surtout les yaourts. Parmi ce *Streptococcus*, on trouve le groupe des « streptocoques oraux ». Il inclut *Streptococcus mutans* non groupable, qui est un commensal de la cavité buccale, agent de caries dentaires, ainsi que *si mitis*, *S. salivarius*, etc.

❖ **Le groupe *lactique***

Il concerne des streptocoques non hémolytiques (γ) appartenant au groupe sérologique N et contient des espèces très importantes en fromagerie, *S. lactis*, *S. lactis* var diacetylactis et *S. cremoris* désormais appelées *Lactococcus lactis*, *Lc. cremoris*, etc.

❖ **Le groupe des *entérocoques***

Il regroupe les streptocoques fécaux qui présentent une hémolyse α , β ou γ , et qui appartiennent au groupe sérologique D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *S. faecalis* et ses variétés *S. durans* (= *S. faecium*) et *S. bovis* (classée dans les *viridans*). Ils sont maintenant classés comme *Enterococcus*. Ce sont des germes de contamination fécale mais ils ne sont qu'exceptionnellement pathogènes : ce sont des pathogènes opportunistes avec une dose forte infectante (10^8 à 10^{10} cellules). Ils peuvent même avoir un intérêt industriel (fromagerie). *Enterococcus faecalis* (et *faecium*) résistent à 5 % de NaCl et 30 minutes à 60 °C : la plupart des biotypes possèdent une hémolysine. Les toxico-infections à entérocoques sont très rares : elles provoquent douleurs abdominales et diarrhée et sont dues à la consommation de viandes ou de pâtisseries contaminées.

1.7.2. *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des germes micro-aérophiles à besoins nutritifs complexes. Leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. De nombreuses espèces sont acidophiles et osmophiles. Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique, mais fréquemment la forme Lα prédomine : les espèces osmophiles non acidophiles ne donnent que cette forme. Ils sont saprophytes et contaminent les produits végétaux. Ce sont des agents de dégradation en brasserie (*P. damnosus* = *P. cerevisiae*) : la bière est rendue visqueuse par accumulation de matériel polysaccharidique extracellulaire et il peut également y avoir formation de diacétyle. Les pédiocoques causent aussi des altérations

(viscosité) dans les produits végétaux Choucroute, olives, etc.) Et parfois les viandes et Vissons. Ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries. Les *Aerococcus* sont proches des *Pediococcus*.

1.7.3. *Leuconostoc*

Les *Leuconostoc* sont également anaérobies, facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel. Ils se développent entre 20 et 30 °C pas à 45 °C. Ils sont généralement capsulés : cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans le milieu. Leur fermentation hétérolactique donne de l'acide L-lactique. Ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes. Ce sont des contaminants fréquents qui produisent des accidents de fabrication dans les produits acides et sucrés (piqûre a lactique gazogène, viscosité, «filage») ou les végétaux (produits de VI^e gamme). Ils sont responsables de la fermentation malo-lactique des vins (*L. oenos*). Ils sont utiles dans certains fromages (bleus) où ils facilitent l'« ouverture » par la production de CO₂. Ils interviennent aussi dans les ensilages (*L. mesenteroides*), et les végétaux fermentés : olives, choucroute, etc., mais aussi cacao et café (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Principaux espèces de bactéries lactiques (**Federighi, 2005**).

Genres	Morphologie	Type de fermentation	Espèces	Température de croissance
<i>Streptococcus</i>	Cocci en tétrades	Homo-fermentaire	<i>S. thermophilus</i>	40-45°C
<i>Lactococcus</i>			<i>L. lactis, L. cremoris</i>	10- 40°C
<i>Leuconostoc</i>			<i>Ln. Mesenteroides</i>	10- 30°C
<i>Pediococcus</i>			<i>P. acidilactici</i>	25-35°C
<i>Lactobacillus</i>	Bâtonnet en chaînette	Homo/ hétéro-fermentaire	<i>Lb. acidophilus, Lb. bulgaricus, Lb. delbrueckii, Lb. lactis, Lb. casei, Lb. plantarum</i>	45-50°C

1.8. Lactobacilles et autres bacilles lactiques

1.8.1. *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram +, asporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles.

Ils sont catalase (-) (certains ont une pseudo-catalase, mais comme les pédiocoques, sont benzidine -), micro-aérophiles ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO₂, à côté de l'acide lactique. Les lactobacilles homofermentaire obligés (exemple : *L. delbrueckii*) utilisent la voie de la glycolyse ; les pentoses et le gluconate ne sont pas fermentés. Parmi les hétérofermentaires, certains sont facultatifs (exemple *L. casei*) : ils utilisent la glycolyse ou le cycle des pentoses ; les pentoses et le gluconate sont fermentés par l'intermédiaire de ce dernier. Les hétérofermentaires obligés (exemple *L. brevis*) n'utilisent que le cycle des pentoses. Les lactobacilles exigent pour leur développement des milieux bien adaptés, riches en acides aminés. vitamines et acides gras : ils sont acidophiles. Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques.

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel :

➤ **Groupe «*Thermobactérium* »**

Il comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45 °C mais pas à 15 °C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourts, fromages) sont *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. leichamni*, *L. delbrueckii*, *L. kefirifaciens*, *L. mali*, etc.

➤ **Groupe «*Streptobactérium* »**

Il regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles qui se développent à 15 °C (ils peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat). Il comporte les espèces *L. casei* qui est le lactobacille prédominant du lait, *L. plantarum* rencontré dans la choucroute, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *L. graminis*, *L. rhamnosus*, etc.

➤ **Groupe «*bétabacterium*»**

Il comprend les lactobacilles hétérofermentaires. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. viridiscens*, *L. kefir*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. sanfrancisco*, etc.

Les lactobacilles contaminent fréquemment les produits alimentaires et sont agents de surissement. Ils ne sont jamais pathogènes. Dans les viandes, les lactobacilles provoquent le verdissement par action de l' H_2O_2 qui transforme l'hémoglobine en choléglobine, ou de l' H_2S qui forme de la sulfomyoglobine. *L. brevis*, *casei* et *plantarum* ont une action défavorable dans la bière ainsi que dans d'autres fermentations de grains pour la production d'alcool (whisky). *L. casei* et *plantarum* altèrent aussi les jus sucrés. Dans le cidre, un mauvais goût dû à l'acétate est provoqué par *L. brevis*, *plantarum*, *mali*, etc. Dans les produits conservés par des acides (pH 3,5-3,8 ; 4-5 % d'a. acétique), *L. acetotolerans* et d'autres lactobacilles (*plantarum*, *buchneri*, *brevis*, *delbrueckii*, *casei* ou *fructivorans*) peuvent résister et causer des altérations.

Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie, en laiterie, fromagerie, dans la fabrication de la choucroute et interviennent dans les saumures et charcuteries. Dans les yaourts, *L. bulgaricus* forme des peptides utilisés par *S. thermophilus* qui forme de l'acide formique qui est capable de le stimuler (synergie). L'arôme du yaourt est dû à l'acétaldéhyde formé à partir de thréonine par l'aldolase de *L. bulgaricus*. Divers lactobacilles (*L. casei*, *plantarum*, *brevis*, *buchneri*, etc.) interviennent pendant l'affinage des fromages. *L. helveticus*, *lactis* et *bulgaricus* agissent avec *S. thermophilus* dans les fromages à pâte cuite. Dans le kéfir, *Lactobacillus kefir*, *L. kefiranofaciens* et d'autres lactobacilles mésophiles interviennent à côté de *Candida kefir*, d'autres levures, de *Leuconostoc* et de bactéries acétiques. Le rôle des lactobacilles est également important dans les végétaux fermentés. Dans les ensilages, il y a d'abord intervention des coliformes qui utilisent l'oxygène, puis de *Leuconostoc* et d'entérocoques, enfin de pédiocoques et de lactobacilles (*L. plantarum*, *casei*, *brevis*, *curvatus*, *buchneri*, *acidophilus*, *graminis*, etc.). Dans la choucroute, on observe une succession de flore voisine avec *L. brevis*, *plantarum*, *curvatus*, *sake*, etc. Dans les cornichons on trouve *L. plantarum* et *brevis* au côté de *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*. Dans certains pains, les lactobacilles homo ou hétérofermentaires *delbrueckii*, *acidophilus*, *plantarum*, *brevis* et surtout *sanfrancisco*) interviennent au côté de levures. Dans le vin, les lactobacilles participent à la fermentation malo-lactique (*L. plantarum*, *casei*, *brevis*, *buchneri*, *hilgardii*, *fructivorans*, *mali*, etc.) et à la dégradation de l'acide tartrique (*L. plantarum* et *brevis*). Dans certaines bières « Berliner Weisse » *L. brevis* est ajouté à *Saccharomyces cerevisiae* : un moût acide fabriqué à 48-50 °C avec *L. delbrueckii*, *lactis*, *rhamnosus* (qui fermentent le maltose) est ajouté à 1-2% dans un moût normal.

1.8.2. Autres lactobacilles et bactéries voisines

➤ *Bifidobacterium*

(Anciennement *Lactobacillus bifidus*) est un bacille présent dans la flore intestinale du nouveau-né. Il est utilisé dans certains yaourts (probiotiques). Sa présence entraînerait un effet anti-infectieux au niveau intestinal à cause de la présence d'un facteur bifidogène. *Bifidobacterium* est phylogéniquement proche des actinomycètes alors que les autres bactéries lactiques sont proches des clostridies.

➤ *Carnobacterium*

Est un lactobacille hétérofermentaire contaminant les viandes et poissons.

L'espèce pathogène *Erysipelothrix insidiosa* (= *E. rhusiopathiae*) responsable du rouget du porc qui est très rarement transmis par voie alimentaire est également une bactérie «lactique » catalase négative. Elle est parfois considérée comme une espèce corynéforme. Elle se développe mal sur les milieux ordinaires. Le genre *Listeria* est étudié à part à cause de son importance. Le genre *Brochothrix* est proche de *Listeria*.

1.9. *Listeria*

Il s'agit de bacilles mobiles, catalase +, aéroanaérobies. Ces bactéries saprophytes du sol et parfois de l'eau sont rencontrées également dans le tube digestif de nombreux animaux. On les trouve aussi dans les matières fécales et les ensilages et elles sont susceptibles de contaminer les aliments. La listériose est une maladie sporadique, liée à la présence de *Listeria monocytogenes* parfois *L. ivanovii* et d'autres *Listeria*) et peut en due à un phénomène d'opportunité. Cette bactérie, psychrophile (elle pousse de 0-1 à 45C°) et halophile, est très résistante et peut échapper à la pasteurisation. Son pouvoir pathogène est lié à la présence d'hémolysines (listériolysines O et B), d'une protéine de PM 60 000, d'une phospholipase et de facteurs toxiques pariétaux. Ce bacille est de type infectieux et se manifeste sous forme d'une infection septicémique avec atteintes neurologiques (fièvre, céphalée, vomissements, pharyngite, méningite, «monocytose »). Les cas mortels ne sont pas rares. La listériose fœto-maternelle est dangereuse pour le fœtus (avortement) et le nouveau-né. Toutes les souches ne sont pas pathogènes : sur seize sérovars, trois sont principalement incriminés, les 4b et occasionnellement 1/2 a et 1/2b. L'origine alimentaire de la listériose n'est pas toujours facile à

démontrer. On rencontre les *Listeria* chez les animaux qui peuvent présenter des signes d'infection (mammites chez les bovins) ou être des porteurs sains. Les légumes, les viandes et volailles crues, certaines charcuteries (rillettes), les œufs ou les produits laitiers (lait, fromages et en particulier les fromages à pâte molle peu acide) peuvent être des vecteurs de la maladie : la contamination peut provenir de la matière première ou être liée à l'environnement. Le développement peut se faire dans les aliments conservés au froid.

Brochothrix (*B. thermosphacta*) est un germe psychrophile qui est souvent rencontré comme contaminant des viandes réfrigérées : il est responsable d'odeurs désagréables. Contrairement à *Listeria*, il n'est pas mobile (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Aliments associés à la listériose dans le monde (Leyral et Vierling, 2007).

Aliments	Nombre de cas
Produits laitiers	597
Produits carnés	741
Produits végétaux	91
Produits de la mer	32
Ovoproduits	33

1.10. Actinobactéries

1.10.1. Caractères généraux

Ce vaste ensemble regroupe des familles variées de bactéries présentant en générale des morphologies particulières. Par leur écologie et leur conséquence, un certain nombre d'espèces se rapprochent des Gram – saprophytes aérobies. Les « actinobactéries » sont des bactéries Gram +, mais qui parfois se colorent difficilement. Elles sont asporulées, c'est-à-dire qu'elles ne forment pas d'endospores thermorésistantes. Elles ont, selon les espèces, des formes bacillaires irrégulières, des structures de type ou d'apparence mycéliens avec ramification. Certaines espèces forment des conidies appelées spores mais qui n'ont pas la même signification biologiques que les endospores. Ces bactéries sont souvent aérobies, quelquefois anaérobies, leur catalase est positive. Quelques bactéries pathogènes appartiennent à ce groupe. Les principales bactéries rencontrées en industries alimentaire sont les bactéries propioniques,

les bactéries « corynéformes », quelques *Streptomyces* et des mycobactéries pathogènes (il faut signaler que dans la classification récentes, *Micrococcus* est rattaché aux actinobactéries).

1.10.2. Bactéries corynéformes saprophytes

Il s'agit des bactéries présentant des caractères proches du genre *Corynebacterium*. Les germes de ce groupe intéressant l'industrie alimentaire appartiennent essentiellement aux genres *Arthrobacter*, *Aureobacter*, *Brevibacterium*, *Caseobacter*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Rarobacter*, etc. Ils font partie pour la plupart de la flore banale » Gram +. Les bactéries corynéformes sont des bacilles Gram +, asporulés, non acido-alcool-résistants, de forme et de coloration généralement irrégulières. Ils sont fréquemment renflés en massue, et leur arrangement est irrégulier, en palissade, en lettres chinoises d'aspect branché. Ils sont catalase + et généralement aérobies facultatifs. Il s'agit d'espèces saprophytes fréquentes comme contaminants banaux et habituellement non pathogènes. L'espèce pathogène *Corynebacterium diphtheriae* n'a pratiquement aucun rapport avec l'alimentation, bien que quelques rares cas de contamination alimentaire par le lait cru aient été décrits (cette souche est toxigène et provoque la diphtérie, infection membraneuse de la sphère rhinopharyngée). Certaines espèces jouent un rôle non négligeable dans l'industrie fromagère, en particulier celles appartenant aux genres *Brevibacterium* (constituant de la morge, proteolytique, pigmenté en orange) et *Caseobacter*. *Microbacterium* est aussi rencontré fréquemment dans les produits laitiers. L'espèce *Corynebacterium pyogenes* peut être responsable de mammites chez la vache : cette espèce possède une hémolysine. Le genre *Rarobacter* est rencontré dans les industries de boissons alcoolisées : il provoque la lyse des levures.

Le genre *Kurthia* est constitué de bacilles réguliers, aérobies stricts, catalase + : on peut le rencontrer comme contaminant de produits carnés. Il peut être inclus dans ce groupe. Rappelons que *Listeria* et *Erysipelothrix* sont également considérés parfois comme des genres «corynéformes».

1.10.3. Propionibacterium

Les *Propionibacterium* sont des bacilles Gram +, asporulés, immobiles et de forme irrégulière. En milieu aéré, les cellules sont allongées, renflées en massue, branchées en apparence. Leur arrangement est irrégulier avec des formes anguleuses. En milieu anaérobie, les cellules se présentent sous forme de bâtonnets courts d'un aspect proche des streptocoques. Les

Propionibacterium sont catalase +, micro-aérophiles ou anaérobies mais relativement aérotoleurants en raison de leur catalase, ils se développent lentement sur les milieux gélosés. Les colonies sont parfois pigmentées. Le pH favorable est la neutralité. Toutes les souches se développent à 30 °C. La croissance est possible dans des milieux biliés et salés. Le métabolisme est de type fermentaire : les glucides sont attaqués avec production de CO₂, d'acide acétique et propionique. Ce genre regroupe de nombreuses espèces dont certaines sont parasites, parfois pathogènes et n'interviennent pas dans l'alimentation (espèces du groupe *acnes* parfois classées dans le genre *Corynebacterium*) et d'autres saprophytes, rencontrées fréquemment dans les produits laitiers. Ces dernières espèces sont utilisées en fromagerie : elles sont responsables de l'ouverture des fromages à pâte pressée cuite (gruyère, emmenthal) en fermentant l'acide lactique en acide propionique et en CO₂, (*Propionibacterium shermanii*). Certaines propionibactéries jouent aussi un rôle important dans le rumen des ruminants.

1.10.4. Streptomyces

Quelques espèces du genre *Streptomyces* peuvent intervenir en alimentation. Ce sont des bactéries saprophytes du sol, Gram +, asporulées, apparaissant sous forme de filaments ramifiés portant des conidies en chaînes parfois très longues. Elles sont aérobies et à métabolisme fortement oxydatif. Leur température optimale est de 25° à 35 °C, leur pH optimal de 6,5 à 8 ; les colonies sont de grande taille souvent pigmentées et d'aspect fongique ; le développement est généralement lent sur gélose nutritive ordinaire (15 jours). Les *Streptomyces* peuvent se développer dans certains aliments et causer des odeurs et goûts désagréables. Ils sont faiblement protéolytiques et ne sont pas pathogènes. On les rencontre parfois dans l'eau des citernes ou retenues d'eau d'alimentation, où ils donnent un goût de terre dû à la géosmine ou au méthyl-isobornéol, et quelquefois sur les poissons.

1.10.5. Mycobactéries

Il s'agit de bactéries appartenant au genre *Mycobacterium*. Ce sont des bacilles Gram +, immobiles, avec des éléments renflés et pratiquement jamais de ramification. Ils sont alcool-acidorésistants. Mycobactéries sont aérobies. Leur croissance est faible, généralement lente, par impossible sur les milieux de cultures ordinaires Certaines mycobactéries, en particulier les pathogènes, nécessitent l'emploi de milieux de culture spécifiques. Il existe des espèces saprophyte n'intervenant pas dans l'alimentation et quelques espèces pathogènes qui peuvent être transmises par certains aliments : viandes, lait cru (la contamination se fait habituellement

par voie aérienne), Il s'agit essentiellement des espèces *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis*, responsables de la tuberculose, maladie grave atteignant le système lymphatique, pulmonaire et/ou osseux. Leur propriété d'acido-alcool-résistance, liée à la présence d'acides mycoliques, de cires, et de «cord factor», sert de base à la méthode généralement employée pour leur recherche présomptive dans les produits alimentaires, et en particulier dans le lait cru. Cette propriété est mise en évidence par coloration spécifique d'un frottis préparé à partir de l'aliment : dans le cas du lait, il est préparé à partir d'un culot de centrifugation.

Des gastro-entérites (vomissements, diarrhées, crampes abdominales) provoquées par des *Actinomyces* ont été décrites à partir de consommation de gibier (très rare).

1.11. Bactéries sporulées aérobies

Ces bactéries appartiennent au genre Bacille (famille des Bacillaceae). Elles font généralement partie de la flore banale Gram + et contaminent de nombreux produits alimentaires. Les *Bacillus* sont des bacilles Gram + (les cultures âgées peuvent apparaître Gram -), généralement mobiles, aptes à la sporulation. Une spore, structure de résistance, se forme dans la cellule lorsque les conditions deviennent défavorables. La spore ne prend pas la coloration de Gram, elle est sphérique ou ovale, déformante ou non selon les espèces.

Les *Bacillus* sont caractérisés par l'aptitude à la sporulation et par une catalase positive. La présence de spores peut être directement mise en évidence par l'examen microscopique d'un frottis coloré par la méthode de Gram. Elles se présentent sous forme de particules endocellulaires sphériques ou ovales non colorées et réfringentes. Dans un cas douteux, une coloration spécifique peut être réalisée. L'aptitude à la sporulation peut aussi être mise en évidence par le test de thermorésistance. Les *Bacillus* présentent des types métaboliques variés et leur classification est complexe. Certains sont aérobies stricts, d'autres peuvent se développer en anaérobiose. On trouve un certain nombre d'espèces extrémophiles.

On les classe en groupes en fonction de la morphologie de la spore (étudiée par examen microscopique) ou en fonction de critères plus nombreux (classification numérique). Les *Bacillus* sont très répandus dans la nature, en particulier dans le sol et sur les végétaux : ils contaminent de nombreux produits alimentaires et sont souvent protéolytiques. En raison de

leur aptitude à la sporulation, ils résistent à des conditions défavorables et peuvent être des agents de dégradation de conserves alimentaires. Un des plus fréquents est *B. stearothermophilus*, agent du « flat-sour », mais on rencontre également d'autres espèces comme *B. coagulans*. Certains *Bacillus* sont impliqués dans des processus fermentaires (fermentation du cacao). *Bacillus thuringiensis* est pathogène pour les insectes et il est utilisé en lutte biologique.

Quelques *Bacillus* peuvent aussi être des agents d'intoxication alimentaire. *B. cereus* est une bactérie aéro-anaérobie thermophile (mais certaines souches peuvent se développer à 6°C) et lecithinase +. Il s'agit d'une espèce très répandue, fréquente dans le sol, sur les végétaux et en particulier céréales, la peau des animaux, etc. Elle est souvent impliquée dans des toxico-infections liées multiplication excessive dans l'aliment (de 10⁴ à 10⁷ germes par g). *B. cereus* produit cinq toxines (hémolysine, phospholipase C, murine cytolysine, toxine émétisante) et deux entérotoxines protéiques. Une des entérotoxines est le facteur diarrhéogène : elle a un PM 38 000-50 000, est cytotoxique, nécrosante, diarrhéogène, émétique et perturbe la perméabilité intestinale par activation de l'adényl cyclase. Cette toxine est thermosensible (30 minutes à 56 °C) et peut être détruite par la trypsine. L'autre entérotoxine (céréolysine) est émétique : elle a un PM 5 000, est thermorésistante (90 minutes à 126 °C) et elle est insensible à la pepsine et à la trypsine. Il existe deux grands types d'intoxications : une liée à l'ingestion de nombreuses bactéries et de toxines, l'autre à l'ingestion seulement de toxines. L'incubation est courte : respectivement 8 à 24 heures et 1 à 6 heures, voire 15 heures pour les deux cas. La maladie est relativement bénigne et de courte durée. Dans le premier cas, elle se manifeste comme une gastro-entérite avec crampes abdominales, diarrhée, vomissements (durée 1 à 2 jours), dans le deuxième cas, on observe surtout des vomissements et la durée est plus courte. Les aliments incriminés sont les viandes, les plats cuisinés, le lait et les desserts à base de lait, les pâtisseries, certains produits végétaux et souvent le riz cuit à l'avance. La contamination se fait à partir du sol ou de l'air et elle est fréquente. Il faut signaler aussi que *Bacillus cereus* peut être un agent de mammites chez la vache.

Une autre espèce est pathogène : il s'agit de *B. anthracis*, agent de la maladie du charbon. Cette bactérie très virulente n'intervient que d'une manière très exceptionnelle dans le cadre de l'industrie alimentaire. Elle possède une neurotoxine (neurotrope). Elle provoque l'anthrax intestinal (avec fièvre, céphalée, douleurs abdominales, vomissements sanglants, diarrhée) et

elle est parfois mortelle. Les rares cas décrits incriminent des viandes crues ou des charcuteries. *Bacillus subtilis* peut exceptionnellement produire une toxine (surfactine) qui provoque une gastroentérite. Les aliments qui ont été incriminés sont des volailles ou poissons. *Bacillus licheniformis* a été également impliqué, de même que *Bacillus brevis* et plus rarement *Bacillus pumilus*.

1.12. Bactéries sporulées anaérobies

Ces bactéries appartiennent au genre *Clostridium* (famille des Bacillaceae). Il s'agit de bactéries « telluriques » communément rencontrées dans le sol, les eaux d'égout et l'intestin. Elles peuvent contaminer et dégrader les produits alimentaires dans des conditions anaérobies (conserves). Il s'agit d'un genre hétérogène (GC varie de 21 à 55 %). Certaines espèces sont pathogènes. Les *Clostridium* sont des bacilles Gram +, souvent de grande taille, isolés ou en chaînette. Comme chez *Bacillus*, les cultures âgées peuvent apparaître Gram -. Ces bactéries sont généralement mobiles. Elles sont capables de sporuler ; la forme et la position de la spore ont une grande importance taxinomique. La spore ne prend pas la coloration de Gram, elle est centrale, subterminale ou terminale, déformante ou non. La résistance de la spore peut être importante (plusieurs minutes à 100 °C ou plus). Les *Clostridium* sont catalase - et anaérobies stricts. Cependant, quelques rares espèces sont aéro-tolérantes. L'oxygène est toxique par formation d'H₂O₂, d'oxygène «singlet, d'anion superoxyde, de radical hydroxyl et par réaction avec divers composés comme la ferrédoxine, les groupements thiols, les flavoprotéines, etc. (par contre, le potentiel redox ne l'est pas seul). Les *Clostridium* sont en général mésophiles et supportent des variations assez importantes de pH et de température : quelques espèces sont thermophiles. Ils se multiplient facilement sur les milieux ordinaires en anaérobiose, étant saccharolytiques ou protéolytiques selon les espèces et fréquemment gazogènes. Les *Clostridium* sont très répandus dans la nature ; ils contaminent de nombreux produits : eau, lait, viande, poisson, aliments fermentés ou congelés et surtout conserves alimentaires. Ils ont un grand pouvoir de dégradation vis-à-vis des sucres (dégradation des polysaccharides, des di et monosaccharides ; les sucres sont dégradés par la glycolyse ; le gluconate est dégradé par la voie d'Entner Doudoroff ; le glycérol est fermenté) et des protéines, libérant de l'acide butyrique ou de l'H₂S. Quelques espèces sont responsables d'intoxications ou gastro-entérites (*Cl. perfringens*) ou de graves intoxications souvent mortelles (*Cl. botulinum*).

La caractérisation des *Clostridium* est basée sur leur aptitude à la sporulation mise en évidence par le test de thermorésistance et la coloration spécifique des spores ainsi que sur leur caractère anaérobie (par culture sur gélose VF ou VL profonde) et catalase - Sur le plan industriel, les *Clostridium* sont classés en fonction de leur métabolisme et de leur action sur les substrats. C'est ainsi que l'on distingue :

- **Les *Clostridium* «saccharolytiques >>**

Ce sont des agents actifs de fermentation des glucides (glucose, saccharose, parfois mannitol, glycérol ou, amidon) qui produisent souvent de l'acide butyrique : on les appelle fréquemment *Clostridium* «butyriques ». Ils acidifient et coagulent le lait, ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'H₂S bien qu'ils soient très gazogènes. Il s'agit des espèces mésophiles *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. pasteurianum* et *C. tyrobutyrium* et de l'espèce thermophile *C. thermosaccharolyticum*. *C. aceticum* est homoacétique (glucose : 3acétate), *C. thermosaccharolyticum* produit du propanediol, du lactate et un mélange éthanol, acétate, H₂, CO₂.

- **Les *Clostridium* protéolytiques ou putréfiant**

Ce sont des agents très actifs de la dégradation des protéines. Ils sont peu fermentatifs, liquéfient la gélatine, digèrent généralement la caséine du lait avec ou sans coagulation et produisent souvent de l' H₂S ; ils sont cependant relativement peu gazogènes. Il s'agit des espèces *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. lentoputrescens*, *C. putrefaciens*, *C. nigrificans* (= *Desulfotomaculum nigrificans*), etc. L'espèce *C. botulinum* est souvent incluse dans ce groupe mais en raison de son extrême pathogénicité liée à la production d'une toxine, elle est fréquemment classée à part dans le groupe des *Clostridium* pathogènes dont recherche et l'identification sont essentiellement basées sur des méthodes sérologiques. De plus il existe des biotypes plutôt saccharolytiques.

- **Les *Clostridium* à la fois protéolytiques et saccharolytiques**

Ils liquéfient la gélatine, mais possèdent également une intense activité fermentaire. C'est le cas de *C. perfringens* et de *C. septicum*. Le lait n'est pas peptonisé après coagulation et de H₂S est généralement produit ; ces espèces sont très gazogènes. *C. perfringens* et les espèces voisines sont souvent appelées groupe des *Clostridium* «sulfito-réducteurs » car elles sont

capables de réduire le sulfite. Cette réaction est mise en évidence par formation de sulfure de fer dans un milieu contenant du sulfite de sodium et un sel de fer.

- **Quelques espèces ne sont ni protéolytiques ni saccharolytiques (*Clostridium* spécialistes)**

Elles n'intéressent pas l'industrie alimentaire. L'espèce *Clostridium botulinum* inclut un grand nombre de biotypes que l'on peut classer en différents groupes selon des critères biochimiques génétiques ou immunologiques. On distingue les *C. botulinum* protéolytiques (groupe I), les non protéolytiques (groupe II) et les espèces apparentées (groupes III et IV avec par exemple *Clostridium novyi*, agent du botulisme des oiseaux). Ces bactéries sont très répandues dans la nature, en particulier le sol et peuvent contaminer de nombreux produits ; elles sont très exigeantes au point de vue nutritif et souvent très oxygène-sensibles (anaérobiose stricte). Elles sont toxigènes, produisant les toxines botuliques (BoNT), agents du botulisme : ce sont des neurotoxines qui provoquent une paralysie flasque. Cette intoxication sévère est liée à l'ingestion de toxines synthétisées au cours de la croissance du germe dans un aliment. Exceptionnellement, l'ingestion de bactéries ou de spores peut provoquer une toxi-infection (production de toxines au niveau intestinal ; surtout chez l'enfant). Des souches de *Clostridium* appartenant à d'autres espèces pourraient parfois être incriminées (*C. butyricum*), ce qui impliquerait la possibilité d'un transfert interspécifique exceptionnel du pouvoir toxique ! La toxine botulinique est un des poisons les plus violents connus ($DL_{50} = 10^{-8}$ mg chez la souris) : sa mortalité est élevée malgré les diverses thérapeuties utilisables, en partie parce que l'apparition des symptômes est tardive : l'incubation peut durer 6 jours. Sept types de neurotoxines (A, B, C, D, E, F et G) ont été identifiés sur des bases immunologiques. Les

Souche peuvent être classées en fonction de la nature de toxine : en général, une souche produit donne de toxine. Les souches du groupe I produisent principalement les toxines A, B ou F celles du groupe II les toxines B, E ou C ; cependant certaines souches produisent deux neurotoxines (par exemple A et B). D'autres souches, appartenant aux types C et D, possèdent une entérotoxine ou toxine C2. On trouve également parfois une autre toxine (botulinolysine). Selon le cas, le déterminisme est plasmidique ou sous contrôle phagique. Les types A, B, E et F sont les plus fréquemment rencontrés dans le botulisme humain (B en France) : il existe une grande variabilité géographique. Les toxines botuliniques sont des polypeptides de masse moléculaire

élevée (150 KD), qui se fixent sur les jonctions myo-neurales des fibres cholinergiques du système nerveux périphérique où elles inhibent la libération de l'acétylcholine. Elles sont activées par une protéolyse qui libère deux sous-unités (modèle structural A-B). Elles provoquent des troubles nerveux très divers : céphalées, troubles de la vision, vertiges, vomissements, crampes abdominales, dysphagie, troubles respiratoires avec paralysie, etc. Les formes graves entraînant la mort sont fréquentes (fréquence variable selon les types ; pouvant atteindre 50 à 60 % en quelques jours). La plupart des cas mettent en cause des aliments de fabrication artisanale ou familiale. Le risque est très important pour les aliments peu acides (aussi bien viandes que légumes) en conditions anaérobies, notamment les conserves ayant subi un traitement thermique insuffisant, mais aussi les produits séchés, fumés, salés, conservés sous graisse, etc. Les aliments acides, de pH inférieur à 4,5, ne sont pas dangereux car ils ne permettent pas le développement de la bactérie et la toxinogénèse. L'acidification, un salage correct, l'addition de nitrite etc., permettent d'inhiber la germination des spores et la croissance. Les toxines botuliniques sont dénaturées par la chaleur de l'ordre d'une heure et demie à 80 °C et quelques secondes à 100 °C), ce qui rend les aliments correctement cuits peu dangereux. L'élimination des spores requiert un traitement plus important. Celles de types A et B sont les plus résistantes. Pour les conserves, il faut absolument respecter un bon barème de stérilisation (capable de réduire totalement une population de 10^{12} spores).

Clostridium perfringens est une bactérie saprophyte du sol et des eaux, commensale de l'homme et des animaux (peau). On la trouve dans de très nombreux produits, mais surtout dans des produits carnés cuits, des plats cuisinés à l'avance, très souvent en restauration collective. Elle est relativement thermophile (croissance à 46 °C) et thermorésistante. Sa spore lui permet de résister à des conditions défavorables, en particulier la cuisson. Son caractère anaérobie strict limite sa croissance dans certains aliments mais la favorise pour d'autres : conserves, aliments cuits (où la cuisson réduit le taux d'oxygène). Cependant, contrairement à d'autres *Clostridium*, elle tolère la présence de petites quantités d'oxygène, elle est lécithinase +.

Il existe une centaine de sérotypes. *Clostridium perfringens* produit différents types de toxines : deux entérotoxines, cinq hémolysines (toxines α , β , γ , δ , θ dont une lécithinase et une cardiotoxine), une collagénase (toxine κ), une protéase (toxine λ), d'autres substances toxiques (ϵ , μ , ν , ι , etc.). Il existe plusieurs types de la première entérotoxine ou exotoxine : ce sont les protéines A, B, C, D, E et F, de PM 35 000 qui permettent de définir les biotypes (sérotypes)

toxiques. La toxine interfère avec la production d'énergie, inhibe les synthèses protéiques et nucléiques et elle est entérocytotoxique. Les types A, C et D sont principalement pathogènes pour les humains, les toxi-infections les plus fréquentes résultant de la prolifération de *Clostridium perfringens* type A. La deuxième entérotoxine se rencontre chez certaines souches (types A et C principalement) : elle est assez peu cytotoxique, sa production est liée à la sporulation et elle est en général produite directement dans l'intestin (cependant on peut en trouver de faibles concentrations dans les aliments).

Les toxi-infections à *Clostridium perfringens* représentent une grande proportion des troubles d'origine alimentaire. Une charge microbienne au moins égale à 10^8 germes par g est nécessaire pour déclencher la toxi-infection qui est surtout provoquée par les aliments à cuisson lente (viandes, plats cuisinés) ce qui induit la germination des spores et le développement bactérien si la température reste élevée. La contamination provient du sol, de l'air, d'eau polluée ou de fèces. L'incubation est de durée variable : de 2 heures à quelques jours. Les symptômes de la maladie sont des douleurs abdominales, une diarrhée, et parfois des vomissements et de la fièvre. Par ailleurs, *Clostridium perfringens* serait responsable d'un nombre non négligeable d'appendicites, ainsi que de l'entérite nécrosante (type C qui possède une nécrotoxine) qui se manifeste par des douleurs abdominales et une diarrhée, peut évoluer en gangrène et être mortelle. *Clostridium difficile* est responsable de la colite pseudo-membraneuse. Cette espèce possède une entérotoxine et une cytotoxine. Sa transmission alimentaire est controversée.

2. LES CHAMPIGNONS

Les champignons microscopiques (mycètes) sont des eucaryotes et se divisent en deux groupes : champignons unicellulaires ou Levures et les champignons pluricellulaires filamenteux ou Moisissures.

2.1. Moisissures

Les moisissures sont des champignons multicellulaires filamenteux hétérotrophes : certains vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres encore sont saprophytes qui se développent sur des déchets organiques ou contaminent les produits alimentaires. Ils sont non photosynthétiques et immobiles. Leur corps ou thalle est composé de deux parties : le mycélium (ensemble de plusieurs filaments appelés hyphes) et les

spores. Elles sont acidophiles (pH compris entre 3 et 7), mésophiles (20 à 30 °C) et d'autres sont psychrotrophes (< 15 °C). Le cytoplasme limité par une membrane cytoplasmique, contient des ribosomes, des mitochondries, des vacuoles et un ou plusieurs noyaux. La paroi qui constitue la forme est très riche en cellulose et en chitine. Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques, lipolytiques) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes).

La classification est fondée sur des caractères purement morphologiques ; les moisissures sont divisées en quatre subdivisions principales :

❖ **Zygomycetes** possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée. Ils se subdivisent en *Oomycetes* à sexualité hétérogamique à spore sexuelle endogène et à spore flagellée ; et en *Zygomycetes* à sexualité isogamique, spore exogène et spore végétative non flagellée ;

❖ **Ascomycetes** sont caractérisés par la formation endogène des spores contenues dans l'asque. Ils se subdivisent en *Hemiascomycetes* dont les asques sont libres correspondent à des levures et en *Plectomycetes* dont les asques sont groupés dans des réceptacles ;

❖ **Basidiomycetes** sont caractérisés par la formation exogène des spores portées par la baside. Ils se subdivisent en *Hemibasidiomycetes* qui correspondent aux champignons supérieurs dont la baside n'est pas cloisonnée ; et en *Protobasidiomycetes* dont la baside est cloisonnée qui sont des parasites des végétaux ;

❖ **Deuteromycetes** ou **Fungi imperfecti** ou **Adelomycetes** constituent un groupe très vaste qui rassemblent des champignons dont la sexualité est inconnue ou des variétés asexuées d'*Ascomycetes*. Ils sont classés en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Les *Aspergillus* et *Penicillium*, par exemple, ont une sexualité rare et sont fréquemment classés dans les *Adelomycetes*.

Les quatre facteurs les plus importants qui influent sur la croissance des moisissures sur les aliments sont les nutriments disponibles, le pH, la température et l'activité de l'eau. Le faible pH de nombreux fruits donne aux moisissures un avantage concurrentiel par rapport aux bactéries, mais on voit souvent une spécificité considérable dans les espèces de moisissures pouvant gâter les différents fruits. Ainsi, un moule bleu sur les pommes qui provoque une forte

altération est presque inévitablement *Penicillium expansum* et les moisissures vertes et bleues des agrumes sont généralement *Penicillium digitatum* et *P. italicum* respectivement.

Les basses températures inhibent normalement la croissance de nombreuses moisissures, mais il y a un nombre important qui se développe bien aux températures du réfrigérateur domestique. La croissance des moules bleus sur le fromage réfrigéré sera souvent la commune de *Penicillium*, les murs humides des chambres froides peuvent devenir noirs avec des croissances de *Cladosporium herbarum*. *Galactomyces geotrichum* est associé à l'altération d'un certain nombre d'aliments, il est également un très bon indicateur de baisse de l'hygiène dans une usine alimentaire ou une zone de préparation car il contamine souvent les lignes de traitement. Le gâteau riche aux fruits a une activité d'eau faible qu'il pourrait sembler être à l'abri de l'altération microbiologique, mais le moule *Wallemia sebi* peut se développer sur une large gamme de aw de 0.69 à 0.997 et produisent de petites colonies brunes qui peuvent être difficiles à repérer sur un aliment tel que des gâteaux aux fruits jusqu'à ce qu'elle atteigne le consommateur.

2.2. Levures

Les levures non seulement occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire, elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (bière, cidre, vin, fromage), mais elles contribuent aussi à la revalorisation des déchets agricoles et industriels et à la production des protéines. Cependant, elles jouent parfois un rôle négatif en contaminant et en dégradant les aliments ; certaines sont pathogènes pour l'homme et l'animal.

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires. La cellule ou thalle a une taille très variable selon les espèces : de 1 à 10 µm de large pour 2-3 ou 20-50 µm de longueur. Elles sont de forme sphérique, globuleuse, ovoïde, allongée et cylindrique. Il existe cependant des formes cellulaires caractéristiques : forme en bouteille et forme triangulaire. Dans certaines conditions de culture, les levures peuvent donner des formes mycéliennes (pluricellulaires).

La cellule est limitée par une paroi rigide représente près de 20% de son poids sec avec une membrane cytoplasmique et un très petit noyau. Elles sont haploïdes ou diploïdes ; la température optimale de croissance est entre 20 et 28 °C avec un maximum entre 35 et 47 °C.

Les levures se multiplient bien dans un milieu acide : pH = 4 à 4,5 avec un pH optimal de 4,5 à 6,5 et peuvent s'adapter à des pH plus extrêmes ou alcalins.

La classification des levures est naturellement une partie intégrante de celle des champignons. Elle est fondée, au moins au départ, sur des caractères morphologiques. Les levures appartiennent à trois classes : *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* et *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*).

❖ *Ascomycetes* (*Hemiascomycetes*)

Elles forment la famille de *Saccharomycetaceae* divisée en quatre sous familles :

a- *Schizosaccharomycetoideae* sont des levures à mycélium, le genre *Schizosaccharomyces* est alcooligène rencontré dans les brasseries.

b- *Saccharomycetoideae* possèdent des cellules bourgeonnantes et des spores non fusiformes. Cette sous famille regroupe de nombreuses espèces intéressant l'industrie alimentaire : *Saccharomyces* (Panification production vinicole), *Kluyveromyces* (production fromagère), *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Debaryomyces* et *Pichia* (altération) ;

c- *Nadsonioideae* à bourgeonnement bipolaire contient quelques espèces intéressantes appartenant au genre *Hanseniospora* ;

d- *Lipomycetoideae* à bourgeonnement et asque en sac avec un intérêt moindre sauf quelques espèces du genre *Lipomyces*.

❖ *Basidiomycetes*

Elles présentent une reproduction sexuée à basidiospores. Cette classe comporte peu de levures d'intérêt industriel (trois familles : *Filobasidiaceae*, *Sirobasidiaceae*, *Tremellaceae*).

❖ *Deuteromycetes* ou *Fungi imperfecti* (levures sans sexualité)

Elles constituent la famille des *Cryptococcaceae* qui est divisée en quatre sous familles :

a- *Cryptococcoideae* sont des levures à cellules bourgeonnantes ne forment pas d'anthrospores et n'ont pas de pigments. Cette sous famille contient des genres importants : *Brettanomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Loeckera* dont les espèces sont des agents de fermentation, contaminants ou sources de protéines ;

b- *Rhodotoruloideae* (*Rhodotorula*) sont pigmentés ;

c- Trichosporoideae (Trichosporon) forment des arthrospôres. Ce sont des contaminants fréquent ;

d- Sporobolomycetoideae qui contient peu d'espèces. Quelques espèces appartenant au genre *Sporobolomyces* sont parfois des contaminants des aliments.

Il existe plusieurs espèces d'altération des produits alimentaires :

✓ La liste des produits gâtés par *Zygosaccharomyces*, *Torulasporea* et les genres décrits récemment *Zygotorulasporea* et *Lachancea* désignés collectivement comme complexe de *Zygosaccharomyces*, est resté relativement constant pendant de nombreuses décennies, et comprend généralement des aliments et des boissons à forte teneur en sucre. Comme des produits occasionnels à haute teneur en sel tels que la sauce soja.

La plupart des autres espèces du complexe de *Zygosaccharomyces* gâtent souvent les aliments et les boissons, mais beaucoup se retrouvent dans des produits dont la concentration de sucre est légèrement inférieure ;

Les espèces de *Saccharomyces* montrent une diversité considérable dans les habitats, certaines espèces étant associées aux fermentations alimentaires et aux boissons. Dans la plupart des cas, il s'agit de processus de fermentation avec des objectifs commerciaux positifs. Néanmoins, il existe de nombreuses occasions où la présence et la croissance des levures de *Saccharomyces* ne sont pas recherchées, et le résultat est l'altération du produit. Il est intéressant de noter que le type ou les souches représentatives de nombreuses espèces dans le genre ont été isolées à partir d'aliments ou de boissons (*S. barnettii*, *S. castellii*, *S. cerevisiae*, *S. dairenensis*, *S. exiguus*, *S. pastorianus*, *S. turicensis*, *S. unisporus*) ;

✓ Les espèces du genre *Candida* : *C. famata*, *C. pelliculosa*, *C. valida*, *C. colliculosa*, *C.*

kefyr et *C. krusei* apparaissent parmi les espèces les plus répandues et fréquentes, mais leur répartition varie selon les différents types d'aliments. *C. famata* peut être prédominant dans les produits à base de viande, *C. pelliculosa* et *C. krusei* dans les aliments acides, *C. kefyr* dans les produits laitiers, *C. colliculosa* dans les aliments à faible activité de l'eau et *C. valida* dans les boissons ;

✓ Les principales espèces d'altération de fruits sont *Hanseniaspora* et *Kloeckera*, en plus de *Caesalpinia* : *C. pulcherrima*, *C. membranifaciens*, *C. stellata*, *C. famata* sont parmi les résidents normaux de nombreux fruits. Les espèces *Basidiomycètes* (*Rhodotorula*,

Sporobolomyces) dominant la population de levures sur les légumes crus, et les levures Ascomycétales sont représentées principalement par des espèces à faible fermentation, telles que *Candida* : *C. krusei*, *C. valida*, *C. pelliculosa*, *C. lambica* ;

✓ Les levures du genre *Brettanomyces* ont été décrites pour la première fois comme responsables d'une fermentation lente de la bière avec la production de saveurs fortes typiques.

2.2.1. Fermentation alcoolique

Provoquée par les levures (essentiellement des *Saccharomyces*), cette fermentation intervient dans la fabrication du vin, de la bière, du cidre et de diverses boissons fermentées. Son but est essentiellement la production d'éthanol, mais de nombreux produits intervenant dans les qualités organoleptiques sont aussi formés. Il se constitue fréquemment des alcools supérieurs à partir d'acides issus de la désamination d'acides aminés contenus dans le milieu. Il y a aussi formation d'acides gras, d'esters, d'aldéhydes et de cétones. La teneur en alcool assure la stabilité du produit dans des conditions de stockage appropriées. Les souches et les techniques utilisées varient d'un produit à l'autre. Il faut noter que de nombreux sucres sont fermentescibles en éthanol par la levure, ce qui est utilisé pour la production de l'éthanol industriel et envisagé pour la production carburant à partir de déchets ou de productions agricoles. L'intervention de bactéries pour la production de boissons alcoolisées ou d'éthanol marginale (*Zymomonas*).

La fermentation alcoolique est aussi utilisée boulangerie : dans ce cas, le facteur essentiels la production de CO₂, qui fait lever la pâte.

2.2.2. Métabolisme respiratoire

La respiration aérobie génère de l'ATP en décomposant le glucose et l'oxygène en dioxyde de carbone et en eau. La respiration aérobie et anaérobie commence par la glycolyse, qui ne nécessite pas d'oxygène. La glycolyse décompose le glucose en pyruvate, ce qui donne de l'ATP.

Oxygène + glucose → dioxyde de carbone + eau + énergie

2.2.3. Nutrition physiologique

Quotient respiratoire $Q_r = V'CO_2 / V'O_2$

Ce paramètre est assez remarquable. Il permet de déterminer assez finement dans quelle filière énergétique on se trouve. Le quotient respiratoire (Q_r) doit être mesuré en état stable, conditions standardisées (à jeun).

Le quotient respiratoire (Q_r) est le rapport CO_2 dégradé / $V'O_2$ absorbé.

CHAPITRE II : INFLUENCE DES TECHNIQUES DE LA FABRICATION SUR LES MICROORGANISMES (TRAITEMENTS APPLIQUES AUX PRODUITS ALIMENTAIRES)

1. Destruction de la flore de fabrication sur les microbes

Pour qu'un aliment soit sain et de qualité (non dangereux pour la santé, doté de bonnes qualités nutritionnelles et commerciales), il est nécessaire d'utiliser des moyens préventifs et le cas échéant curatifs.

Au niveau préventif, il faut utiliser des matières premières saines et répondant à un cahier des charges strict, et éviter les contaminations au cours des traitements technologiques et de la conservation. L'information des manipulateurs est fondamentale : elle permet de les sensibiliser aux problèmes d'hygiène. Des mesures préventives doivent être prises au niveau de la conception et de l'organisation : aménagement des locaux, choix du matériel (facilité de nettoyage), propreté et nettoyage, standardisation des techniques de fabrication, choix et préparation des matières premières, qualité des fluides, lutte contre les vecteurs de contamination, choix et formation du personnel, etc.

Au niveau curatif, il existe des moyens technologiques nombreux et variés qui permettent selon le cas de stabiliser ou de détruire une flore néfaste. Il est évident que la stabilisation ne concerne que la flore banale à l'exclusion des germes pathogènes qui doivent être détruits. Le choix entre stabilisation et stérilisation dépend du danger potentiel représenté par l'aliment. Quand les conditions ne permettent pas la survie et le développement de germes pathogènes, la stabilisation est utilisable. Lorsque c'est possible, il est toujours préférable d'éliminer les microorganismes par une méthode physique (lavage, filtration, centrifugation), ce qui évite de devoir les stabiliser ou les détruire la destruction laisse persister des « cadavres » ou des débris, ou ce qui facilite ces opérations.

Les contrôles microbiologiques sont indispensables à tous les stades, tant au niveau de la fabrication que du produit fini.

L'utilisation d'agents antimicrobiens permet de contrôler le développement des microorganismes, et plus particulièrement des microorganismes pathogènes et (ou) des microorganismes responsables des phénomènes de dégradation des produits alimentaires.

Les moyens de lutte contre les microorganismes sont très nombreux et peuvent être schématiquement classés en :

- Agents physiques (température, rayonnements, etc)
- Agents chimiques (leur activité et leur nocivité s'appliquent aussi bien aux cellules microbiennes qu'aux cellules humaines ou animales)
- D'autres agents au pouvoir de toxicité sélective ; ils s'opposent par exemple à la multiplication microbienne sans nuire aux cellules de l'hôte. Cette propriété permet leur utilisation en thérapeutique.

La destruction d'un micro-organisme est un phénomène mettant en jeu des réactions complexes. Comme nous l'avons vu plus précédemment, ces réactions varient en fonction de la nature du microorganisme, de son état physiologique et de la «dose » utilisée (concentration d'un produit chimique, temps d'exposition, etc.). La loi de destruction suit une cinétique d'ordre 1 (loi exponentielle) : $dN/dt = -KN$ ou $N_0 = N e^{-kt}$ (cette loi s'applique dans la plupart des cas y compris pour des traitements mécaniques comme la filtration) La charge initiale en microorganismes est un élément très important et l'efficacité du traitement sera améliorée si cette charge est faible. Ceci est obtenu par une bonne qualité des matières premières, la limitation des contaminations et éventuellement un traitement d'élimination.

La notion de stérilité peut s'appliquer à des situations différentes. La stérilité stricte ou stérilité biologique traduit l'absence de toute forme vivante ou revivifiable. Dans certains cas, un aliment est considéré comme stérile s'il ne contient que des formes non revivifiables (par exemple spores incapables de germer dans les conditions du milieu) : on parle parfois dans ce cas de stérilité commerciale »

En fonction des traitements subis, les aliments sont classés en «gammes » :

- I^e gamme : produits crus,
- II^e gamme : produits congelés,
- III^e gamme : conserves classiques,
- IV^e gamme : produits crus préparés conservés au froid,
- V^e gamme : produits cuits conservés au froid.

Les principaux traitements sont classables en traitements d'élimination, de destruction et de stabilisation. Ne sont évidemment utilisables dans l'industrie alimentaire que les traitements qui n'entraînent pas de toxicité pour l'aliment. Ce problème, qui se pose peu pour les traitements physiques, est beaucoup plus aigu pour les traitements chimiques ou biochimiques. L'addition de produits chimiques (agents de traitement ou conservateurs alimentaires) est sévèrement réglementée.

L'élimination des micro-organismes d'un aliment peut être obtenue par des procédés mécaniques. Le lavage est très couramment utilisé (parfois couplé à une action antimicrobienne dans le cas de l'eau chlorée) aussi bien pour des produits que pour le matériel. Pour les produits, il peut être réalisé de plusieurs façons : trempage, brassage, aspersion, brossage, etc. La décantation, éventuellement après un traitement de floculation, et la centrifugation (bactofugation) permettent de diminuer la charge microbienne de produits liquides : ils sont utilisés respectivement pour l'eau et le lait. La filtration est employée pour le nettoyage ou la stérilisation de produits liquides et pour le nettoyage de l'air pendant la fabrication ou le stockage : elle nécessite l'emploi de filtres adaptés aux produits et aux micro-organismes à éliminer (diamètre des pores).

L'avantage majeur de ces procédés est de ne pas altérer les qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit traité, même s'il est « fragile » et de favoriser l'efficacité de traitements ultérieurs.

L'utilisation de la chaleur est un procédé de destruction des microorganismes très répandu. La cuisson, l'ébullition et le blanchiment sont des procédés très anciens, auxquels il faut rajouter les processus industriels de pasteurisation et stérilisation, appertisation » (terme utilisé anciennement pour les conserves), tyndallisation (succession de pasteurisations, peu utilisée dans l'industrie), etc. Il faut rappeler que la résistance à la chaleur d'un microorganisme dépend de divers facteurs intrinsèques : espèce, caractère sporulé ou non (bactéries), concentration, âge, « vie antérieure » : elle dépend aussi de facteurs extrinsèques : composition du milieu, conditions de culture (pH, a_w température, etc.). La résistance des levures est plus grande sous forme sporulée (spores sexuelles), de même que pour les moisissures ou les spores végétatives (conidies) et sexuelles ainsi que les sclérotés sont plus résistants que le mycélium. L'action dénaturante de la chaleur suit la loi d'Arrhénius : $k=A e^{-E_a/RT}$. D'après cette loi, on voit que si

T augmente, cela réduit le temps de traitement. Pour les traitements thermiques, on dispose d'une gamme importante de couples temps/température. Le choix se fait en fonction du but recherché (nature et niveau de la flore à éliminer et de la flore tolérée) mais aussi de la composition de l'aliment et de la sensibilité de celui-ci au traitement (en particulier au niveau des vitamines). Dans cette optique, on choisit un couple éliminant le mieux les microorganismes en respectant les composés fragiles : on utilise les courbes donnant k en fonction de la température. Le résultat recherché est obtenu en général en augmentant la température et donc en réduisant le temps.

❖ Pasteurisation

La pasteurisation est un traitement qui permet en principe la destruction des formes végétatives des microorganismes pathogènes ou responsables d'altérations mais pas des spores (alors que la stérilisation permet celle des formes sporulées). En réalité, la pasteurisation se fait parfois dans des conditions éliminant de manière certaine les microorganismes pathogènes (*Staphylococcus*, *Salmonella*, etc.) mais pas forcément toutes les formes végétatives : certaines, thermorésistantes, peuvent survivre au côté de formes sporulées. Il est nécessaire d'utiliser un traitement de stabilisation pour la conservation du produit pasteurisé (cas du lait pasteurisé conservé au froid). Elle s'applique dans divers cas : lait, vinaigre, vin, bière, jus de fruit, etc.

La pasteurisation a été au départ généralement pratiquée à des températures inférieures à 100°C, mais elle a évolué vers une baisse du temps et une élévation de température. Ainsi on est passé de la «pasteurisation basse» (30 minutes à 63 °C) à la «pasteurisation haute» (90 °C quelques secondes) ou «ultra haute UHT» (température supérieure à 100 °C quelques secondes ou fractions de secondes) : lorsque la température devient très élevée (140 °C), il ne s'agit plus d'une pasteurisation, mais d'une véritable stérilisation. L'ébullition est un traitement couramment pratiqué, qui peut être considéré comme une «super pasteurisation³³» Elle ne détruit pas les formes sporulées et il est souvent constaté que dans ces conditions la germination des spores est favorisée au cours du refroidissement.

Il faut signaler que la thermisation, traitement de 15 à 20 secondes à 63-65 °C qui se pratique sur le lait, n'est pas une pasteurisation : il y a seulement réduction de la charge microbienne (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Barèmes de pasteurisation (Leyral et Vierling, 2007).

Denrée	Température et temps nécessaires
Lait	30 min à 62 °C ou 15 s à 72 °C
Crèmes/Crèmes dessert	30 min à 71 °C ou 16 s à 20 s à 82 °C
Jus de pommes en bouteilles	30 min à 77 °C
Boissons gazeuses à base de jus de fruits	30 min à 66 °C
Bière	1 à 2 min à 82-88 °C

❖ Stérilisation

La stérilisation par la chaleur consiste à exposer les aliments à une température, généralement supérieure à 100 °C, pendant une durée suffisante pour inhiber les enzymes et toute forme de microorganismes, même les bactéries sporulées (destruction des microorganismes d'une denrée de manière à éviter la dégradation de ses qualités sanitaires avec le temps).

La stérilisation de l'aliment et de son contenant peut être réalisée de deux façons :

- **Appertisation** : Stérilisation simultanée du contenant et du contenu

- Appelée aussi Pasteurisation dans l'emballage, L'appertisation est un procédé de conservation qui consiste à stériliser par la chaleur des denrées périssables dans des contenants (boîtes métalliques, bocaux, etc.) hermétiquement fermés.

- **Stérilisation séparée du contenant et du contenu**

- Appelée aussi Pasteurisation en vrac, Dans ce cas, le produit alimentaire (le contenu) est stérilisé, par traitement thermique, avant d'être renfermé dans son contenant. Ce dernier est aussi stérilisé, soit par la chaleur, soit par d'autres procédés (par ultra-violet par exemple), mais avant de contenir le produit. Ensuite, le contenu stérilisé est fermé hermétiquement dans son emballage (contenant), aussi stérilisé. L'opération de conditionnement se déroule dans une enceinte qui empêche la contamination du produit par les microorganismes de l'environnement : C'est le conditionnement aseptique. Cette technique est utilisée généralement pour la conservation des produits liquides (lait, jus, etc.) dans des emballages qui ne peuvent supporter l'appertisation comme les sachets en plastique et les cartons.

Lorsque la stérilisation du produit est réalisée à haute température (135 °C à 150 °C) pendant une courte durée (15 sec. à 1 sec.), on parle de stérilisation UHT (Ultra

Haute Température). Cette technique a l'avantage de préserver la qualité organoleptique et nutritionnelle du produit stérilisé. Cependant, elle ne peut être utilisée que dans le cas des produits liquides comme le lait (Piar et Lanoisellé, 2000).

La stérilisation par la chaleur est très utilisée dans l'industrie de la conserve. Les paramètres du traitement thermique sont différents selon la nature du produit : ainsi les conserves dont le pH est inférieur à 4,5, théoriquement moins dangereuses (conditions défavorables aux pathogènes) subissent un traitement moins important que les autres. Traditionnellement, l'industrie de la conserve utilise les paramètres suivants :

- **Temps de destruction** : pour une charge donnée à température donnée ;
- **Température de destruction** : pour une charge donnée et un temps de traitement donné ;
- **Paramètre D** : temps nécessaire pour détruire 90 % de la population initiale à une température donnée dans un milieu défini (temps de réduction décimale ou t_{10}). A titre d'exemple, les valeurs D (en minutes) pour les spores de quelques bactéries importantes en industrie alimentaire sont à 120 °C : 0,1 à 0,2 pour *Clostridium botulinum* A ; 0,1 pour *Bacillus coagulans*; 3 à 4 pour *Clostridium thermosaccharolyticum* et 4 à 5 pour *Bacillus stearothermophilus*;
- **Paramètre Z** : écart de température (nombre de degrés nécessaires pour que D varie d'un facteur 10 (et qui permet par exemple de réduire de 90 % la durée du traitement pour un même niveau d'efficacité). Z est exprimé habituellement en °F pour la stérilisation et en °C pour la pasteurisation ;
- **Paramètre F ou V_s** : temps nécessaire à 121 °C pour détruire des spores ou des formes végétatives données (valeur stérilisatrice). En général, le niveau de réduction N_0/N choisi est $10^{12}/1$ pour les spores de *Clostridium botulinum* (dans ce cas $F = 2,5$ minutes) ;
- **Paramètre V_p** : temps nécessaire à 70 °C pour détruire des formes végétatives données (valeur pasteurisatrice). Le niveau de réduction N/N choisi varie avec le microorganisme choisi (généralement *Enterococcus faecalis*).

La pénétration de la chaleur est variable en fonction du produit (nature, Viscosités), de l'emballage (nature, forme, taille, rotation ou non, etc.), de la température initiale et il faut en tenir compte. La détermination des paramètres d'un traitement thermique nécessite la connaissance de la courbe de « mort thermique » et de celle de la pénétration de chaleur (courbe de chauffage) : on peut utiliser une méthode graphique ou un calcul.

❖ **La tyndallisation**

Est un traitement thermique équivalent à des pasteurisations répétées, séparées par des intervalles de 12 à 24h à des températures de 30 à 40°C. Au cours de la pasteurisation, seules les formes végétatives sont inactivées tandis que dans les intervalles, la plus part des spores thermorésistantes germent et sont sensibles à la pasteurisation suivante. Ce procédé est utilisé pour les milieux de culture fragiles. Cette opération, consiste à chauffer le milieu 60°C ou 70°C durant 30 minutes ou 1 heure, trois fois consécutives, en ménageant un intervalle de 24 heures entre chaque chauffage.

❖ **La Thermisation**

C'est une forme amoindrie de pasteurisation. Son objectif principal est la destruction des bactéries pathogènes qui pourraient se trouver dans le produit, sans modifier autant ses caractéristiques technologiques. La thermisation est un traitement thermique appliqué au lait cru.

❖ **Chaleur sèche**

Le matériel à stériliser est placé dans un four électrique ou à gaz (fours Pasteur, Poupinel) à 180°C pendant 1 heure ou de 160°C durant 2 à 3 heures. Il y a oxydation des constituants cellulaires et dénaturation des protéines. Elle ne corrode pas les verreries, les instruments métaux chirurgicaux et permet la stérilisation des poudres et huiles.

2. Facteurs chimiques (antiseptiques, fongicides, antibiotiques)

Il faut distinguer les produits microbicides qui agissent par destruction (mort) des germes et les produits microbiostatiques qui agissent sur le développement (stabilisation). Ces produits sont utilisés soit au cours de la fabrication, soit dans le produit fini. Dans le premier cas, il s'agit souvent de produits microbicides, dans le second, de produits microbicides ou stabilisants. Ces agents ne doivent pas rendre le produit toxique et ne doivent pas avoir de conséquences néfastes

au point de vue organoleptique et nutritif. L'utilisation de composés qui sont détruits après action peut être intéressante. Des produits chimiques sont utilisés aussi pour le nettoyage du matériel et des locaux (dérivés chlorés et iodés, savons et détergents, composés phénoliques, etc.).

L'emploi des produits antimicrobiens peut entraîner la sélection d'espèces et de souches résistantes. L'apparition de ces souches doit être contrôlée ; elle peut être évitée et au moins limitée par le choix judicieux du produit et de sa concentration. Il faut rappeler qu'au niveau du laboratoire, les antimicrobiens sont utilisés pour la sélection et le diagnostic de certaines espèces bactériennes ou d'autres microorganismes.

Le choix d'un agent désinfectant ou d'un additif antimicrobien est délicat. Plusieurs des conditions suivantes sont généralement requises : large spectre d'activité adapté à la flore du produit qui peut être spécifique, faible coût, absence totale de toxicité (selon le cas, utilisable à faible concentration, ou facilement éliminable par rinçage, ou ne laissant pas de sous-produits dangereux), absence de pouvoir corrosif, faible coût, facilité d'utilisation, etc. Il existe des textes réglementaires qui contiennent la liste des produits autorisés ; certains d'entre eux étant sujets à controverse, la législation varie selon les pays.

- Agents antimicrobiens utilisés en production

Les composés chimiques antimicrobiens sont très nombreux, mais tous ne sont pas utilisables. Leur activité antimicrobienne est variable : beaucoup ont des propriétés oxydantes, d'autres ont un pouvoir tensioactif, d'autres une action plus spécifique. Les plus courants qui sont employés (certains dans des conditions strictes) pour leurs propriétés microbicides (**désinfectants**) sont les suivants ;

- Composés chlorés (chlore gazeux, hypochlorite de sodium «eau de Javel », certaines chloramines, etc.). Ils ont un bon spectre d'activité, ils sont faciles à employer et de faible coût : cependant leur utilisation dans certaines circonstances commence à être controversée ;
- autres halogènes comme l'iode ou le brome. Ils sont difficiles à employer ;
- Acide peracétique : très actif et non toxique, il est de plus en plus employé ;
- peroxyde d'hydrogène (à 30-35 %). Il est parfois utilisé en aérosol pour les surfaces (0,02 ml/100 cm²) ou pour stériliser les emballages ;

- ozone, anhydride sulfureux, détergents (dont les ammoniums quaternaires), oxyde d'éthylène, etc.

3. Stabilisation de la flore

a - Facteurs physiques (froid, congélation, lyophilisation)

Le froid est un bon agent de stabilisation des produits alimentaires. Le rafraîchissement ($\leq 15^{\circ}\text{C}$) est peu efficace.

❖ **La réfrigération** qui consiste à maintenir un produit alimentaire à une température proche de 0°C (0 à 4°C) empêche, en principe, la multiplication de la plupart des germes pathogènes mais pas celle des germes psychrophiles parmi lesquels on rencontre des agents d'altération et parfois des germes pathogènes (*Listeria*, *Yersinia*, *Campylobacter*).

❖ **La congélation** à -18°C et la surgélation (-40°C et même -80°C) permettent une stabilisation totale vis-à-vis des microorganismes et entraînent une mortalité plus ou moins importante selon la nature des germes, celle de l'aliment, la vitesse de refroidissement et la température de stockage. Le froid est très utilisé pour la conservation d'aliments crus ou préalablement traités. Cependant, la réfrigération peut favoriser l'implantation et le développement d'une flore psychrophile pouvant contenir des bactéries pathogènes (*Listeria*, *Yersinia*, etc.). Les conditions d'un bon traitement par le froid sont : l'application à un produit sain, la rapidité et la précocité, la continuité (pas de « rupture de la chaîne du froid »). L'action du froid en particulier de la réfrigération est limitée ; en effet, le froid ne fait que ralentir les processus : la conservation a donc une durée limitée (date limite de consommation).

❖ **La lyophilisation**

Sublimation de l'eau à froid ; c'est une méthode de dessiccation sous vide, à basse température, de produits liquides préalablement congelés (phase solide) par passage à la phase vapeur, sans passer par la phase liquide. Ce changement d'état s'appelle la sublimation (**Figure 1**).

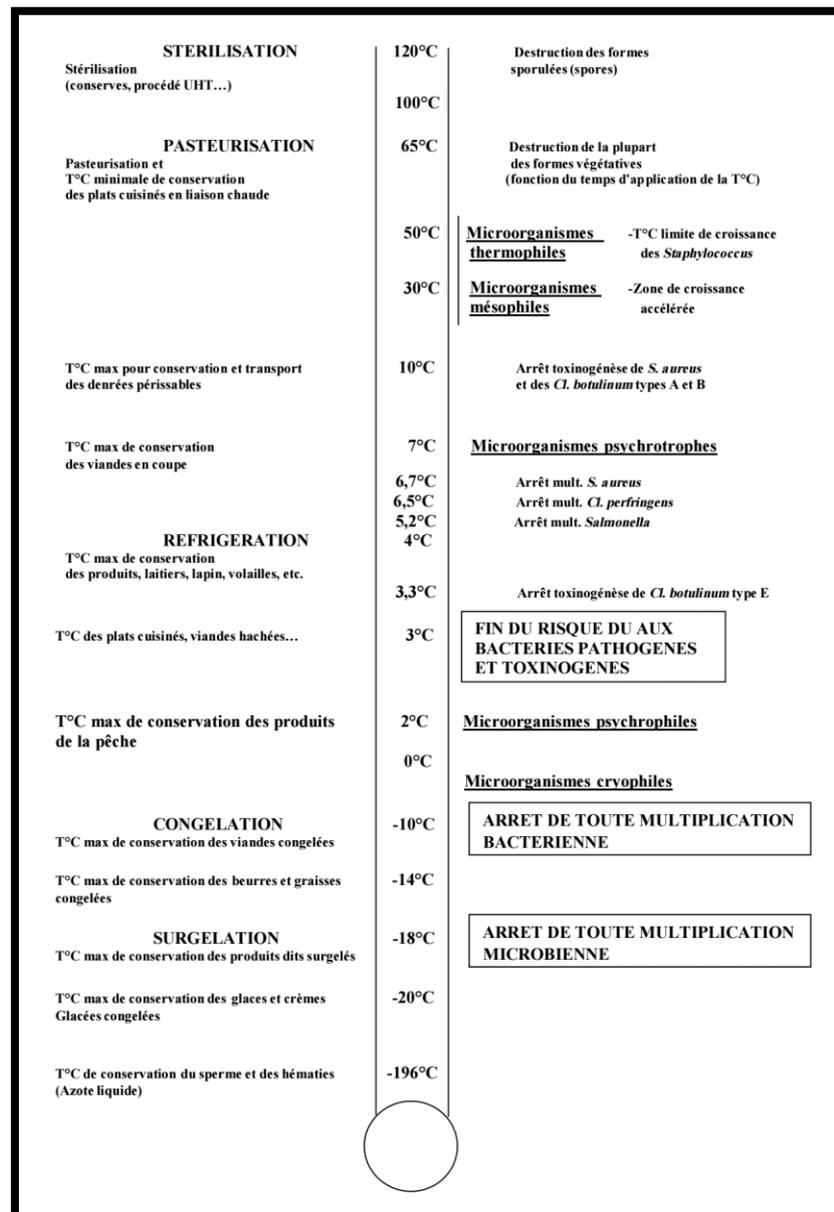


Figure 1 : Action de la T° sur les Microorganismes et leur métabolisme (Ait Abdelouahab, 2001).

❖ Radiations électromagnétiques et ionisantes

Certaines radiations sont utilisées pour détruire les microorganismes dans les produits alimentaires. Le terme « radiation ionisante » est un terme vague qui regroupe les radiations électromagnétiques (de l'UV aux rayons cosmiques) et corpusculaires (électrons β) qui sont capables d'arracher des électrons et donc d'ioniser les molécules. Le caractère ionisant des

radiations électromagnétiques est lié à l'énergie véhiculée et donc à la fréquence des rayonnements.

Les rayonnements ultra-violet (10 à 400 nm) sont peu pénétrants : relativement pratiques, ils sont utilisables pour réduire la charge microbienne d'atmosphères, de surfaces, de couches liquides minces. Appliqués au traitement des eaux, ils ne conduisent qu'à des résultats passables (en raison surtout de leur très faible pénétration : quelques mm). Les rayonnements γ (0,1 à 0,01 nm) sont assez utilisés : ils ont une bonne action antimicrobienne et permettent une pasteurisation ou une stérilisation à froid. Les rayonnements X sont par contre rarement employés, de même que les radiations particulaires (par exemple β) qui sont coûteuses et d'emploi difficile. Les rayonnements B sont produits par des accélérateurs de particules. L'énergie est liée à la masse et la vitesse ($W = 1/2 m v^2$).

L'action antimicrobienne des radiations est liée à la dénaturation des acides nucléiques dont l'hydrolyse partielle ou la formation de liaisons entre bases (dimérisations en particulier) perturbe l'expression. Le même mécanisme entraîne l'inactivation des virus et des insectes ainsi que celle de la germination. L'activité sur les micro-organismes est fonction de la dose de radiations absorbées (puissance et temps). Des facteurs environnementaux peuvent influencer la radiorésistance des micro-organismes : composition du milieu, oxygène, température, etc. La cinétique de destruction suit la loi classique. Comme pour la température, on utilise la notion de dose de réduction décimale. Une dose de 0,03 à 3 KGy permet l'inhibition de la germination végétale et la désinsectisation. L'élimination de la plupart des germes pathogènes comme *Salmonella* ou *Listeria* (radicisation) et des germes d'altération comme les *Pseudomonas* (radurisation) requiert des doses de 1 à 6 KGy (comparables à la pasteurisation), celle des spores, virus et certains pathogènes résistants (*Staphylococcus*) des doses de 10 à 50 KGy (radappertisation comparable à la stérilisation). Dans ce dernier cas, les altérations du produit sont importantes.

Les radiations ionisantes ont des effets sur la plupart des constituants de l'aliment : eau (formation de radicaux peroxydes et autres radicaux oxydants qui oxydent lipides, vitamines A, C, E et B, acides aminés, etc.), amidon, pectine, cellulose (dépolymérisations), protéines (hydrolyse de liaisons peptidiques et production de composés soufrés si haute dose). Ceci peut se traduire par des modifications des qualités organoleptiques, mais en général il n'y a pas

d'altération des qualités énergétiques et nutritionnelles. Les enzymes endogènes ou exogènes et les toxines microbiennes sont peu sensibles. Malgré leur apparente innocuité, l'emploi des radiations ionisantes est réglementé : leur utilisation antimicrobienne est limitée à des produits déshydratés (végétaux) ou congelés et à certains produits laitiers (camembert) ou carnés (découpes de volailles).

❖ Autres radiations

Les micro-ondes, également de nature électromagnétique, entraînent l'agitation thermique de molécules polaires et en particulier de l'eau. L'élévation de température de l'eau intracellulaire entraîne la mort des micro-organismes : les formes végétatives sont plus sensibles que les sporulées.

Les radiations soniques ont des effets antimicrobiens à de faibles longueurs d'onde (ultra-sons). Elles sont peu utilisées dans l'industrie. Des radiations chauffantes (radio-fréquences, micro-ondes soniques) sont utilisables dans des cas particuliers. Des champs électriques ou magnétiques pulsés, ainsi que la lumière pulsée sont utilisables pour la désinfection de surface des aliments et la pasteurisation à froid des liquides (société Pure Pulse) (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Actions des radiations sur les microorganismes (Cuq, 2007)

Microorganisme	dose (KGy)	Microorganisme	dose (KGy)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,8 - 1,9
<i>Lactobacillus</i>	0,1 - 0,2	<i>Clostridium botulinum type E</i>	1,2 - 3
<i>Escherichia coli</i>	0,15 - 0,3	Spores de <i>Cl. botulinum</i>	3,5 - 5
<i>Shigella sp</i>	0,25 - 0,4	<i>Micrococcus radiodurans</i>	5 - 8
<i>Salmonella sp</i>	0,5 - 1	Levures	0,8 - 1,2
<i>Streptococcus faecalis</i>	0,75 - 1	Moisissures	0,4 - 1,3
<i>Moraxella</i>	0,8 - 1,3	Poliovirus	14

❖ Pression

Le traitement des aliments par hautes pressions est en développement. L'activité antimicrobienne est intéressante : des pressions de l'ordre de 100 à 300 MPa réduisent fortement le nombre de formes végétatives à température ambiante ; lorsque la pression atteint 800 MPa, il y a dénaturation des spores.

L'utilisation du CO₂, dans les traitements haute pression a été envisagée. Possédant une toxicité propre pour de nombreuses bactéries, ce gaz pourrait permettre l'utilisation de hautes pressions modérées (de l'ordre de 1 à 10 MPa) : ainsi *Listeria monocytogenes* est détruite à température ambiante par un traitement de 2 heures à 6 MPa.

❖ **Déshydratation**

Cette technique de stabilisation est très ancienne : elle est basée sur la baisse de l'activité d'eau du produit. Le séchage en général et l'atomisation (lait) font intervenir la chaleur. D'autres facteurs antimicrobiens peuvent interférer. Le séchage solaire (fruits, viandes, poissons) fait participer le rayonnement UV ; le fumage (viandes, poissons) combine l'action de la chaleur à celle des produits de pyrolyse (formol, acides organiques, acides pyroliques, alcools, cétones, phénols, crésols, etc.) ; de plus, il y a une action sur la saveur et la couleur. La lyophilisation (sublimation de l'eau à froid) est un procédé très utilisé qui conserve les propriétés de l'aliment (produits divers).

La plupart des procédés de séchage nécessitent le contrôle de la température, de l'humidité, de la turbulence de l'air, du temps, etc. Les produits à sécher doivent être choisis et préparés avec soin pour limiter la charge microbienne (lavage, blanchiment, éventuellement pelage), car le séchage ne fait souvent que stabiliser la flore et qu'il existe une microbiologie des produits secs avec des altérations possibles.

b - Facteurs chimiques (fongostatiques, bactériostatiques)

Les produits microbiostatiques ou microbicides susceptibles d'être ajoutés aux aliments sont qualifiés de conservateurs alimentaires. Un bon conservateur doit être bactéricide plutôt que bactériostatique ; il doit agir sur les levures et les champignons, il doit être actif sur les germes pathogènes et sur ceux responsables d'altérations, il doit être stable et inoffensif (absence de toxicité) et sans action sur la valeur nutritionnelle.

Les effets des conservateurs alimentaires peuvent être spécifiques (acides caprylique, déshydroacétique, sorbique et propionique, acide benzoïque et benzoates, nitrites, anhydride sulfureux, éthanol, antibiotiques, etc.) ou résulter de modifications de certaines propriétés de l'aliment comme le pH (acides acétique, citrique, formique, tartrique, lactique, etc.) ou l'activité de l'eau (chlorure de sodium, saccharose, etc.). L'adjonction de sel (salage ou saumurage) ou de sucre (confitures) modifie le goût de l'aliment et permet d'abaisser l'activité de l'eau à des

valeurs pour lesquelles seule une flore non dangereuse pour le consommateur est susceptible de survivre ou de se multiplier. Ainsi, une confiture ne permet la prolifération que des germes osmophiles, c'est-à-dire essentiellement des levures ou des moisissures. Le fumage, l'addition de vinaigre ou de certains acides organiques sont également susceptibles de modifier les qualités organoleptiques des aliments.

Parmi les moyens de conservation ne modifiant pas les qualités organoleptiques des aliments, on peut signaler les substances qui forment un écran entre le produit et le milieu ambiant : emballages en général, paraffine, gaz inertes (N, CO₂), etc. Les silicates alcalins sont utilisés pour conserver les œufs et des fruits et légumes. Le diphényle et l'orthophénylphénol sont réservés à la protection des fruits (agrumes) et légumes.

Les agents minéraux les plus utilisés sont le NaCl ou «sel » (dans de nombreux produits) ; les nitrates et nitrites de sodium ou de potassium (dans les charcuteries, où ils assurent une protection efficace contre les germes pathogènes et en particulier *Clostridium botulinum*) ; les composés soufres comme l'anhydride sulfureux et les sulfites (dans le vin, les produits végétaux, en particulier à base de fruits) ; l'eau oxygénée (utilisable potentiellement dans le lait), etc. Certains ont une utilisation controversée (eau oxygénée, sulfites dans les fruits et végétaux à l'état brut).

Parmi les agents organiques, les plus importants sont les **acides organiques** et leurs dérivés ;

- Acide acétique et diacétate (utilisé dans des sauces, des préparations de légumes, de poissons) ;
- Acide propionique (utilisé dans les fromages) (0,1 à 0,3 %) ;
- acide sorbique et sorbates (permet l'inhibition des moisissures dans les fromages, les fruits, les produits céréaliers cuits, etc.) (0,01 à 0,5 %) ;
- acide benzoïque et benzoates (utilisé pour les fruits) (0,05 à 1 %);
- esters de l'acide parahydroxybenzoïque (PHBA) comme les méthyl, éthyl et propyl esters (utilisés pour les fruits et les préparations de poisson); - acides lactique, citrique, tartrique, ascorbique, etc.

On peut citer également l'alcool éthylique, les antioxydants phénoliques (butylhydroxytoluène ou BHT, butylhydroxyanisole ou BHA), l'hexaméthylène tétramine (parfois utilisé pour des

fromages et le poisson), le diphényle (utilisé pour les agrumes de même que l'o-phénylphénol ou le thiabendazole), certaines enzymes (lysozyme, peroxydases), des protamines et des antibiotiques.

Les essences naturelles et les épices ont un pouvoir bactéricide lié à la présence de composés phénoliques, d'alcools, etc. et sont souvent remplacées par leurs composés actifs (eucalyptol, thymol, eugénol, etc.) utilisés comme conservateurs.

Quelques rares antibiotiques sont utilisés comme conservateurs alimentaires : la nisine, la subtiline, la tylosine, la pimarcine, les tétracyclines et la polymyxine (leur réglementation est différente selon les pays) :

- **Nisine** : c'est un polypeptide de trente-quatre acides aminés produit par *Lactococcus lactis* et actif sur les espèces Gram +. Soluble à pH 2, la nisine précipite à pH 7. Elle est utilisée dans les fromages pour prévenir la fermentation butyrique, ainsi que dans certains types de conserves

- **Subtiline** : c'est un polypeptide de trente-deux acides aminés produit par *Bacillus subtilis* et actif sur les bactéries Gram + et certaines Gram - Elle est stable de pH 2,5 à 7 ; son action sporostatique la fait utiliser pour prévenir le développement des *Clostridium pathogènes* dans les conserves ;

- **Pimarcine (ou natamycine)** : ce fongicide polyénique produit par *Streptomyces natalensis* est utilisé pour la conservation de fruits, jus de fruits, légumes et fromages ;

- **Tylosine** : cet antibiotique de type macrolide est produit par *Streptomyces fradiae* et il est actif sur les bactéries Gram + et Gram - et les bacilles acido-résistants. Son pouvoir sporicide permet de réduire la température de traitement de certaines conserves.

L'activité spontanée ou induite de micro-organismes peut stabiliser un aliment ou éviter tout danger d'ordre sanitaire. Ces propriétés peuvent résulter de la production de métabolites, par exemple des acides (fermentations lactiques pour le yaourt, les divers fromages, certaines charcuteries ; fermentation acétique pour le vinaigre) ; des composés à activité antimicrobienne (par exemple des nitrites à partir de nitrate, des antibiotiques) ; de la destruction de substrats qui pourraient servir à des germes pathogènes ; de l'« effet de masse » (occupation du terrain). La plupart des aliments fermentés ont une grande stabilité microbiologique, liée au développement d'un ou plusieurs micro-organismes « utiles ».

Les microorganismes sont souvent très sensibles aux conditions d'atmosphère : ainsi, selon les cas, l'oxygène est indispensable ou toxique. Pour qu'une baisse de la pression partielle d'oxygène freine la croissance de germes aérobies, il faut que cette pression devienne inférieure à 0,03 bars. Le comportement vis-à-vis d'une forte teneur en CO₂, est identique : certains microorganismes sont favorisés et d'autres sont inhibés. Le CO₂, agit par effet inhibiteur sur certaines enzymes. Les microorganismes aérobies (*Pseudomonas*, moisissures) sont en général plus sensibles que les autres l'inhibition par le CO₂. On peut utiliser diverse techniques pour modifier l'environnement atmosphérique : protection par emballage ou paraffinage, utilisation d'absorbants d'oxygène, mise sous vide (plus ou moins partielle), mise atmosphère modifiée ou contrôlée, etc. Il faut signaler que dans le cas de mise sous vide (même après cuisson) ou sous conditions anaérobies des germes sporulés anaérobies dangereux peuvent se développer (*Clostridium botulinum* ; *Clostridium perfringens*) : il faut obligatoirement réaliser une réfrigération immédiate.

La forme et la texture d'un produit vont jouer un rôle important sur les transferts de matière (O₂, agents désinfectants ou stabilisants, etc.) et de chaleur. Par ailleurs, la présence de biofilms, ou les microorganismes sont «englués» dans une gangue mucilagineuse (avec des concentrations possibles de 10⁶ à 10⁷ germes/cm²), va être un facteur défavorable pour les traitements antimicrobiens.

L'activité des différents désinfectants et techniques de désinfection est déterminée par des méthodes normalisées. Les normes AFNOR recouvrent un éventail d'applications dépassant largement le seul cadre de l'industrie alimentaire :

- T 72 150 (1987) et T 72 170 (1988) : activité bactéricide - méthode par dilution/neutralisation (sans ou avec substances interférentes) ;
- T 72 151 (1987) et T 72 171 (1988) : activité bactéricide - méthode par filtration sur membrane (id) ;
- T 72 190 (1988): activité bactéricide, fongicide, sporicide - méthode des porte-germes ;
- T 72 200 (1987) : activité fongicide - méthode par dilution/neutralisation ;
- T 72 201 (1987) : activité fongicide - méthode par filtration sur membrane ;
- T 72 230 (1988): activité sporicide - méthode par dilution / neutralisation ;

- T 72 231 (1988) : activité sporicide - méthode par filtration sur membrane ;
- T 72 180 (1989) : activité virucide - virus des vertébrés ;
- T 72 181 (1989) : activité virucide - phages ;
- T 72 300 (1989) : détermination de l'efficacité dans les conditions d'emploi par dilution neutralisation ;
- T 72 301 (1989) : détermination de l'efficacité dans les conditions d'emploi par filtration sur membrane ;
- T 72 281 (1986) : désinfection des surfaces par voie aérienne ;
- T 72 101 (1981) : vocabulaire ;
- T72 110 (1981) : dénomination et marquage de l'efficacité ;
- T 72 140 (1988) : conservation et contrôle des souches.

4. Activation et orientation de la flore

❖ Conséquences négatives : Altérations

Leurs manifestations sont de trois sortes :

- Modification de l'aspect : l'aspect extérieur d'un aliment est souvent affecté par la prolifération d'une flore microbienne.
- Modification de l'aspect et des caractères organoleptiques : le développement des microorganismes sur un aliment s'accompagne généralement de la transformation de certains substrats et de la production de molécules nouvelles qui modifient l'aspect, le goût et l'odeur de l'aliment.
- Augmentation du risque toxique : dans la plupart des cas d'altérations, les microorganismes présents sur l'aliment ne constituent pas un réel danger pour la santé du consommateur. Cependant, le développement dans un aliment de certaines espèces microbiennes peut être à l'origine d'intoxications (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* et *Campylobacter* sont entéropathogènes pour l'homme ; *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* produisent une toxine très active...etc.).

❖ **Conséquences positives : fabrication des aliments**

L'activité d'un ou de plusieurs groupes microbiens bien choisis peut être utilisée pour transformer les aliments. C'est le cas des dérivés du lait (yaourts, fromages), de boissons alcoolisées et d'aliments fermentés. Dans ce cas, les conditions devront être réunies pour que soient sélectionnés les groupes microbiens compétents pour assurer ces transformations et que soient inhibés ceux dont l'activité serait nuisible au processus recherché.

5. Recherche des conditions de milieu optimal pour le développement de la flore

Les bactéries ne croissent que si leur environnement est adéquat. Si celui-ci n'est pas optimal, il peut y avoir croissance à faible vitesse ou pas de croissance du tout ou encore les bactéries peuvent mourir, c'est selon les espèces et les conditions.

De nombreuses caractéristiques physicochimiques de l'aliment et de son environnement conditionnent le développement des microorganismes.

❖ **pH**

L'action du pH se situe à trois niveaux : l'aliment, la perméabilité membranaire et l'activité métabolique. Le pH de l'aliment favorisera d'autant mieux la prolifération qu'il sera voisin du pH optimum de croissance.

De nombreux moisissures et levures préfèrent pour leur développement un pH acide (3 à 6) et se développent même pour certaines espèces à pH entre 1,5 et 2 (*Saccharomyces bailii*). C'est pourquoi les moisissures et les levures sont les microorganismes les plus représentés à la surface des fruits acides. Au contraire, les viandes et les poissons, dont le pH est proche de 7, constituent un substrat favorable pour le développement des bactéries. Pour la plupart d'entre elles, ces limites sont assez larges : *E. Coli* se multiplie à partir du pH 4,4 jusqu'à pH 9. D'autres, au contraire ont une préférence marquée pour les milieux fortement acides ou basiques. Les *Lactobacillus* exigent un pH relativement bas voisin de 6, ces germes sont appelées **acidophiles** et jouent un rôle essentiel dans l'évolution naturelle ou provoquée des produits laitiers. Les *Vibrio* se reproduisent au pH optimal de 9, on les appelle des **basophiles** ou **alcalophiles** (Tableau 7).

Tableau 7 : Valeurs de pH selon les microorganismes (Benhalima, 2018)

	Mini	Optimum	Maximum
Moisissures	1,5-3,5	4,5-6,8	8-11
Levures	1,5-3,5	4-6,5	8-8,5
Bactéries	4,5	6,5-8,5	11
Bactéries lactiques	3,2	5,5-6,5	10,5

❖ Température

La température influence profondément la croissance aussi bien que le métabolisme des microorganismes. Selon la température optimale de développement on distingue :

- Les **mésophiles** (mésos = médiane) préférant une température moyenne comprise entre 20 °C et 40 °C (optimum : 30-37 °C).
- Les **psychrophiles** (psychro = froid), dont la température optimale de croissance est située aux environs de 10 °C, mais qui peuvent se développer à 0 °C.
- Les **psychrotrophes**, plus proches des mésophiles, ayant un optimum à 25 °C mais pouvant s'adapter à 0 °C.
- Les **thermophiles** (thermo = chaud) qui se multiplient préférentiellement entre 45 et 55 °C.
- Les thermophiles extrêmes (hyper-thermophiles), ayant un optimum situé vers 70 °C.
- Les **thermotrophes**, qui se développent aux environs de 50 °C mais plus nettement à la température moyenne de 30 °C.

Cette classification n'a pas de limites strictes, il peut exister des chevauchements d'un groupe à l'autre. Les conditions de stockage influencent la composition de la flore microbienne d'un aliment, cependant, l'exposition au froid favorise les espèces psychrotrophes et psychrophiles comme les espèces de *Pseudomonas*, *Flavobacterium* mais aussi *Listeria* et *Yersinia* dont elles sont responsables des toxi-infections alimentaires.

Inversement, le maintien d'un aliment à une température élevée a pour effet de détruire les espèces psychrotrophes et psychrophiles et de sélectionner les microorganismes thermophiles (**Figure 2**).

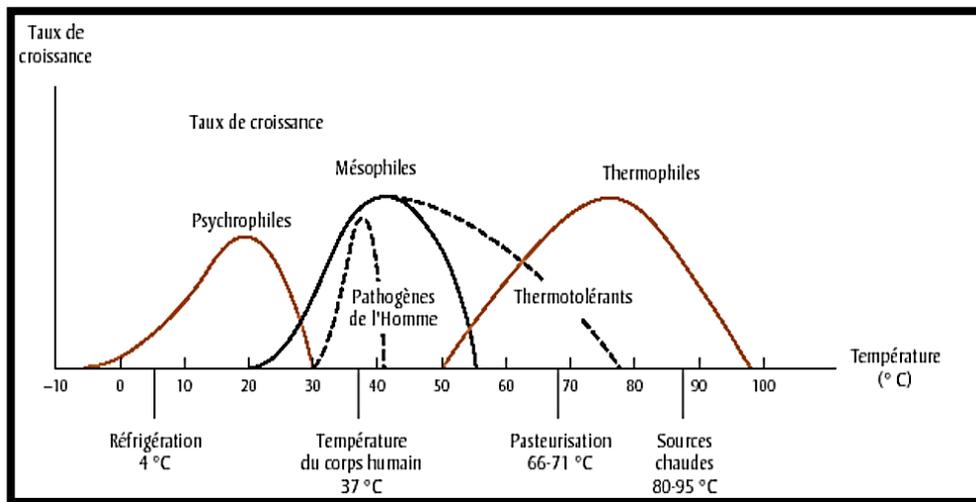


Figure 2 : Taux de croissance bactérien en fonction de la température (Benhalima, 2018)

❖ Potentiel d'oxydoréduction

C'est surtout vis-à-vis l'oxygène que les exigences gazeuses des microorganismes sont précises : certains sont **aérobies stricts**, exigeant l'oxygène libre pour leur développement ; d'autres, **anaérobies stricts**, ne peuvent se multiplier qu'en l'absence d'oxygène libre ; d'autres encore sont **aéro-anaérobies** capables de croître avec ou sans oxygène libre ; d'autres enfin, les **micro-aérophiles**, ne se reproduisent qu'en présence d'une faible tension d'oxygène.

Le potentiel d'oxydoréduction d'un aliment dépend de sa composition et de sa texture ; De son conditionnement (emballage ; Emballage plus ou moins perméable à l'air ; L'aliment se trouve ou non sous une atmosphère artificielle (vide, atmosphère d'azote et de dioxyde de carbone)).

❖ Composition chimique de l'aliment

La plupart des microorganismes se développent sur un aliment y trouvent l'ensemble des nutriments pour leur croissance. Rappelons que les microorganismes dangereux sont pour la plupart hétérotrophes chimio-organotrophes et doivent donc trouver leur énergie dans les composants de l'aliment. Ils doivent aussi y trouver de l'eau, une source d'azote, des minéraux et pour certains des vitamines et des facteurs de croissance. Plus la diversité de composition d'un aliment est grande (produits animaux tels que les viandes et dérivés, le lait) et plus sa susceptibilité à servir de milieu de culture est grande. Certains microorganismes sont cependant spécialisés : pectinolytiques (hydrolysant la pectine), cellulolytiques, lignolytiques...etc., ils se développent préférentiellement soit sur ces substrats, soit sur et dans les aliments riches en pectine, en cellulose, en lignine...etc.

❖ Activité de l'eau

Les microorganismes ont besoin d'eau pour se développer. Cette eau est prise dans l'aliment et c'est l'eau libre qui est indispensable à la multiplication des microorganismes. Cette exigence varie avec l'espèce et correspond à une valeur appelée a_w (Activity of water).

$0 < A_w < 1$ (appelée aussi : disponibilité en eau).

- $A_w = 0.96$: développement important des bactéries
- $A_w < 0.62$ aucun microorganisme ne peut se multiplier (survie possible) (**Tableau 8**).

Tableau 8 : A_w de quelques microorganismes et aliments (**Meyer et al., 2004**)

Microorganismes	Aliments
<i>Acinetobacter</i> (0,99)	Viandes (0,99)
<i>Clostridium botulinum</i> (0,97)	Raisin (0,986)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (0,957)	Pommes (0,98)
<i>E. coli</i> (0,95)	Confiture (0,75-0,80)
<i>Salmonella spp.</i> (0,95)	Céréales (< 0,70)
<i>Staphylococcus aureus</i> (0,86)	Chocolat (< 0,60)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (0,90-0,94)	
<i>Mucor</i> (0,80-0,90)	
<i>Aspergillus flavus</i> (0,78)	

❖ Agents antimicrobiens naturellement présents dans l'aliment

Les substances antimicrobiennes existent déjà dans les aliments sont d'origine végétale ou animale. Le lait frais contient des lacténines et des facteurs anti-coliformes à activité limitée dans le temps. L'œuf contient du lysozyme actif sur des germes à Gram positif. Les airelles contiennent de l'acide benzoïque actif sur les levures et moisissures ; des composés comme le thymol (thym), l'eugénol (clou de girofle) ou l'aldéhyde cinnamique (cannelle) ont des activités antimicrobiennes.

❖ Humidité relative

L'humidité relative influe à la fois sur l'activité de l'eau de l'aliment et sur la croissance des microorganismes à la surface de cet aliment. Par contre, un endroit sec avec très peu d'eau dans l'air sèche la surface du produit alimentaire. Par exemple quand un aliment a une activité d'eau de 0,6 il faut éviter que les conditions d'humidité relative de l'atmosphère environnante ne

conduisent pas à une augmentation de l'activité d'eau en surface jusqu'à une valeur compatible avec une croissance microbienne.

❖ **Gaz environnants ou l'atmosphère de conservation**

Pour les germes aérobies, la présence de l'O₂ favorise leur multiplication. Une augmentation de la teneur en CO₂ (jusqu'à 10 %) et une diminution de la teneur en oxygène permettent une meilleure conservation des aliments en retardant le développement de certains microorganismes et plus particulièrement des moisissures. Une atmosphère d'azote ou un conditionnement sous vide permet d'éviter des contaminations par des microorganismes aérobies.

❖ **Antimicrobiens produits au cours de la fabrication de l'aliment**

Il s'agit de substances qui sont soit bactériostatiques soit bactéricides (éthanol, acides organiques comme les acides lactique, acétique, citrique, etc.). L'addition de composés antimicrobiens aux produits alimentaires (additifs) ou l'utilisation d'agents antimicrobiens divers dans l'environnement de production des aliments (agents de désinfection, de nettoyage, etc.) est réglementée.

CHAPITRE III : LES PROBLEMES MICROBIOLOGIQUES D'UNE USINE ALIMENTAIRE

1. Généralités

Les aliments sont riches en éléments nutritifs et peuvent être siège d'une prolifération microbienne et des transformations qu'elle entraîne ces activités ont une grande incidence sur la qualité intrinsèque et donc commerciale des produits qui peut être améliorée ou abaissée, mais égale sur la qualité hygiénique. Il faut cependant noter que la qualité hygiénique peut être affectée par la présence de germes ne se multipliant pas et donc n'altérant pas l'aliment.

L'altération de la qualité commerciale des aliments traduit par des accidents de fabrication et le rejet par le consommateur. Le coût économique de ces transformations microbiennes est important. Par ailleurs, certains développements microbiens sont utiles et sont à la base de la fabrication des aliments fermentés qui présentent des qualités intéressantes au point de vue nutritif, organoleptique, sanitaire et sont souvent plus faciles à conserver.

Il faut aussi noter que la présence d'une flore microbienne diversifiée dans les aliments peut entraîner la stimulation des mécanismes de défense de l'organisme. La consommation d'une alimentation trop aseptisée (aliments stériles) est paradoxalement défavorable à la santé : les populations des pays développés sont plus fragiles sur le plan gastro-intestinal que celles des pays plus défavorisés (troubles des touristes).

La présence de micro-organismes dans les aliments n'ayant pas subi de traitement antimicrobien est tout à fait normale. Sauf exceptions (quelques produits comme l'intérieur de l'œuf sont naturellement stériles), la matière alimentaire brute contient des micro-organismes, la charge microbienne pouvant être relativement élevée, de l'ordre de 10^2 à 10^6 /g. La matière alimentaire brute est d'origine végétale ou animale et la flore qui lui est associée est donc respectivement celle naturellement présente sur les plantes et les animaux. Par ailleurs, de nombreux apports exogènes peuvent accroître la charge microbienne.

La flore originelle est constituée la plupart du temps de micro-organismes commensaux saprophytes ; cependant on peut y rencontrer des germes effectivement ou potentiellement pathogènes (plantes ou animaux malades ou « porteurs sains »). Les aliments sont confrontés à différentes sources de contaminations microbiennes. Par exemple, les végétaux sont contaminés par l'air, le sol, l'eau, les engrais, etc. Les manipulations et les traitements technologiques sont

également impliqués. Les manipulateurs sont responsables de contaminations de contact ou de contaminations indirectes. Si la présence d'une flore originelle peut être difficile à éviter, celle liée aux contaminations peut être fortement réduite par l'hygiène. Au cours des opérations de fabrication, la flore évolue qualitativement et quantitativement. Certains traitements sont réalisés dans le but d'inhiber ou de détruire en totalité ou en partie la flore (traitements antimicrobiens).

On peut distinguer la flore normale, rencontrée chez les sujets sains (flore commensale) et la flore pathogène rencontrée chez les sujets malades. Les flores commensales des animaux et des végétaux sont de type sensiblement différent. Cependant, la flore de surface peut présenter des similitudes car elle provient de contaminants de l'environnement : air, eau, sol, etc. La flore pathogène est totalement différente : la flore végétale a un métabolisme plutôt orienté vers les glucides, alors que celle des animaux l'est vers les protéines.

Les végétaux ont une flore microbienne riche en levures (*Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, etc.) et en moisissures (*Saprolegnia*, *Plasmodiophora*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc.). Les bactéries qu'ils contiennent appartiennent essentiellement au groupe des bacilles Gram - (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, etc.) et à celui des bacilles Gram + asporulés (*Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, etc.).

Les animaux possèdent différents types de flores commensales. Les plus importantes sont la flore de surface (microcoques, corynebactéries, *Listeria*, bactéries sporulées aérobies, etc.) et la flore intestinale (coliformes, entérocoques, bactéries sporulées anaérobies, mais aussi bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, etc.) L'intestin de l'homme ou des animaux contient jusqu'à 10^{11} germes/g, Les voies respiratoires et génitales et la mamelle contiennent aussi une flore abondante (bactéries lactiques).

Les flores phytopathogènes sont souvent de type fongique, mais quelques genres bactériens jouent un rôle important (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, etc.). La flore pathogène des animaux est essentiellement composée de bactéries (*Mycobacterium*, *Brucella*, *Listeria*, *Staphylococcus aureus*, certains *Streptococcus* et Entérobactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, etc.).

Il existe des différences sensibles entre les différents types de plantes et d'animaux. Certaines espèces microbiennes sont typiques d'un hôte particulier, aussi bien pour les germes saprophytes que pathogènes. La flore varie également en fonction de l'âge (ou du stade de développement), des conditions nutritives, de l'environnement, des traitements (médicamenteux pour les animaux, phytosanitaires pour les plantes).

2. Contamination par l'air, le personnel, les matières premières etc

2.1. Contamination par l'air

L'air et surtout le sol sont riches en micro-organismes. L'air contient des poussières chargées de spores et conidies fongiques, de spores bactériennes (*Bacillus*) et de formes bactériennes non sporulées (microcoques). Le sol et en particulier la terre végétale contiennent un très grand nombre d'espèces microbiennes de types très divers (*Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, spores et conidies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, etc.).

L'eau douce et l'eau salée contiennent un nombre variable de micro-organismes en fonction de l'intensité de la pollution. Leur flore naturelle est constituée de bactéries aérobies Gram- dont des *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Zooglea*, etc. L'eau est utilisée abondamment dans l'industrie alimentaire : cette eau peut contenir des microorganismes variés et être à l'origine de contaminations. Les micro-organismes rencontrés dans l'eau en plus de la flore hydrique normale peuvent avoir des origines diverses : sol (*Streptomyces*, *Bacillus*, etc.), matières fécales (Entérobactéries, streptocoques, etc.), plantes (spores et conidies fongiques), animaux, etc. L'eau peut être le vecteur de micro-organismes pathogènes : *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Listeria*, virus, protozoaires, etc. L'apport des micro-organismes issus de l'environnement peut se faire directement ou par l'intermédiaire de vecteurs (insectes). Les eaux usées sont de véritables bouillons de culture microbiens avec des flores d'origines diverses et généralement un fort taux de germes fécaux...

2.2. Contamination par le personnel

Les flores commensales et pathogènes de l'homme sont proches de celles des animaux. La contamination peut provenir aussi bien de personnes saines que malades ou guéries (porteurs sains). La peau en général, les cheveux et autres pilosités sont très riches en micro-organismes (10^2 à 10^4 germes/cm² pour la peau). Les contaminations par manipulation sont d'abord des contaminations de contact, essentiellement au niveau des mains. Les germes incriminés sont

surtout *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Gafkya*, etc. qui sont véhiculés par une peau saine ou par des plaies, abcès ou furoncles. Le manque d'hygiène peut entraîner la présence sur la peau de bactéries intestinales (contamination fécale : *Salmonella*). Des contaminations par aérosols (toux, éternuement, mais tout simplement aussi respiration) peuvent également avoir lieu : germes d'angines, de sinusites, aussi bien bactériens (streptocoques, staphylocoques, etc.) que viraux. Par ailleurs, la contamination peut être liée aux vêtements.

2.3. Contamination par les matières premières

Le matériel industriel est une source de contamination, en particulier les surfaces poreuses (plan de travail), les outils et machines, les tissus (torchons, toiles diverses), etc., de même que le sol et les murs. Les contaminations industrielles sont en général spécifiques d'une industrie donnée. Les habitudes de nettoyage et la nature des produits utilisés ont parfois une grande importance : ils peuvent permettre la sélection d'un contaminant donné.

Lors de la préparation de produits à partir de matières premières diverses, certaines de celles-ci constituent un apport privilégié de micro-organismes : certains trouvent dans le mélange réalisé des conditions favorables qu'ils ne rencontraient pas auparavant (par exemple contamination par les épices, contamination d'un produit animal par un produit végétal, etc.). Les traitements peuvent induire ou favoriser la dispersion d'une flore : par exemple la mouture d'une graine pour faire de la farine va mettre la flore de surface au contact de l'intérieur ; le hachage d'une viande ou son attendrissage mécanique pourront avoir le même résultat. En boucherie, l'abattage et éviscération provoquent une bactériémie importe s'ils ne sont pas réalisés de manière satisfait. Les conditions de fabrication vont également « sélectionner » diverses catégories de micro-organismes : thermophiles, thermorésistants, psychrophiles, acidophiles, etc. Les conditions de stockage et de conservation influent par conditions physico-chimiques et par la possibilité de contaminations nouvelles. Les déchets industriels sont aussi une source de contamination particulièrement importante. Il faut prendre soin de bien séparer les différentes phases de fabrication et d'isoler ces déchets (conception des installations, « marche en avant » dans le process).

3. Les accidents de fabrication

Le comportement de la flore microbienne va dépendre de plusieurs types de facteurs :

- Le niveau de la contamination initiale : plus elle est élevée et plus l'activité sera précoce et importante (le temps de latence est raccourci) ;
- Les propriétés et exigences du micro-organisme : aptitude à la dégradation des substrats (qui dépend de l'espèce incriminée, mais aussi de l'équipement enzymatique et de l'orientation du métabolisme ; il peut y avoir des phénomènes d'adaptation), exigences nutritives (certains micro-organismes ont des exigences faibles, prototrophie ou complexes, auxotrophie), conditions de développement, résistance ou sensibilité à divers facteurs ou produits, aptitude à la compétition avec les autres flores, etc. Certains micro-organismes ne peuvent se développer que sur certaines catégories de produit, d'autres ont un "Spectre de développement beaucoup plus large ;
- La nature de l'aliment : structure (présence de téguments ou de structures protectrice texture interne, viscosité, diffusivité par rapport aux produits, etc.), teneur en eau (activité d'eau, pression), composition en éléments nutritifs (caractère «pauvre », «riche», équilibré, nature de la source principale de carbone et d'azote, présence de vitamines et de facteurs de croissance), présence d'inhibiteurs naturels ou artificiels (de nombreux produits contiennent des inhibiteurs naturels, tanins, polyphénols, acides organiques, huiles essentielles, etc.), pH (ce paramètre est un facteur fondamental : un bas pH est en général défavorable aux micro-organismes pathogènes), etc. Certains aliments permettent un développement facile pour de nombreuses catégories de micro-organismes, alors que d'autres sont des milieux hostiles ne permettant le développement que de flores spécialisées ;
- Les conditions de l'environnement : nature de l'atmosphère, humidité, température, etc.;
- les traitements technologiques : ces traitements vont souvent modifier la texture, le pH, la teneur en eau et parfois la composition de l'aliment : par ailleurs, ils peuvent modifier les conditions de l'environnement.

La nature de l'aliment et son environnement vont conditionner les possibilités de survie et de développement des divers constituants de la flore.

Les conditions rencontrées par un micro-organisme peuvent être favorables ou non. Il ne faut cependant pas oublier qu'elles peuvent évoluer : modification de l'environnement, traitements technologiques, modifications de composition sous l'action d'une flore microbienne. Des conditions défavorables pour un micro-organisme donné peuvent devenir favorables et vice-

versa. C'est le phénomène de « Succession de flores que l'on rencontre également dans les fermentations industrielles.

Lorsqu'un micro-organisme ne rencontre pas e bonnes conditions dans un aliment, il existe deux possibilités. Si les conditions sont très défavorables, il meurt : ceci n'a que peu d'incidence si la flore incriminée est peu nombreuse, alors qu'elle est abondante, il subsistera des cadavres ou des débris pouvant éventuellement se révéler toxiques. Si les conditions n'autorisent pas le développement mais n'entraînent pas la mort, le germe survit. La survie sans développement est évidemment classique pour les micro-organismes sporulés ou possédant des formes de résistance, mais elle est également possible pour des germes sous forme végétative. Certains micro-organismes sont ainsi transmis au consommateur sans développement dans l'aliment (où pour quelques-uns, comme les virus, la croissance est impossible). D'autres se développeront lorsque les conditions changeront.

Lorsque les conditions sont favorables, le développement intervient. Il peut être très rapide (rappelons que la croissance microbienne suit une loi exponentielle). Ce développement se manifeste par une augmentation de la biomasse microbienne qui se traduit souvent par un accroissement du nombre de micro-organismes (qui sont souvent unicellulaires) et par les manifestations du métabolisme microbien : dégradations (catabolisme) et libération de métabolites (« déchets » du catabolisme, produits de l'anabolisme).

Le développement microbien et l'activité métabolique peuvent prendre des orientations différentes en fonction des conditions du milieu. Ainsi, certaines modifications vont dépendre de la température ou de la teneur en eau : changement des voies métaboliques utilisées et donc des produits formés, toxinogénèse présente ou non selon les conditions du milieu, etc.

Le développement d'un micro-organisme va affecter la qualité intrinsèque de l'aliment et donc sa valeur commerciale. Les modifications ne sont pas toujours néfastes, et lorsqu'elles le sont, elles ne sont pas nécessairement dangereuses pour la santé du consommateur. Le nombre de microorganismes dans un aliment ne peut pas être considéré obligatoirement comme un indice de mauvaise qualité sanitaire. Un développement abondant a parfois des conséquences intéressantes. Certains micro-organismes sont utiles et même indispensables : ils participent à l'élaboration ou à la transformation de l'aliment, assurent le développement de qualités organoleptiques particulières ou participent à la conservation et favorisent la qualité hygiénique en empêchant le

développement de germes dangereux. D'autres germes sont néfastes pour la qualité propre de l'aliment au niveau de la fabrication ou de la conservation. Ce sont les germes banaux de contamination qui peuvent poser de graves problèmes dans l'industrie.

Les germes utiles, levures et bactéries lactiques essentiellement, mais aussi bactéries acétiques, propioniques et certaines moisissures, sont très rarement impliqués dans des accidents sanitaires. Ils peuvent cependant entraîner des accidents industriels si leur utilisation est mal contrôlée.

Les germes banaux, ne participant pas aux fermentations utiles, peuvent avoir des actions néfastes variées qui affectent la valeur alimentaire et commerciale des produits (modification de texture et d'aspect, altération de la valeur alimentaire, altération des qualités organoleptiques, dégradation du conditionnement, etc.). Ces germes peuvent aussi dans certaines conditions se révéler dangereux pour la santé en étant responsables d'intoxications dues à la formation de substances toxiques (amines), ou même d'infections ou toxiinfections intestinales bénignes.

Certains micro-organismes sont très dangereux du point de vue sanitaire et peuvent causer des troubles graves chez le consommateur : ces germes strictement pathogènes sont dangereux même en faible quantité et en l'absence de développement ou de dégradation induite dans l'aliment.

❖ **Modifications microbiennes des aliments : incidence sur la qualité**

L'action microbienne sur un aliment est variée et affecte les caractères physico-chimiques, nutritifs et organoleptiques. L'activité microbienne se manifeste souvent au travers de réactions enzymatiques.

Il faut signaler que les micro-organismes peuvent intervenir au moment de la formation de la matière alimentaire brute. Ainsi des micro-organismes phytopathogènes peuvent avoir une grande influence sur la qualité d'un produit végétal, sans qu'il y ait une contamination visible sur ce produit : par exemple, une maladie affectant la racine aura une incidence sur la qualité des feuilles, une autre affectant les feuilles aura une incidence sur les tubercules ou les fruits, etc. De même, la maladie d'un animal aura des conséquences néfastes sur la qualité de sa viande (teneur en protéines, lipides, glycogène, etc.) même si celle-ci reste stérile. Par ailleurs, il existe des réactions de dégradation affectant les aliments qui n'ont pas d'origine microbienne, même si elles sont de nature enzymatique (elles impliquent alors les propres enzymes du produit).

Une prolifération microbienne entraîne de nombreuses modifications favorables ou non qui affectent l'odeur, la saveur, l'aspect, la couleur texture mais aussi la valeur alimentaire ou hygiénique. Il se produit souvent des successions de flores, chacune étant responsable de transformations qui modifient l'aliment et permettent à la suivante de se développer. Les modifications dépendent beaucoup de la composition de l'aliment et principalement de sa teneur en glucides, protéines et lipides : les produits formés sont issus du catabolisme de ces grandes familles de composés. L'environnement physico-chimique (pH, aération, température) joue aussi un grand rôle. Il est assez facile de prévoir les incidences majeures des modifications d'origine microbienne selon la nature du produit et son environnement.

✓ **Odeur et saveur**

De nombreux métabolites d'origine microbienne volatils ou non sont susceptibles d'engendrer des modifications d'odeur et de saveur. Ces altérations primaires apparaissent à partir d'une population microbienne de l'ordre de $10^6/10^7$ germes/g,

Le développement de microorganismes dans un produit se traduit généralement en premier lieu par des modifications d'odeurs. Ceci est dû à la grande sensibilité olfactive humaine : la limite de détection est de l'ordre de 10^{-9} g et peut atteindre 10^{-12} g dans certains cas (pyrazine). Cependant le seuil de perception olfactive est très variable selon le produit incriminé. L'odeur générée peut provenir du produit prépondérant d'une fermentation ou être liée à la production de composés secondaires. Les modifications d'odeurs ne sont pas toujours forcément néfastes. Ceci dépend de la nature de l'odeur et de son contexte. Les produits incriminés sont des acides (acétique, butyrique, etc.), des alcools, des esters et cétones, l'ammoniac, l'hydrogène sulfuré, la triméthylamine et d'autres amines, les mercaptans, etc. Les odeurs peuvent être complexes : odeur fruitée, de sol, de limon, de linge humide, d'urine, de graisse rance, de putréfaction, de moisi, etc.

Les modifications de goût sont liées à la production de produits plus abondants. La plus courante est liée à une acidification appelée, selon le cas piquêre, aigrissement, surissement et qui se traduit par une baisse du pH. L'acide lactique est le plus souvent impliqué dans les aliments de pH neutre, riches en sucres, mais d'autres acides interviennent également (acides acétique, propionique, butyrique, etc.) Les autres substances modifiant le goût sont les alcools (aliments sucrés acides), le diacétyle, les amines, etc. Le seuil de perception gustative varie

beaucoup en fonction des produits. Comme pour les odeurs, il existe des saveurs complexes : moisi, rance, sucré, caramélisé, etc. La modification peut être indirecte et résulter d'une réaction chimique entre un métabolite microbien et le substrat : dans la bière, les bactéries lactiques peuvent entraîner une amertume qui provient de la transformation de glycérol en acroléine, laquelle se combine avec les polyphénols. Il faut signaler aussi que la production de gaz entraînera parfois un goût piquant ou pétillant.

Un même produit peut générer des odeurs ou des goûts différents en fonction l'environnement, ce qui traduit par l'intervention d'une flore différente : l'altération des viandes entreposées au froid ou à température ambiante est totalement différente (odeur douceâtre à froid ; odeur ammoniacale ou d'H₂S à température plus élevée). Des produits sont plus fragiles que d'autres : ainsi l'apparition d'odeurs fortes est très rapide chez les poissons (triméthylamine, mercaptans, etc.)

Il faut noter que, selon les produits, ces modifications ne sont pas toujours considérées comme néfastes : la production d'acide butyrique ou d'ammoniac peut être appréciée dans certains fromages, le goût de diacétyl dans le beurre (alors qu'il est néfaste dans la bière), etc. Le faisandage d'une viande peut être souhaité ou considéré comme néfaste. La présence de composés d'arômes ou de flaveurs, constituant par exemple le bouquet d'un vin ou d'un fromage, est fondamentale dans la plupart des fermentations souhaitées.

✓ **Aspect et couleur**

Ces modifications apparaissent dans la plupart des cas plus tardivement car elles supposent une prolifération abondante. Au niveau de la couleur, il peut y avoir disparition ou atténuation d'une couleur existante, par dégradation enzymatique de pigments ou colorants du produit (caroténoïdes, hémoglobine, etc.), ou apparition de couleurs nouvelles dues aux métabolites microbiens.

Les colonies microbiennes sont souvent colorées (*Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Serratia*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Rhodotorula*, moisissures, etc.) : lors d'une prolifération microbienne de surface, il apparaît de petites zones de forme (rondes, irrégulières, plates, bombées), d'aspect (opaque, translucide, mat, brillant) ou de couleur (blanc, vert, bleu, noir, jaune, rouge, violet, etc.) variés. Des sécrétions muqueuses peuvent former un revêtement gluant, visqueux ou poisseux (« poissage »). La prolifération de moisissures à la

surface de l'aliment est caractérisée par l'apparition de zones colorées d'aspects divers (taches, feutrage).

Les modifications de la couleur peuvent provenir de la libération de pigments diffusibles : il se forme des taches plus ou moins diffuses de couleurs variées, parfois fluorescentes. Des modifications sont indirectes : les altérations affectant des structures cellulaires permettent à des enzymes endogènes d'entrer en contact avec leur substrat. Ainsi des produits de réactions colorés, comme par exemple des quinones rouges, résultent de l'oxydation de polyphénols par des polyphénoloxydases dans les fruits et végétaux altérés par des microorganismes. Enfin, la coloration peut résulter d'une réaction chimique entre un produit microbien et un composé présent dans l'aliment. L'H₂S, Se produit par diverses bactéries peut entraîner l'apparition de sulfures qui provoquent un noircissement.

✓ **Texture**

Des modifications de texture apparaissent fréquemment : elles sont liées à la destruction de macromolécules du substrat ou à la production de métabolites microbiens. La destruction des polymères (cellulose, amidon, pectine, protéines, lipides, etc.) correspondant à des réactions d'hydrolyse, se traduit par des changements de structure ou de texture de l'aliment alors que celle des petites molécules a surtout une incidence organoleptique. Ces modifications sont d'autant plus grandes que la charge microbienne est importante et constituée de germes riches en enzymes exocellulaires. Ces phénomènes d'hydrolyse sont parfois recherchés quand ils produisent une amélioration de texture (affinage des fromages, faisandage de la viande, etc.) ou d'aspect (éclaircissement par des pectinases fongiques d'un jus de fruit trouble). Ils sont cependant souvent considérés comme défavorables : ramollissement des fruits et légumes, perte de forme des viandes ou de certains fruits en conserve sous l'effet respectif de protéases ou de pectinases, affinage trop poussé d'un fromage, etc.

Une production importante de gaz par un microorganisme (CO₂, le plus souvent, mais aussi H₂) provoque la formation de bulles ou de fissures et par là même le gonflement du produit alimentaire (par exemple : gonflement butyrique des fromages). Cette production peut altérer les emballages (gonflement d'emballages souples, bombement et même explosion de conserves). Certains micro-organismes synthétisent des polymères (dextranes) qui épaississent

les liquides, rendent les produits visqueux ou gluants (« filage »). Un sirop de sucre contaminé par *Leuconostoc* peut se transformer en un gel compact.

Naturellement, les modifications de la texture ont des répercussions sur l'aspect et sur la forme du produit.

✓ **Valeur nutritionnelle et sanitaire**

La valeur alimentaire est modifiée par la présence et la prolifération de micro-organismes qui consomment des molécules à haute valeur énergétique : la valeur « calorique » des produits fermentés est généralement inférieure à celle du produit initial. Cependant, ces mêmes microorganismes peuvent avoir un rôle favorable : ils vont synthétiser des molécules à activité biologique comme des vitamines ou d'autres facteurs de croissance (acides aminés, acides gras essentiels, etc.) ou encore cataboliser et donc détruire des produits toxiques ou antinutritionnels (facteurs anti-trypsiques) et des substances non assimilables (glucides) qui pourraient fermenter dans l'intestin (flatulence).

Naturellement la présence et *a fortiori*, le développement de germes pathogènes, vont avoir une incidence néfaste sur la valeur sanitaire d'un aliment. Par contre, le développement et l'activité de certaines flores « banales » sont favorables à ce point de vue. Ainsi les bactéries acidogènes rendent un aliment impropre à la prolifération de la plupart des bactéries pathogènes ; d'autres provoquent des phénomènes d'antibiose ou tout simplement occupent le terrain et éliminent les substrats que ces bactéries pourraient utiliser (**Figure 3**).

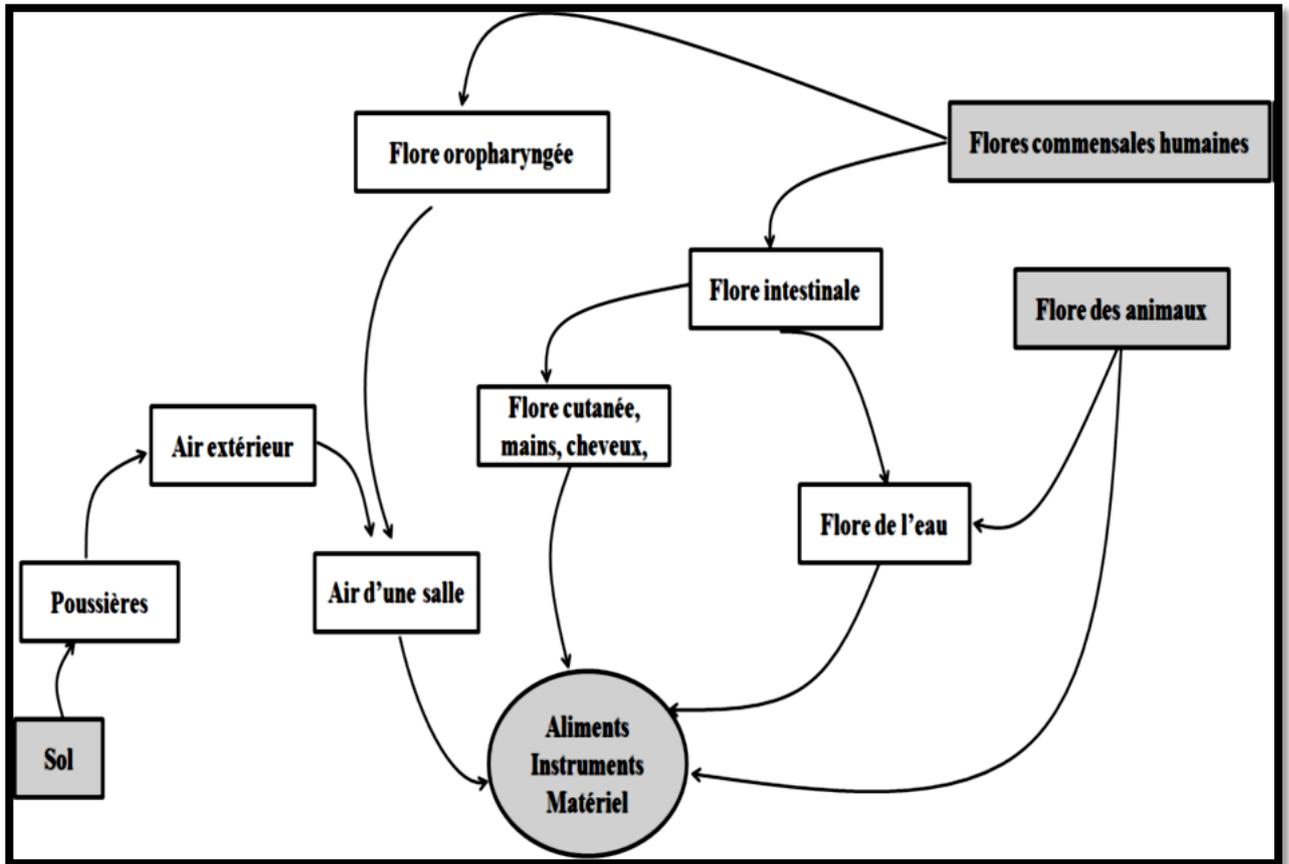


Figure 3 : Origine des contaminants dans les aliments (modifiée) (Leyral et Vierling, 2007).

CHAPITRE IV : PROCEDES BIOTECHNOLOGIQUES, LES BACTERIES LACTIQUES, FERMENTATION ET PRODUITS FERMENTES (UTILISATION INDUSTRIELLE DES MICRO-ORGANISMES) BIOPROCEDES INDUSTRIES

Les micro-organismes sont utilisés dans diverses industries et en particulier dans l'industrie alimentaire dans des buts variés : obtention de produits fermentés, de cultures microbiennes ou de métabolites utilisables comme additifs alimentaires, épuration, etc.

1. Fermentations

La fermentation transforme le produit en modifiant dans un sens favorable ses propriétés. La valeur alimentaire peut être améliorée par destruction de substances toxiques ou indigestes, par apparition de facteurs de croissance d'origine microbienne (vitamines, acides aminés) ou de manière plus générale par une modification favorable de la composition chimique. Les qualités organoleptiques peuvent être modifiées par transformation ou apparition de goûts et d'odeurs dans un sens favorable. Enfin l'aptitude à la conservation peut être meilleure grâce à la stabilisation du produit par élimination de substances aptes au développement de contaminants indésirables, par « effet de masse » de la flore technologique sur l'implantation de contaminants, ou par production de substances à effet stabilisant ou antimicrobien (acides, alcools, produit générateurs de phénomènes d'« antibiose », etc.). Les transformations en cause ne sont pas spécifiques : la même réaction peut selon le produit, les conditions d'application ou même le goût du consommateur, se révéler nuisible pour la qualité d'un produit ou utile dans le cadre d'une fermentation.

1.1. Fermentation alcoolique (voir la partie 4 de chapitre)

1.2. Fermentations lactiques

Elles sont provoquées par de très nombreuses bactéries (beaucoup plus rarement par des moisissures). La fermentation lactique est une étape essentielle dans la fabrication du fromage et yaourts, mais aussi de nombreux produits végétaux fermentés (ensilages, choucroute, olives, cornichons, etc.) et la charcuterie (saucisson, jambon etc.). Les fermentations lactiques, outre leur rôle organoleptique (acidification, sous-produits aromatiques), jouent un grand rôle de stabilisation (par la baisse du pH et des phénomènes d'antibiose et surtout un grand rôle sur la qualité alimentaire : les ferments lactiques sont sources de facteurs de croissance. L'acide lactique est préparé industriellement pour être utilisé comme additif alimentaire. Selon le cas,

on utilise des bactéries homofermentaires (*Streptococcus*, *Lactococcus*, certains *Lactobacillus*, etc.) ou hétérolactiques (*Leuconostoc*, autres *Lactobacillus*, etc.) ou un mélange, beaucoup plus rarement des moisissures.

En fromagerie, le développement des ferments lactiques provoque une acidification participant (avec la présure lorsqu'elle est utilisée) à la coagulation. Par production de CO₂, les bactéries lactiques hétérofermentaires provoquent la formation de cavités (ouverture) qui sont très importantes pour certains types de fromage. Dans les fromages à pâte persillée par exemple, c'est dans les cavités que se développera le *Penicillium roqueforti*.

Les *Bifidobacterium* (*Lactobacillus bifidus*) sont des bactéries réalisant une fermentation hétérolactique de type particulier dont la caractéristique essentielle est le caractère non gazogène. On utilise ces bactéries comme additifs dans certains yaourts en raison de leur action bénéfique sur le milieu intestinal (probiotique).

Signalons que d'autres micro-organismes jouent un grand rôle en fromagerie : levures, microcoques, bactéries protéolytiques et surtout moisissures. Ils réalisent des transformations postérieures à la fermentation lactique au cours de l'affinage. Parmi les transformations, citons la maturation du caillé par protéolyse et lipolyse, l'ouverture des fromages type Emmenthal par production de Co, au cours d'une fermentation propionique par *Propionibacterium shermanii*.

1.3. Fermentation acétique

Elle intervient dans la fabrication du vinaigre et est due aux *Acetobacter*. Cette fermentation nécessite une très forte aération. L'alcool est « respire » en acide acétique. Les bactéries acétiques n'interviennent que si la teneur en éthanol est faible. Leur action peut être favorisée par l'intervention de levures qui oxydent l'éthanol et font donc baisser sa concentration (« mère du vinaigre »). Il existe différentes techniques de fabrication : la plus ancienne se fait en tonneaux avec une large surface d'exposition à l'air. D'autres font intervenir un ruissellement de la solution alcoolisée sur une garniture contenant les bactéries. D'autres enfin font ! Intervenir des fermenteurs industriels fortement aérés et agités (Acetator). Le vinaigre est un produit stabilisé par son pH ; il est utilisé comme conservateur.

1.4. Autres fermentations

Divers autres types de fermentations sont rencontrés dans de nombreux produits, en particulier de type exotique : cacao, shoyu, miso, tempeh, koji. Dans le cas du cacao, la fermentation des fèves est due à des levures, puis à des bactéries acétiques. Les premières détruisent le mucilage et fabriquent l'éthanol qui va servir aux secondes. L'acide acétique formé est un élément essentiel de la transformation du contenu de la fève. Les fermentations orientales mettent souvent en œuvre une première étape due à l'action amylolytique ou protéolytique de moisissures (mucorales) (Figure 4).

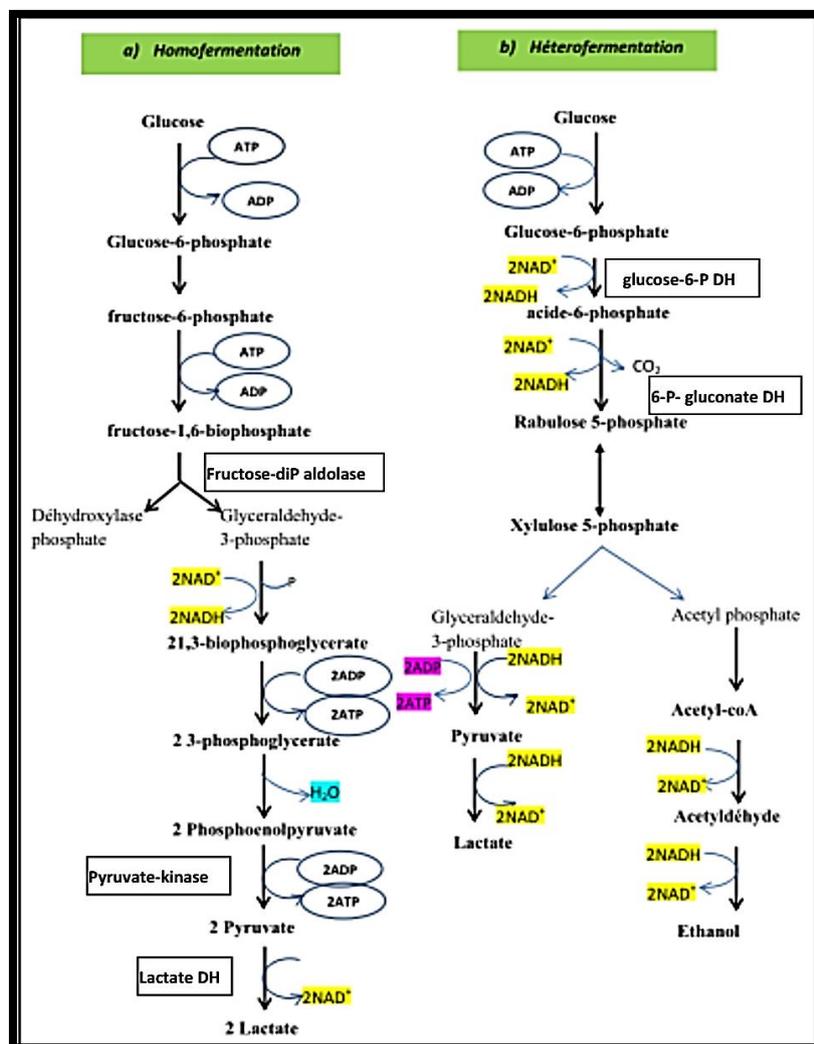


Figure 4 : Types de fermentation lactique, homo-fermentation des bactéries lactiques (a) et hétéro-fermentation (b) (Prescotte *et al.*, 2010).

2. Autres utilisations microbiennes

2.1. Production de biomasse

Cette production peut s'effectuer dans différentes optiques : soit dans un but de consommation alimentaire directe, soit comme source de métabolites après lyse et extraction, soit enfin pour l'obtention de levains destinés aux industries de fermentations. Les principales fabrications sont celles de levure diététique », de ferments de régénération de la flore intestinale, de « levure aliment» pour le bétail (*Single Cell Protein*), de mycélium fongique (pour des extraits ou poudres destinés aux sauces et soupes), de nourriture pour l'aquaculture (algues) ainsi que de levains pour la boulangerie, la fromagerie, etc. Il faut signaler aussi que des micro-organismes peuvent être produits pour réaliser une lutte biologique contre les insectes. Les milieux utilisables pour l'obtention des SCP sont très variés : mélasses, substrats amylacés ou celluloseux, lactosérum, liqueurs de papeterie, alcanes, effluents industriels, etc. La production de biomasse protéinée à partir de levures (*Candida utilis* sur divers substrats, *Kluyveromyces fragilis* et *lactis* sur lactosérum, *Schwanniomyces*, *Endomycopsis* sur substrats amylacés, etc.) exige, pour être efficace, de se placer en métabolisme aérobie, et se fait donc en milieu aéré. Des protéines peuvent aussi être obtenues à partir de bactéries (*Methylophilus methylotrophicus* sur méthanol, *Pseudomonas*, etc.), de moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, etc.) ou d'algues (*Spirulina*).

2.2. Production de métabolites

Sous le vocable de "biotechnologie" sont rassemblées des techniques spécifiques "informées" par les progrès de la microbiologie, de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la génétique, du génie chimique, de l'informatique... Celles-ci ont en commun le fait qu'elles sont partie prenante dans un "procédé biotechnologique", c'est à dire la production à grande échelle d'un "produit d'intérêt" qui est susceptible d'être commercialisé. Divers produits utilisables comme additifs alimentaires sont fabriqués par fermentation microbienne.

❖ Préparation des acides aminés

Des acides aminés comme la lysine, l'acide aspartique, la thréonine ou l'acide glutamique sont utilisés pour compléter les rations en alimentation animale ou sont ajoutés à certains produits. Le glutamate est fréquemment employé comme agent de sapidité.

Exemple : Production de glutamate (acide aminé utilisé pour renforcer le goût des aliments, additifs alimentaires) par les Corynébactéries (Actinobactérie, aérobie, mésophiles, isolées du sol ou de l'eau. Les souches industrielles (*Corynebacterium glutamicum*) présentent une activité glutamate déshydrogénase importante, milieu de culture : la mélasse de betterave (osmoprotecteur pour les bactéries), un chélateur de fer afin de transporter à l'intérieur des cellules les ions ferriques nécessaires à la croissance (citrate, le catéchol),

- Conditions de la Culture de la biomasse : La température optimale de culture se situe entre 28 et 38°C ; l'augmentation de la température à 40°C pendant la phase de production de glutamate permet d'avoir un meilleur blocage de la croissance et de maintenir l'excrétion d'acide glutamique. pH du milieu de culture = 7- 8. L'oxygène : 7 mg/l.

❖ Préparation des acides organiques

Des acides organiques (a. lactique, citrique, fumarique, gluconique, acétique) sont utilisés comme agents d'acidification pour la conservation. L'acide citrique est utilisé dans les industries alimentaire et pharmaceutique comme acidifiant, émulsifiant, antioxydant, agent chélateur. Le gluconate de calcium est utilisé en médecine dans les déficiences calciques. Certaines bactéries produisent, au cours de la fermentation gluconique, divers acides oxogluconiques dont des précurseurs de l'acide ascorbique.

- Souches productrices : *Acetobacter*, *Aspergillus*, *Lactobacillus*.

- Conditions : selon la souche productrice

- Milieu de culture : saccharose, extrait de malt, extrait de levure...

❖ Préparation des vitamines

Quelques vitamines sont fabriquées par voie microbienne : l'acide ascorbique (vitamine C), la riboflavine (vitamine B2), la cyanocobalamine (vitamine B12), la vitamine D, etc.

Exemple : Production de la vitamine B12 par *Escherichia coli*.

- La vitamine B12 encore appelée cobalamine est actuellement préparée par fermentation bactérienne. *E.coli* : transformée par mutagénèse : introduction d'ADN comportant tout ou partie de la région *cobI* qui est un gène qui permet la biosynthèse de la cobalamine.

❖ **Préparation des protéines d'organismes unicellulaire**

- Les P.O.U : source alimentaire pour l'homme et les animaux, peuvent être obtenues par culture de bactéries, de levures, de champignons et algues : *Aspergillus niger*, *Candida utilis*...

- Milieu de culture est à base de « Corn Steep Liquor » riche en amidon, lipides, glucose et en gluten. Après culture (en respectant les conditions physico-chimiques), on procède à l'extraction intracellulaire des protéines : Filtration de la biomasse, rinçage à l'eau distillée afin d'éliminer les résidus du milieu de culture, congélation afin de faciliter la rupture de la paroi cellulaire, broyage et centrifugation : Le surnageant contient les protéines cytoplasmiques totales.

Certains **antibiotiques** peuvent dans certaines conditions être employés comme conservateurs alimentaires : subtiline, tylosine, nisine, pimarinine. Des nucléotides et dérivés d'origine microbienne sont souvent utilisés comme agents de sapidité et des matières grasses d'origine microbienne sont fabriquées en période de pénurie.

Il existe beaucoup de **polysaccharides** fabriqués par les microorganismes (algues, bactéries, moisissures) qui sont utilisés comme agents de texture : glucanes, fructanes, mannanes, xylanes, carraghénanes, fucanes, laminarananes, xanthanes, curdlanes, alginates, pullulanes, etc.

Enfin de nombreuses **enzymes** d'origine microbienne sont utilisables au cours de la fabrication ou du traitement de denrées alimentaires : protéases (dont des succédanés de la présure), lipases, amylases, pectinases, cellulases, galactosidases, glucose oxydase (la glucose oxydase est utilisée pour éliminer le glucose de nombreuses préparations alimentaires), glucose isomérase, catalase, invertase, etc.

D'autres produits de fermentation ont une utilisation non alimentaire. Outre les produits de la fermentation butyrique, certains *Clostridium* peuvent donner **des alcools** (butanol, éthanol, Isopropanol) et de l'acétone (*C. acetobutylicum*). L'acide itaconique, l'acide fumarique et d'autres acides produits par des moisissures, sont utilisés comme copolymères dans la synthèse des résines acryliques et des styrènes. L'acide kojique, également d'origine fongique, peut être utilisé comme réactif d'identification chimique (fer ferrique), comme précurseur d'agents aromatiques (maltol), comme précurseur dans la synthèse d'insecticides et comme agent antimicrobien. On peut citer également la production d'alcaloïdes (ergotamine), d'insecticides (corps parasporal de *Bacillus thuringiensis*), d'hormones végétales (acide abscissique,

gibbérélines) et de divers produits à intérêt thérapeutique (cyclosporine, compactine, mévilonine, krestine, etc.).

2.3. Bioconversions

Les bioconversions sont réalisées au moyen, soit d'enzymes libres ou fixées, soit de cellules entières libres ou fixées. Lorsque l'on utilise le micro-organisme entier, il joue le rôle d'une enzyme ou d'un complexe multienzymatique. L'intérêt des bioconversions réside dans le fait que les transformations catalysées s'effectuent dans des conditions expérimentales (pH et température) douces et que les molécules sont modifiées de façon spécifique (réaction spécifique, régiospécificité, stéréospécificité) et sans réactions secondaires.

- Production de fructose

Des enzymes variées sont capables de convertir le glucose en fructose. Le premier type est la glucose isomérase (E.C. 5.3.1.9.). De nombreux *Streptomyces*, *Escherichia intermedia*, *E. freundii*, *Enterobacter aerogenes* et *E. cloacae* sont producteurs de cette enzyme. Le fructose peut également être obtenu par hydrolyse de l'inuline contenue dans les jus de topinambour ou de chicorée par des inulinases. L'hydrolyse du saccharose (ou inversion) conduit elle aussi au fructose, en fait à un mélange de glucose et de fructose : l'enzyme impliqué est l'invertase (β -fructofuranosidase ou β -D-fructofuranoside fructohydrolase : E.C. 3.2.1. 26). Le fructose est un sucre qui a des qualités de thétiques et industrielles intéressantes. Les soos à haute teneur en fructose sont indispensables à de nombreuses industries alimentaires et non alimentaires.

- Autres réactions de bioconversion des sucres or dérivés

On peut citer : l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose grâce à la B-galactosidase ou lactase (*Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis*, etc.) : la décomposition du raffinose en galactose et saccharose par *Mortierella vinacea* : Foxydation du D-sorbito en L-sorbose par *Acetobacter xylinum* ou par *A. suboxydans* (le L-sorbose constituant la base de synthèse de l'acide ascorbique) ; la réduction du D-ribose en ribitol, du D-xylose en xylitol (*Candida polymorpha*), du fructose en mannitol (*Lactobacillus brevis*), du diacétyle en acétoine (levures) l'isomérisation du D-mannose en D-Fructose *Xanthomonas phaseoli*) et du L-rhamnose en L-rhamnulose (*Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*).

- Bioconversions des acides aminés

Les bioconversions conduisant aux acides aminés combinent la synthèse chimique d'un ou plusieurs précurseurs avec la transformation au moyen d'un système enzymatique microbien. Les acides aminés stéréospécifiques peuvent ainsi être obtenus par différents types de méthodes : condensation stéréospécifique avec des composés chiraux (amination stéréospécifique de l'acide fumarique par l'aspartase d' *Escherichia coli* ; condensation stéréospécifique de l'indole, du pyruvate et de l'ammoniac en L-tryptophane (tryptophanase d'*Escherichia coli*); condensation stéréospécifique du phénol, du pyruvate et de l'ammoniac en L-tyrosine (tyrosinase d'*Erwinia herbicola* ; condensation stéréospécifique et échange entre la B-chloro-L-alanine et le sulfure de sodium pour produire la L-cystéine (cystéine désulfhydrase d'*Enterobacter cloacae*) ; amination réductive des acides α -cétoniques pour préparer les L-aminocides hydrophobes (leucine, isoleucine et valine) modification de précurseurs chiraux (hydroxylation régiospécifique de la L-tyrosine en L-DOPA) résolution de mélanges racémiques par hydrolyse de dérivés d' α -aminoacides DL ; hydrolyse stéréospécifique d'esters d'aminoacides DL au moyen d'estérases ; hydrolyse stéréospécifique d'esters de N-acyl-aminoacides DL au moyen d'estérases: hydrolyse stéréospécifique de N-acyl-aminoacides DL au moyen d'acylases : hydrolyse stéréospécifique d' α -aminoamides DL au moyen d'amidases ; hydrolyse stéréospécifique d'hydantoïnes 5- substituées au moyen d'hydantoïnases, etc

- Bioconversions des stéroïdes

Il s'agit d'un domaine (chimie pharmaceutique) où les applications des bioconversions sont très nombreuses. Les réactions utilisées sont de différents types ; oxydations (hydroxylation en 11- α ou 11- β . dihydroxylation, oxydation de groupes OH combinée avec d'autres réactions, dégradation oxydante, etc.), réductions (hydrogénation, réduction des groupements cétone, etc.), hydrolyses d'esters ou d'éthers, condensations, introduction d'hétérofonctions, isomérisation, formation de nouvelles liaisons C-C, etc.

- Bioconversions des antibiotiques

Un grand nombre d'antibiotiques peuvent être modifiés par des micro-organismes. Ces transformations ont un grand intérêt car elles permettent d'essayer d'apporter une solution au développement de la résistance à de nombreux antibiotiques anciens (β -lactames et antibiotiques aminoglycosidiques). Cette solution passe par l'obtention d'antibiotiques semi-

synthétiques (pénicillines semi-synthétiques, céphalosporines, aminoglycosides, rifamycine et autres). Ces biotransformations sont réalisées par divers types de réactions: hydrolyse ou désacylation (à partir de l'acide pénicilloïque et des acides céphalosporaniques), acylation, phosphorylation, nucléotidylation (adénylylation), oxydation, réduction, amination ou désamination, glycosidation, méthylation ou déméthylation, isomérisation, hydratation, etc.

- Bioconversions d'autres composés

De nombreux autres composés peuvent subir des bioconversions : composés terpénoïques (citral, linalol, limonène, menthol, etc.) pour l'obtention de substances intéressantes dans l'industrie des parfums et arômes; terpénylglycosides pour la récupération par hydrolyse enzymatique de terpénols utilisables dans l'industrie agro-alimentaire et celle des parfums; composés nitriles pour l'obtention d'acrylamide, d'acrylate d'ammonium et d'adipate d'ammonium, produits utilisés dans l'industrie des polymères, composés alicycliques et hétéroalicycliques, alcaloïdes (dérivés de l'acide lysergique, β -carboline, colchicine, etc.); composés aromatiques et hétérocycliques, hydrocarbures aliphatiques (n -alcanes : obtention de biosurfactants), etc.

2.4. Épuration et biodégradation

Les micro-organismes interviennent abondamment dans les phénomènes naturels d'autoépuration par leur pouvoir catabolique. Ces propriétés sont utilisées pour la dépollution et le traitement des eaux usées (épuration biologique). Les systèmes les plus efficaces sont aérobies (épandage, étangs d'oxydation, lits bactériens, boues activées, etc.), mais il existe des systèmes anaérobies (digesteurs méthanogènes).

Certaines souches sont particulièrement bien adaptées à la biodégradation de molécules gênantes comme les pesticides (le DDT est dégradé par *Enterobacter*), les hydrocarbures et de nombreux composés aromatiques (dégradés par des *Pseudomonas*)

2.5. Production de biocarburants

De nombreuses fermentations donnent des produits utilisables comme source d'énergie, purs ou en mélange avec d'autres produits : gaz (hydrogène, méthane), composés oxygénés (éthanol, acétone, butanol, etc.). Certains (éthanol) peuvent être utilisés dans la synthèse d'autres produits (Diester, ETBE, etc.).

3. Mise en œuvre des fermentations industrielles

3.1. Déclenchement des fermentations

Il existe différentes possibilités :

- Déclenchement spontané

Les matières alimentaires brutes contiennent une flore originelle qui peut entraîner le démarrage spontané d'une fermentation. Pour que celle-ci soit efficace, il faut que la flore initiale du type souhaité soit abondante et en bon état physiologique. Il faut également que les conditions nutritionnelles et physico-chimiques de l'aliment lui soient favorables. Ce type de mise en œuvre se rencontre en œnologie, en fromagerie, plus rarement en brasserie. Il faut noter que ce type de fermentation met en œuvre des flores complexes : lorsque le déroulement est correct, il en découle un produit riche en composés secondaires qui sont favorables aux qualités organoleptiques. Cependant, la possibilité d'une mauvaise orientation fermentaire et donc d'un accident de fabrication, doit être envisagée.

- Utilisation d'un ensemencement empirique

Le déclenchement de la fermentation peut être obtenu en ajoutant un élément ou un additif contenant la flore souhaitée. Ainsi par exemple, dans la fabrication traditionnelle du fromage de Roquefort, l'apport de *Penicillium* était obtenu par ajout de pain moisi. La fermentation des fèves de cacao est améliorée en les couvrant de feuilles de bananier qui sont naturellement riches en levures. Souvent, c'est la cuverie utilisée pour une fermentation qui constitue le « réservoir » de micro-organismes. Les accidents de fabrication sont minimisés par rapport au cas précédent.

- Utilisation d'une fermentation antérieure ou d'un levain

Il s'agit de profiter du développement de la flore souhaitée dans une fermentation pour ensemenecer la suivante. Cette technique est utilisée en fromagerie, en brasserie, en boulangerie. Le démarrage de l'activité microbienne est favorisé. Cependant si un trop grand nombre d'opérations se succèdent, on peut craindre la dégénérescence du levain, qui se manifeste par une activité plus faible et par l'augmentation des contaminants sauvages.

- Ensemencement par une culture pure

Cette méthode permet l'utilisation d'une souche sélectionnée (il peut s'agir d'un mélange). Lorsque l'aliment contient une flore naturelle, il peut y avoir compétition avec celle-ci. Cependant l'apport massif d'un micro-organisme favorise son implantation (effet de masse). Ce type de fermentation donne un produit de qualité en général régulière et permet de limiter les accidents de fabrication. Dans certains cas, l'ensemencement est réalisé sur un produit stérilisé ou pasteurisé, ce qui permet une meilleure standardisation et limite encore plus les risques, mais la qualité organoleptique est plus faible. Ces types d'ensemencement sont actuellement les plus fréquents dans les fabrications industrielles : fromagerie, brasserie, etc.

3.2. Orientation et contrôle des fermentations

Lorsqu'une fermentation met en œuvre des flores complexes, les différents micro-organismes interviennent successivement au cours du temps, soit spontanément, soit en fonction du process. Il y a succession des flores. Lors d'une évolution spontanée, c'est la flore la plus performante et la mieux adaptée qui se développe en premier, ce développement aboutissant généralement à une modification des paramètres du milieu. Ceux-ci peuvent devenir défavorables pour cette flore et au contraire favorables pour une autre qui prend alors le relais et ainsi de suite. Le cours d'une fermentation industrielle va être modifié par les traitements technologiques et par la modification des conditions physico-chimiques au niveau du produit ou de l'environnement. Le choix des traitements et l'ajustement des conditions permettent le contrôle du déroulement du processus microbien. Par exemple en fromagerie, différents facteurs concourent à l'orientation des fabrications en favorisant ou non une flore donnée : brassage, salage, pressage, cuisson, étuvage, lavage de la surface, mise en aérobiose (fromage de faible volume, piquage, etc.) ou en anaérobiose (fromage de grand volume, enrobage, etc.), température d'affinage. Taux d'humidité, etc. Le choix d'une flore initiale pourra conditionner l'implantation d'une flore plus tardive. Ainsi, dans les fromages persillés », le développement d'une flore hétérolactique crée les cavités, où après diffusion de l'oxygène, se développeront les moisissures.

CHAPITRE V : LES INTOXICATIONS ET LES TOXI-INFECTIONS (INCIDENCES SANITAIRES DE LA PRESENCE DE MICRO-ORGANISMES)

1. Caractères généraux

La prolifération non contrôlée de micro-organismes dans un aliment peut poser des problèmes au niveau industriel, mais aussi au niveau sanitaire. Des bactéries pathogènes peuvent être présentes et éventuellement se développer. Des micro-organismes banaux sont susceptibles de provoquer également des troubles en fonction des circonstances. Les risques encourus varient en fonction de nombreux paramètres : nature du micro-organisme, niveau de contamination (dose infectante), nature de l'aliment, état physiologique du consommateur. Dans le cas des germes pathogènes, pour qu'un aliment soit dangereux, il faut soit qu'il contienne au départ le micro-organisme en question (cas de viande provenant d'animaux malades), soit qu'il soit contaminé par lui ; dans certains cas, il est nécessaire qu'il y ait développement. La contamination se fait par l'environnement, par le manipulateur (très fréquent), parfois par un vecteur (insecte).

Les maladies microbiennes d'origine alimentaire (qualifiées habituellement d'intoxications) sont fréquentes malgré les progrès de l'hygiène. Certaines se développent à la suite de nouvelles habitudes alimentaires (utilisation intensive de produits conservés au froid qui ont favorisé l'émergence de la listériose). L'essor de la restauration collective, le recours à des aliments préparés à l'avance (traiteurs), la multiplication des produits et l'augmentation des dates limites de consommation se traduisent par un accroissement des risques d'accident. De nombreux troubles asymptomatiques (« crise de foie ») ont une origine microbienne. Ces troubles et maladies ont un coût important tant humain que social (arrêts de travail, perte de productivité, coût des traitements, etc.). Les systèmes et organismes de contrôle, l'établissement et l'application de normes, la prévention (hygiène, éducation des employés de l'industrie, des distributeurs et des consommateurs) permettent de les réduire.

Les accidents dépendent de plusieurs causes. Un risque important est lié aux mauvaises conditions de fabrication ou préparation. Ce sont surtout la restauration et la cuisine familiale qui sont le plus souvent incriminés (car les produits d'origine industrielle sont très contrôlés) : mauvaise qualité de la matière première (particulièrement pour les aliments consommés crus), mauvaise technique de préparation (trop à l'avance, cuisson insuffisante), intervention de

contaminations (mauvais nettoyage du matériel, mauvaise hygiène ou maladie des manipulateurs), défaut de traitement de stabilisation ou de stérilisation, mauvaise réfrigération, etc. D'autres risques sont liés à la conservation et l'entreposage. Les facteurs d'humidité, d'aération et de température sont fondamentaux. Les produits alimentaires au sein desquels des micro-organismes sont susceptibles de proliférer doivent être conservés à des températures ralentissant ou empêchant ce développement.

L'épidémiologie des troubles d'origine alimentaire est assez difficile à faire dans certains cas car plus de 50 % des accidents d'origine alimentaire restent sans explication en raison de leur caractère relativement bénin qui entraîne une absence d'analyse. Traditionnellement, on classe les maladies au niveau épidémiologique en maladies endémiques (fréquence moyenne ou faible, mais régulière), épidémiques (fréquence élevée mais apparition ponctuelle) et sporadique (fréquence faible, apparition ponctuelle). La plupart des maladies alimentaires graves survenant dans les pays développés appartiennent à ce dernier cas. En France, on peut chiffrer le nombre d'intoxications ou d'infections alimentaires à plusieurs dizaines de milliers par an. La mortalité est très faible, inférieure à 0,1 % du nombre de maladies recensées. Principaux aliments responsables sont dans l'ordre, les plats cuisinés (30 %), les charcuteries (25 %) puis les conserves (conserves industrielles et surtout familiales), les produits laitiers, les pâtisseries, les poissons et viandes crues, les coquillages, les fruits et légumes, l'eau. Il est donc très important que la qualité microbiologique des aliments soit la meilleure possible : ceci passe par la réglementation mais aussi par l'éducation des professionnels comme des consommateurs.

2. Principaux cas et les accidents liés à la prolifération

D'une flore peu ou pas pathogène : intoxication

Des germes commensaux de l'homme et des animaux, qui ne posent souvent pas de problème sanitaire lorsqu'ils sont en faible quantité, peuvent se révéler dangereux s'ils se multiplient abondamment (jusqu'à des valeurs de 10^6 à 10^9). Ils peuvent produire des substances toxiques spécifiques (toxines «enzymatiques » pouvant favoriser un pouvoir infectieux), mais aussi des catabolites toxiques à partir de certains composés organiques de l'aliment. Par ailleurs, ces germes peuvent se révéler pathogènes opportunistes chez des sujets diminués et des endotoxines peuvent, après lyse des micro-organismes, contribuer à la toxicité des produits alimentaires contaminés. La consommation d'un aliment ainsi contaminé se traduit par des

syndromes toxiques et/ou infectieux : les syndromes digestifs sont pratiquement toujours présents.

Parmi les substances incriminées, les amines (amines biogènes) jouent un rôle prépondérant. Elles sont produites par décarboxylation directe des acides aminés libres (contenus dans un produit ou résultant d'une protéolyse) ou par modification d'une autre amine (histamine, cadavérine, putrescine, tyramine, dopamine, tryptamine, etc.). Ces amines ont une toxicité propre et peuvent également participer à la formation de nitrosamines. L'histamine est l'amine la plus toxique : elle entraîne une vasodilatation, avec phénomènes cutanés (rougeur, Œdèmes, urticaire), troubles neurologiques et gastro-intestinaux. Les germes les plus souvent incriminés dans la genèse d'histamine sont *Providencia morgani*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, etc., mais aussi certaines bactéries lactiques. La production dépend de facteurs liés à l'aliment ou à l'environnement : composition en acides aminés (qui sont les précurseurs : histidine pour l'histamine), pH (favorable entre 5 et 6,5 pour l'histamine), température (entre 20 et 37 °C), etc. Les aliments incriminés sont les poissons (thon par exemple) parfois le lait, les produits carnés et même les boissons (vin, bière).

L'indice de Karmas (BAI : biogenic amine index) permet de quantifier le danger présenté par les amines dans les poissons. Il correspond au rapport (histidine + putrescine + cadavérine) / (1 + spermine + spermidine). Ce rapport augmente avec la décomposition des produits et permet de les classer en trois catégories de qualité : acceptable, limite et inacceptable.

2.1. Maladies liées à la présence de germes pathogènes

Divers micro-organismes responsables de maladie graves peuvent être transmis par les aliments : il s'agit d'infections locales (tube digestif) ou générales, maladies essentiellement caractérisées par la prolifération du germe ou de toxi-infections avec une prolifération plus ou moins importante liée à la libération de substances toxiques. L'apparition de la maladie infectieuse peut résulter de l'absorption d'un nombre très faible de micro-organismes. Ainsi quelques centaines de cellules sont parfois suffisantes. La présence de ces micro-organismes ne peut être acceptée dans les aliments. Les microorganismes le plus souvent incriminés sont *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*. Parmi les autres micro-organismes rencontrés, on trouve *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, etc. Il faut y ajouter

les affections virales (poliomyélite, hépatite) et parasitaires ou assimilées liées à la présence de protozoaires (toxoplasmose, amibiase) ou d'autres organismes (trichinose, cysticercose, échinococcose, helminthiases diverses, etc.).

Les différents stades de l'infection sont (ils ne sont pas tous présents) :

- La contamination par ingestion ;
- La fixation au niveau de la muqueuse digestive (adhérence spécifique par glycocalyx) ;
- La pénétration au niveau d'une plaie (exceptionnel), par translocation naturelle (fréquence faible) ou par une action spécifique du micro-organisme. Certains micro-organismes ne pénètrent pas dans les tissus et agissent par action d'enzymes et de toxines : on les appelle germes entérotoxiques ;
- La prolifération localisée avec destruction des tissus : germes entéro-invasifs ou entéro-hémorragiques ;
- La prolifération généralisée ou septicémie.

Au cours de la prolifération interviennent facteurs : envahissement simple (rare) enzymatiques néfastes, libération de toxine vent d'endotoxines), etc. Lorsque le toxique est important, on parle de « toxi-infection ».

Après la contamination, une période de plus ou moins grande se manifeste (quelques heures à quelques jours) avant l'apparition premiers symptômes. Il s'agit souvent de symptômes typiquement «alimentaires » nausées, vomissements, diarrhée, accompagnés ou mer d'autres symptômes (torpeur, fièvre, etc.) Après une période aiguë, la maladie décline et il y a guérison. La mortalité est faible pour la plupart des maladies en causes, sauf pour des personnes sensibles et en cas d'absence totale de soins. L'infection peut être aiguë ou chronique ; la phase de déclin peut prendre des formes variables (les symptômes peuvent être cycliques). Parfois, après la guérison, le malade reste porteur sain (exemple : Salmonella de la fièvre typhoïde).

La virulence peut être atténuée ou exaltée par des modifications génétiques ou sous l'influence de l'environnement. Par ailleurs, il existe des différences de sensibilité chez l'hôte.

2.2. Intoxications

Dans les pays en voie de développement les intoxications alimentaires sont favorisées par :

- Le climat chaud de la plupart d'entre eux.

- Le manque de développement des services d'hygiène qui rend tout contrôle impossible.

Le pouvoir pathogène des bactéries peut dépendre de plusieurs facteurs. Il existe des espèces à pouvoir infectieux qui agissent par envahissement de l'hôte (infection) ; des espèces à pouvoir toxigène qui libèrent des toxines dans l'aliment (intoxication) ; des espèces à caractère mixte qui peuvent provoquer des toxi-infections; enfin d'autres espèces qui agissent par la transformation du substrat qu'elles rendent toxique, produisant ainsi des intoxications.

Elles sont provoquées par des micro-organismes qui sécrètent ou libèrent une ou plusieurs toxines dans l'aliment (toxine botulique, toxine staphylococcique, mycotoxines, biotoxines aquatiques etc.). Dans ce cas, ce n'est pas la présence du germe qui est importante mais celle de la toxine car le micro-organisme producteur peut disparaître mais la toxine persister.

- **Toxines bactériennes**

Chez les bactéries, on classe souvent les toxines en deux groupes.

- **Les exotoxines**, de nature protéique, très actives mais thermolabiles, excrétées généralement pendant la croissance et rencontrées essentiellement chez les Gram +. Au niveau alimentaire, les principales sont les entérotoxines staphylococciques (*Staphylococcus aureus*), les toxines botuliniques (*Clostridium botulinum*) et les toxines de *Clostridium perfringens*. Ce sont des toxines typiques d'intoxications.

❖ **Botulisme**

Le botulisme consiste en une paralysie musculaire et la mort peut survenir suite à une défaillance mécanique (musculaire) du système respiratoire. L'agent pathogène (des souches de *Clostridium botulinum*) synthétise un type d'exotoxine -une neurotoxine- qui agit sur les jonctions neuromusculaires, inhibant la libération d'acétylcholine et par conséquent, la stimulation nerveuse du muscle. La maladie peut provenir de l'ingestion de toxine préformée, habituellement dans une nourriture contaminée, comme des viandes cuites et des légumes mal conservés. Il n'est pas donc nécessaire d'ingérer l'agent pathogène lui-même pour contracter le botulisme.

❖ **Intoxication staphylococcique**

L'intoxication alimentaire staphylococcique est due à des entérotoxines produites par plusieurs espèces de *Staphylococcus* (principalement *S. aureus*). Il y a cinq types de toxines (les types A

à E) qui, de façon caractéristique, provoquent des vomissements, et souvent de la diarrhée, peu de temps après l'ingestion de la nourriture contaminée.

- **Les endotoxines**, de nature plus complexe, cidolipidoprotéiques, moins actives et thermostables, libérées par lyse des cellules et rencontrées surtout chez les Gram -. Les principales sont l'entérotoxine cholérique (*Vibrio cholerae*) et l'endotoxine typhoïdienne (*Salmonella*). La toxinogénèse toxine typhoïdienne se fait pendant l'infection.

❖ Typhoïde

La typhoïde, provoquée par *Salmonella typhi*, se manifeste par des symptômes intestinaux et une septicémie. Une fois ingéré, l'agent pathogène pénètre la muqueuse intestinale, envahi le flux sanguin (via le système lymphatique) et se multiplie, par exemple, dans le foie, la vésicule biliaire et la rate. L'inflammation intestinale peut être tellement forte qu'elle provoque perforation et hémorragie. L'absence de traitement aboutit à la mort dans 30% des cas, le temps d'incubation est usuellement entre 5-25 jours, et il est plus court si l'inoculum est important.

❖ Choléra

Le choléra se manifeste par des vomissements et une diarrhée abondante qui finit par devenir quasiment de l'eau. L'agent pathogène (certaines souches de *Vibrio cholerae*) se multiplie dans l'intestin et fabrique un type d'exotoxine : une entérotoxine (toxine cholérique).

- **Toxines fongiques (Les mycotoxines)**

Diverses moisissures excrètent aussi des substances toxiques. Comme c'est le cas pour la plupart des toxines eucaryotes toxiques, il s'agit de molécules de petite taille, relativement peu actives et non immunogènes (on peut les rendre immunogènes en les couplant comme haptènes à une protéine). Les mycotoxines sont surtout rencontrées dans des produits végétaux : oléagineux, céréales, fruits, etc.) En raison de la prévention, l'implication de ces toxines est de plus en plus rare dans les pays tempérés.

Les principales mycotoxines sont les suivantes :

• **Aflatoxines**

Ces toxines, dérivées de la coumarine sont produites par *Aspergillus flavus* et des espèces voisines. Il existe quatre types d'aflatoxines naturelles, B1, B2, G1 et G2 que l'on trouve dans des végétaux moisissés (tourteaux d'arachide, graines sèches, etc.). Ces toxines donnent des

troubles aigus ou chroniques (pouvant déboucher sur des cancers). Lors de l'ingestion par un animal, la toxine est modifiée (B1 - M1) et peut se retrouver dans le lait. Il existe des traitements de décontamination, mais certains aboutissent à la formation de nouvelles toxines (D1).

• **Patuline**

Elle est produite par différentes espèces (*Penicillium patulum*, *P. urticae*, etc.) et peut contaminer des fruits et dérivés (pommes, cidre, etc.).

• **Zéaralénone**

Elle est produite par *Fusarium roseum* et a des propriétés œstrogènes.

• **Alcaloïdes de l'ergot du seigle**

Ces substances sont produites par *Claviceps purpurea*. Il s'agit de composés à cycle ergoline. Les alcaloïdes de l'ergot sont dotés de propriétés pharmacologiques et ont un intérêt médical.

• **Mycotoxines diverses (rares en France)**

On peut citer : la stachybotryotoxine (*Stachybotrys atra*), la toxine de l'aleucie toxique alimentaire (*Fusarium sporotrichoides*), l'islanditoxine, la lutéoskyrine (*Penicillium islandicum*), la rubratoxine (*Penicillium rubrum*), la stérigmatocystine (*Aspergillus versicolor*), la clavatine (*Aspergillus clavatus*), l'ochratoxine (*Aspergillus ochraceus*, *Fusarium irridicatum*), la citrinine (*Penicillium citrinum*), la citréoviridine (*Penicillium citreoviride*), l'acide cyclopiazonique (*Penicillium cyclopium*), etc.

- **Toxines « aquatiques » (poisons d'aliments marins)**

Diverses algues eucaryotes ou procaryotes (cyanophycées = cyanobactéries) d'eau de mer ou d'eau douce sont également toxiques et provoquent divers troubles :

• **Intoxication paralysante** (IPIA : intoxication paralysante par invertébrés aquatiques = PSP : *paralytic shellfish poisoning*) Elle est provoquée par des tétrahydropurines (saxitoxines et composés voisins) libérées par des dinoflagellés (*Gonyaulax catenella*, *G. acatenella*, *G. tamarensis*, *G. monilata*, *G. polyedra*, etc.) ainsi que par certaines cyanophycées d'eau douce (*Aphanizomenon flos-aquae*). Elle est liée à la consommation de mollusques bivalves ou de crabes contaminés par les algues et qui accumulent les toxines. Les troubles occasionnés vont

de picotements et céphalées à une paralysie avec insuffisance respiratoire pouvant entraîner la mort.

• **Intoxication ciguatérique = ciguatera**

Cette intoxication se caractérisant par des syndromes neurologiques, cardiovasculaires et gastro-intestinaux est provoquée par diverses toxines (ciguatoxine, maïtotoxine, scaritoxine, acide odakaïque) libérées par des dinoflagellés (*Gambierdiscus toxicus*, *Ostreopsis*). Elle est liée à la consommation de poissons contaminés en zones intertropicales. • Intoxication neurotoxique (INIA : intoxication neurotoxique par invertébrés aquatiques = NSP : *neurologic shellfish poisoning*) Elle est provoquée par des toxines de dinoflagellés (*Gymnodinium breve*) et elle est liée à la consommation de fruits de mer contaminés.

• **Intoxication diarrhéique** (IDIA : intoxication diarrhéique par invertébrés aquatiques = DSP : diarrhoeic shellfish poisoning) Elle est provoquée par des dérivés de l'acide odakaïque libérés par divers dinoflagellés (*Dinophysis fortii*, *Prorocentrum lima*, etc.) qui contaminent les fruits de mer. Il faut citer aussi l'intoxication amnésique >> (ASP : *amnesic shellfish poisoning* = empoisonnement à l'acide domoïque) provoquée par *Nitzschia* ou *Pseudonitzschia* ainsi que l'empoisonnement scombroidien lié aux bactéries productrices d'histamine chez les poissons riches en histidine. Le rôle de toxines issues de cyanobactéries d'eau douce (*Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*), dans des troubles liés à la consommation d'eau, n'est pas bien caractérisé (**Figure 5**).

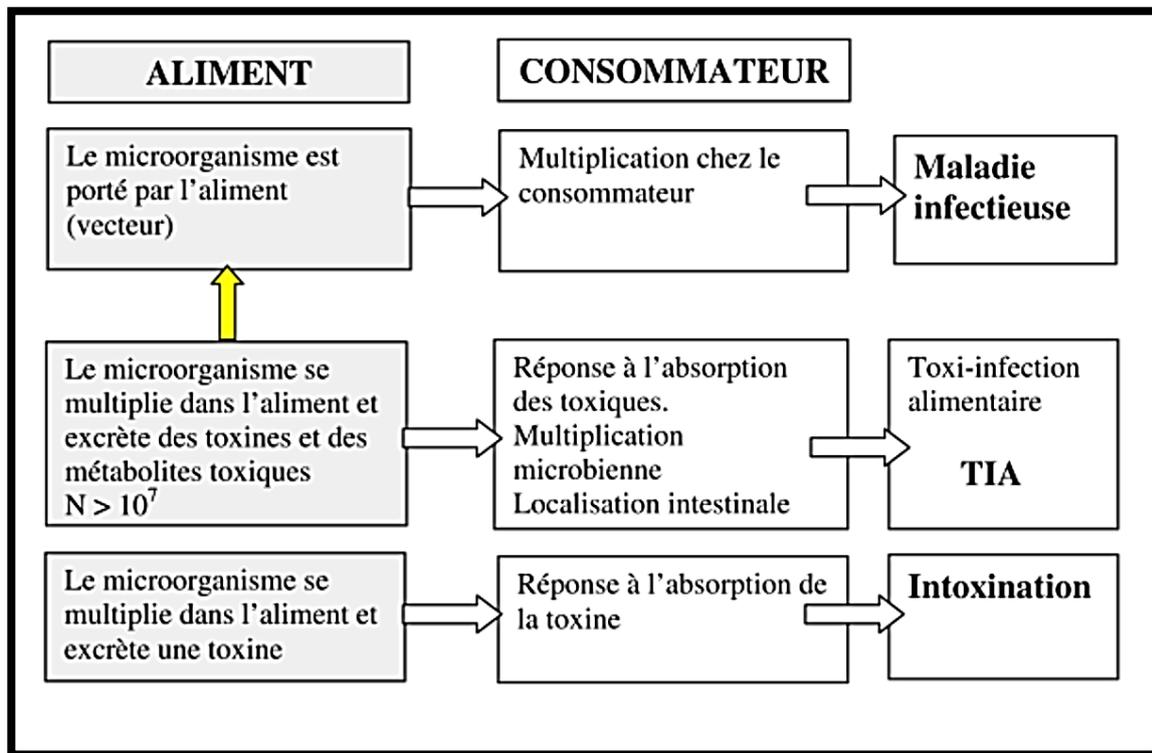


Figure 5 : Modalités du pouvoir toxique (Cuq, 2007).

CHAPITRE VI : ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES ALIMENTS

Les analyses microbiologiques des aliments sont indispensables pour garantir la conformité aux normes de sécurité alimentaire, prévenir les risques sanitaires et protéger la santé des consommateurs. Elles permettent de détecter des micro-organismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli*, et d'autres bactéries pouvant contaminer les produits alimentaires.

▪ **Analyses microbiologiques standards des produits alimentaires**

Les tests microbiologiques permettent de **détecter et quantifier les micro-organismes pathogènes et indicateurs** dans les produits alimentaires. La réalisation de ces analyses conformément aux dernières normes en vigueur pour assurer une sécurité alimentaire optimale.

▪ **Identification des micro-organismes pathogènes**

Grâce à des technologies avancées telles que les **galeries API** et le **MALDI-TOF**, l'identification précise des bactéries et les agents pathogènes présents dans les produits. La détectons notamment des pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* et bien d'autres, garantissant ainsi la conformité des produits alimentaires avec les réglementations sanitaires.

▪ **Contrôle microbiologique de l'environnement de production**

La qualité microbiologique ne se limite pas aux produits alimentaires. La réalisation également des **analyses de l'hygiène de l'environnement de production**, incluant les surfaces de travail, l'air, l'eau et les équipements. Ces contrôles réguliers permettent de prévenir la contamination croisée et d'assurer un environnement de production sain et sécurisé.

▪ **Tests de stabilité et de conservation des aliments**

Les tests de stabilité et de conservation microbiologique aidant à déterminer la **durée de vie microbiologique** des produits alimentaires, en validant des dates limites de consommation (DLC). Ces analyses garantissent que les produits restent sûrs pour les consommateurs tout au long de leur cycle de vie.

I. ANALYSE DE L'EAU

On distingue diverses catégories selon la nature et l'utilisation : eaux brutes (superficielle ou profonde), eau livrée à la consommation, eau utilisée dans un traitement, glace alimentaire, eaux minérales naturelles. Concernant le type de distribution, on distingue l'eau distribuée en vrac et l'eau conditionnée. Pour l'eau brute, on classe en eaux non traitées et en eaux traitées ces dernières sont différenciées en fonction du classement (décret du 5 juin 1995)

-A1 : eau ayant subi un traitement physique et une désinfection ;

-A2 : eau ayant subi un traitement physique, un traitement chimique et une désinfection ;

-A3 : eau ayant subi un traitement physique, un traitement chimique poussé, un affinage et une désinfection. Les schémas d'analyse dépendent du type d'eau considéré.

1. Prélèvement des échantillons

1.1. Volume et fréquence des prélèvements

La quantité d'eau à prélever dépend du but et de la nature de l'analyse qui dépend eux-mêmes de la nature de l'eau et de son utilisation. Lorsqu'il s'agit d'une eau inconnue, la multiplicité des analyses à effectuer peut exiger un prélèvement abondant (supérieur à 10 litres dans certains cas particuliers, par exemple, quand une analyse virologique est nécessaire). Lorsqu'il s'agit d'une analyse de surveillance au niveau de la distribution ou au niveau des eaux de traitement ou des eaux résiduaires, il suffit souvent de 300 à 500 mL (sauf si la recherche de *Salmonella* est prévue qui peut nécessiter 5 litres). Dans le cas d'un système de distribution ou d'un réseau interne, les prélèvements doivent s'effectuer en divers points du système (par exemple à l'entrée et la sortie des réservoirs au niveau des grands branchements, au niveau de l'utilisateur, etc.). Pour une étude régulière au cours du temps, les prélèvements doivent s'effectuer sur le même lieu et dans les mêmes conditions.

La fréquence dans le temps dépend des risques de pollution (qui se traduisent par une absence de traitement ou un traitement plus ou moins poussé) mais aussi de l'importance du système de production ou du réseau. Dans le cas d'une analyse à la ressource, le nombre d'échantillons est fonction du nombre de m³ produits par jour ; dans le cas d'une adduction d'eau publique, le

nombre d'échantillons prélevés dans le réseau est lié au nombre d'habitants. Ces indications peuvent servir de base pour les industries d'exploitation et d'embouteillage d'eaux de table ou d'eaux minérales, ainsi que pour les industries qui possèdent un système de captage d'eau qui leur est propre. La fréquence doit être adaptée aux risques et au volume d'eau captée. Au niveau des eaux de traitement, ou de circuits internes (parfois recyclés) de nombreuses industries, il est nécessaire de prévoir des analyses de routine régulières afin d'éviter les accidents de fabrication. Trop d'industries ne font appel à l'analyse que pour rechercher la cause d'un accident lorsqu'il s'est produit.

1.2. Techniques de prélèvement

Le prélèvement doit s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Lorsque plusieurs échantillons sont recueillis simultanément en un même point, celui qui est destiné à l'analyse microbiologique sera prélevé le premier. Il faut utiliser de préférence des flacons en verre pyrex munis d'un large col et d'un bouchon en verre rodé, ou mieux d'un bouchon à vis en métal ou en plastique (l'usage de bouchons en liège qui peuvent entraîner des souillures doit être évité) ou des flacons en matière plastique (usage unique). Le flacon (et ses éventuels accessoires) doit être stérilisé à l'autoclave dans un emballage de papier kraft ou d'aluminium (sauf récipient à usage unique) ; au minimum, le col et le bouchon doivent être protégés de cette façon.

Les techniques de prélèvement sont variables en fonction du but recherché et de la nature de l'eau à analyser :

- Prélèvement en vue d'un captage destiné à la distribution ou à l'utilisation industrielle ;
- Prélèvement sur un réseau de distribution et au niveau de l'utilisateur ;
- Prélèvement d'eau de traitement ou de circuits industriels.

1.3. Précautions concernant l'échantillon

Après le prélèvement les flacons rebouchés (papier kraft ou aluminium). Ils doivent être soigneusement étiquetés et transmis sans retard au laboratoire. La teneur des échantillons en certains micro-organismes (coliformes) pouvant se modifier rapidement, il importe de procéder à l'analyse dans un délai très court, inférieur à 8 heures. En aucun cas l'analyse ne doit être effectuée lorsque le délai dépasse 24 heures. L'idéal est de procéder à l'analyse dans l'heure

suivante. En principe, la température de l'eau ne doit pas être modifiée jusqu'à son traitement au laboratoire. Si le transport doit dépasser une heure, il faut utiliser une boîte isolante. Si la température extérieure est très élevée, il peut être nécessaire de procéder à une réfrigération modérée de l'ensemble à l'aide de glace : la température optimale est dans ce cas de 4 à 6 °C. Pour tout transport, il importe de vérifier soigneusement la fermeture correcte des flacons. Il peut arriver que pour des raisons techniques il soit impossible de procéder à l'analyse rapidement : il est alors possible de recourir à la filtration de l'échantillon sur membrane sur les lieux du prélèvement. Après filtration, les membranes peuvent être placées dans une boîte de Pétri sur un tampon absorbant saturé d'un milieu de transport approprié aux micro-organismes recherchés. Les milieux de transport permettent la survie des germes mais sans permettre un développement affectant leur nombre. Un délai de trois jours peut être alors admis. Les échantillons doivent être soigneusement étiquetés. L'étiquette doit comporter tous les éléments nécessaires à la bonne exploitation des résultats de l'analyse : date ; heure ; lieu précis ; les conditions météorologiques ; un numéro et toutes circonstances anormales. Une fois l'échantillon prélevé, le flacon est placé dans une glacière à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C.

2. Méthodes d'analyse Microbiologique

2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux à 37 °C (germes revivifiables)

Microorganismes revivifiables nommés également mésophile aérobies sont toute bactérie, levure ou moisissure, capable de former des colonies dans un milieu spécifié à des températures optimales de croissance (après 24 h à 37 °C et 72 h à 22 °C). Ce dénombrement est souvent considéré comme accessoire par rapport aux autres dénombrements réalisés dans le contrôle bactériologique des eaux. Pour le dénombrement des germes totaux, la technique d'ensemencement dans la masse avec le milieu GN a été utilisée.

➤ Préparation des dilutions décimale

- 1-** Marquer les tubes de diluant (exemple : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).
- 2-** Prélever aseptiquement 1ml de la suspension mère à l'aide d'une pipette graduée stérile de 1ml munie d'une poire à aspiration ; l'homogénéisation du prélèvement se fait par aspiration et refoulement quatre fois, ou par l'utilisation d'un homogénéisateur.

- 3- Transférer aseptiquement le 1ml prélevé dans le premier tube 10^{-1} , la pipette ne devant pas pénétrer dans les 9 ml de diluant.
- 4- Jeter la pipette utilisée dans un conteneur approprié, à l'aide d'une deuxième pipette stérile de 1ml procéder de même du tube 10^{-1} au tube 10^{-2} .
- 5- Faire de même pour les trois derniers tubes, en utilise à chaque prélèvement une pipette nouvelle (**Figure 6**).

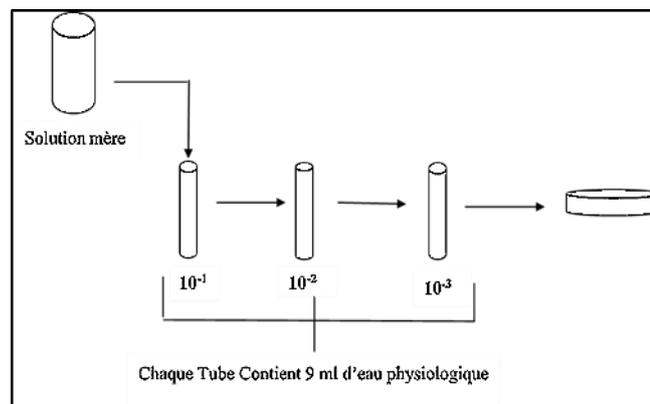


Figure 6 : Préparation des dilutions décimale

➤ **Mode opératoire**

- Dans des boites de pétri vides, stérile et numérotées, on met 1ml d échantillon non dilué et de diverses dilutions de cet échantillon (Soit : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}).
- Complete ensuite avec environ 19 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à 45°C .
- Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l' inoculum de se mélanger à la gélose.
- Laisser solidifier sur paillasse environ 15 min.
- Effectuer cette opération en double série de boites, dont la 1ère sera incubée à l' obscurité, couvercle en bas, dans une étuve à 22°C pendant 72 heures, et la 2ème dans une étuve à 37°C durant 48 heures.

➤ **Lecture et Expression des résultats**

Les germes totaux se présentent dans les deux cas sous forme de colonies lenticulaires poussant en masse. Pour le dénombrement de ces derniers, on prend en considération les remarques suivantes :

- Dénombrer seulement les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies ;
- Les résultats sont exprimés en unités formatrices de colonies (UFC) par ml d'eau à analyser à 22 °C et 37 °C.

Le nombre d'UFC (Unités Formant Colonies), correspondant au nombre (N) des microorganismes dénombrés par ml à 37°C et à 22°C, est donné par :

$$N = \sum c / 1.1 \times d$$

Où :

- **N** : Nombre d'UFC par ml de produit initial.
- $\sum c$: Somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues.
- **D** : Taux de dilution correspondant à la première dilution (**Figure 7**)

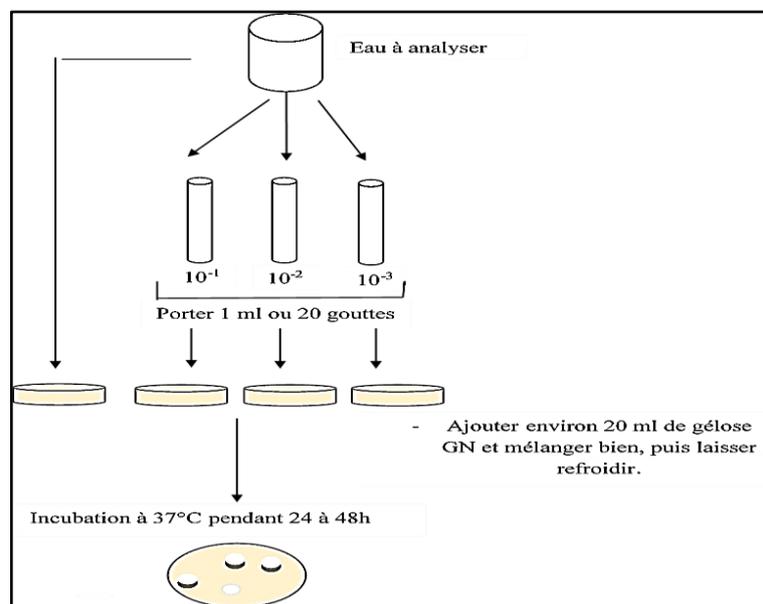


Figure 7 : Protocole de recherche et dénombrement des germes totaux à 37° C dans les eaux

2.2. Recherche et dénombrement des germes de contamination fécale

❖ Coliformes totaux et fécaux

Les coliformes totaux (CT) appartiennent à la famille des *Entérobactéries* ; ce sont des microorganismes en forme de bâtonnets, non sporogènes, à Gram négatif, ne possédant pas d'oxydase, aérobies ou anaérobies facultatifs

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermo-tolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capable de fermenter le lactose à une température de 44°C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (*E. Coli*), dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*

La recherche et le dénombrement des coliformes et l'identification d'*E. Coli* ont été effectués par la méthode du nombre le plus probable (NPP) appelée aussi la colimétrie. Cette technique se fait en deux étapes consécutives :

- Le test présomptif : Réservé à la recherche des coliformes.
- Le test confirmatif : réservé à la recherche des coliformes fécaux et *E. Coli*

➤ Milieux de culture

- Bouillon lactose au pourpre de bromocresol (BCPL) à double concentration (D/C).
- Bouillon lactose au pourpre de bromocresol (BCPL) à simple concentration (S/C).
- Milieu de confirmation : bouillon de Schubert.
- Réactif de Kovacs pour la recherche d'indole.

1^{ère} étape : Test présomptif de la présence ou l'absence des coliformes, On ensemence :

- 3 tubes de 10 ml de BCPL à double concentration munis d'une cloche de Durham avec 10 ml d'eau à analyser ;
- 3 tubes de 10 ml de BCPL à simple concentration munis d'une cloche de Durham avec 1 ml d'eau à analyser ;
- 3 tubes de 10 ml de BCPL à simple concentration munis d'une cloche de Durham avec 0,1 ml d'eau à analyser ;

On agite pour homogénéiser tout en vidant l'air dans la cloche puis placer les tubes dans une étuve à 37 °C pendant 48 heures ; Après incubation, les tubes considérés comme positifs présentent un trouble dans toute la masse liquide, avec virage du violet au jaune et un dégagement de gaz dans la cloche.

Le nombre des coliformes totaux par 100 ml est obtenu en comptant le nombre des tubes positifs en se référant au tableau de Mac Credy qui nous donne le nombre le plus probable (NPP).

2^{ème} étape : Test confirmatif de la présence ou l'absence d'*E. Coli* : On repique chaque tube de BPCL positif 2 à 3 gouttes par une anse bouclée ou une pipette pasteur dans un tube de bouillon Schubert muni d'une cloche de Durham ; On incube à 44 °C pendant 24 heures ;

On considère comme positifs tous les tubes présentant à la fois ;

- Un trouble avec un dégagement gazeux ;
- Anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *E. Coli* Après adjonction de 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs.

Le dénombrement d'*E. Coli* s'effectue de la même façon que celui des coliformes totaux sur la table de Mac Credy. Noter le nombre des tubes positifs et exprimer le résultat selon la table de Mac Grady pour déterminer le nombre des coliformes fécaux par 100 ml d'échantillon (**Figure 8**).

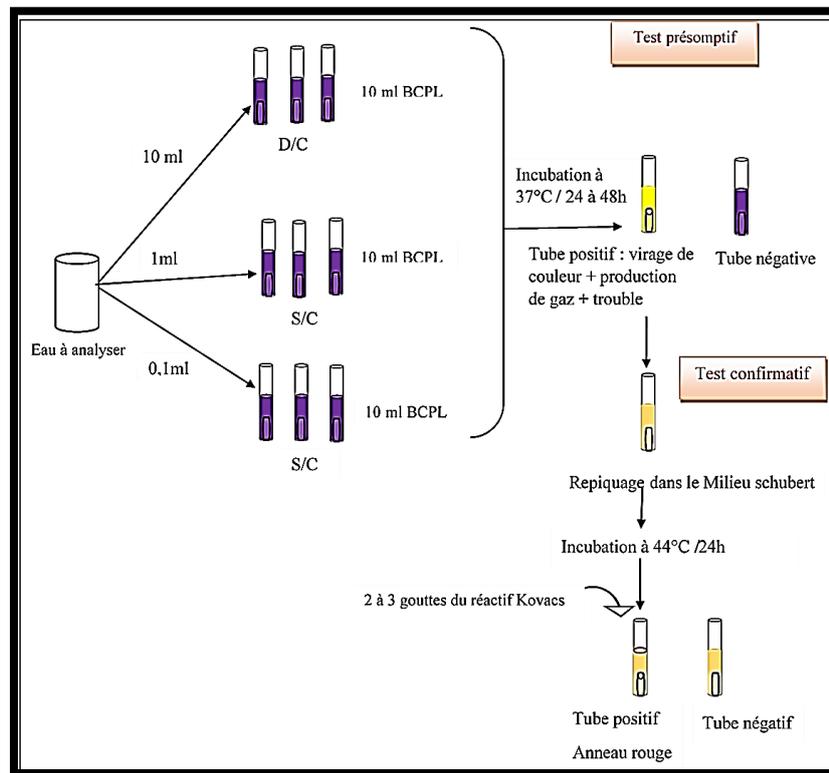


Figure 8 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.

❖ Streptocoques fécaux

Les Streptocoques fécaux ou streptocoques du groupes « D » de la classification de lance Field, sont considérés, d'une manière globale, comme étant des témoins de pollution fécale.

La recherche et le dénombrement des streptocoques du groupe (D) dans les eaux, en milieu liquide par la technique du NPP, se fait en deux étapes consécutives :

- Le test de présomption : réservé à la recherche des streptocoques.
- Le test de confirmation : réservé à la recherche des streptocoques du groupe (D)

➤ Test de présomptif

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- 10 ml dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE D/C.
- 1 ml dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE S/C.
- 0.1 ml dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE S/C.
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

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

Lecture : sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien.

➤ Test confirmatif

Le test de confirmation est basé sur l'affirmation des Streptocoque fécaux éventuellement présents dans le test de présomption.

Les tubes de Rothe positifs, après l'agitation, prélevée de chacun d'eux quelques gouttes à l'aide d'une pipette Pasteur donc faire l'objet d'un repiquage dans un tube contenant le milieu Eva Litsky. Bien mélanger le milieu et l'inoculum et l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien.
- Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP (**Figure 9**).

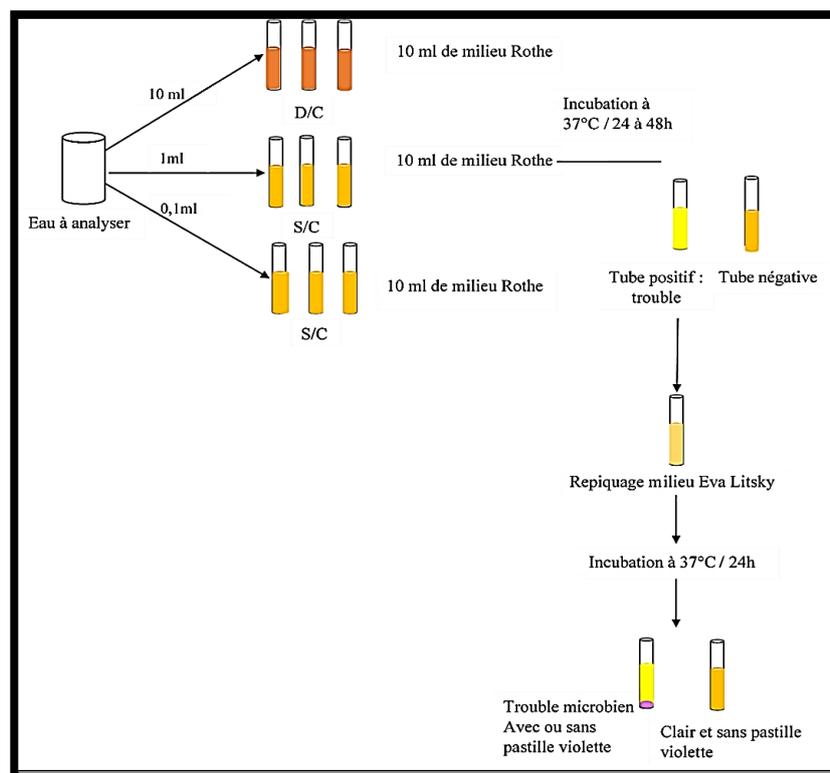


Figure 9 : Protocole de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux dans les eaux

2.3. Anaérobies sulfito-réductrices (ASR)

Les bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) sont des bacilles Gram positifs, Anaérobies stricts, isolée ou en chaînette, mobile, elle a aussi la possibilité d'exister sous forme sporulée et par un équipement enzymatique réduisant plus ou moins activement les sulfites en sulfure.

Les spores des ASR se développent en 24 à 72 heures sur une gélose Viande Foie (VF) en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium ($\text{Na}_2 \text{SO}_3$) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe^{2+} donne FeS (sulfure De fer) de couleur noire.

La recherche et le dénombrement des spores des ASR dans l'eau se fait par la méthode d'incorporation en gélose en tubes profonds. Pour la destruction des formes végétatives il faut Chauffer l'échantillon d'eau à analyser après l'avoir homogénéisé soigneusement, introduire 25 ml d'échantillon dans un tube et placer celui-ci dans un bain Marie à $80 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ et maintenir l'échantillon à cette température pendant 10 min, puis refroidir rapidement à environ $55 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pour la préparation du milieu de culture il faut placer 4 tubes de 20 ml de gélose viande foie (VF) dans un bain Marie bouillant pour assurer la fusion du milieu, maintenir 10 min dans ce bain laissé pour la régénération du milieu (élimination des gaz dissous, en particulier l'oxygène), refroidir rapidement à $55 \text{ }^\circ\text{C}$ environ, ajouter à chaque tube 1 ml de la solution de sulfite de sodium et 4 gouttes de la solution de sels de fer et mélanger doucement sans incorporer de bulles d'air. Pour l'ensemencement et incubation il faut placer 4 tubes stériles de tubes, répartir stérilement 5 ml de l'eau traitée précédemment, ajouter dans chacun d'eux le contenu d'un tube de milieu, mélanger doucement sans incorporer d'air, refroidir rapidement sous un courant d'eau froide pour éviter que l'air Atmosphérique ne pénètre dans le milieu et incuber à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ à l'étuve. Considérer comme résultat d'une spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice toute colonie noire entourée d'un halo noir.

La première lecture doit absolument être faire à 16 heures et la deuxième lecture se fera à 24 heures et la troisième et dernière (**Figure 10**).

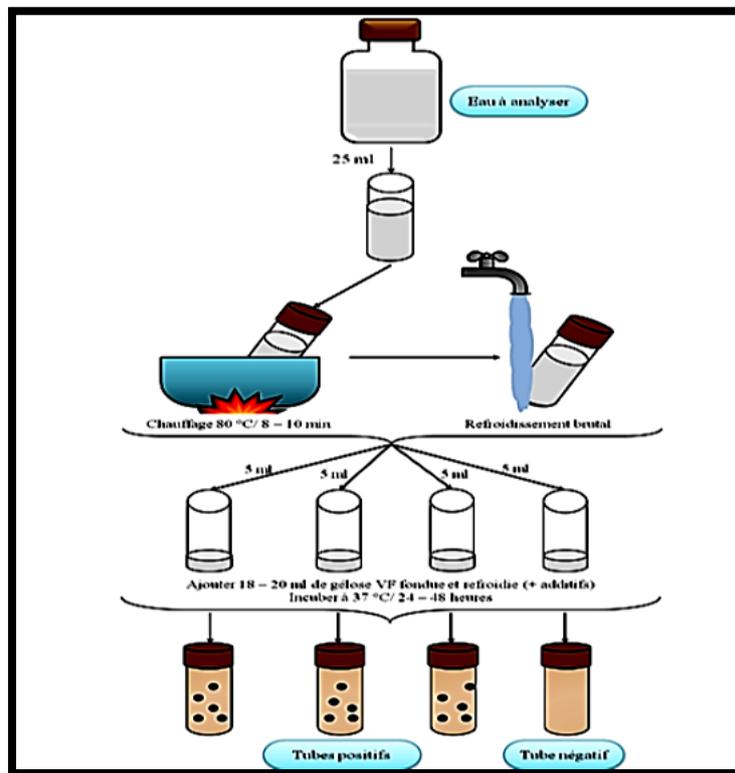


Figure 10 : Protocole de recherche et dénombrement des spores des bactéries

2.4. Recherche et identification des germes pathogènes

Il existe une grande variété de bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes (opportunistes) pour l'homme dans tous les types d'eaux. Celles-ci vivent ou survivent dans l'environnement, soit provenant des rejets humains, éliminées par des sujets malades ou des porteurs sains, soit étant autochtones et pouvant s'adapter à l'homme.

Les germes recherchés sont choisis, dans les limites des moyens disponibles. Les germes recherchés sont *Staphylocoques*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* et *Vibrio*.

Les milieux utilisés sont : Hektoen, milieu *Salmonella-Schigella* (SS), Chapman, et gélose nutritive (GN).

2.4.1. Recherche des Staphylocoques

Ce sont des bactéries qui se présentent sous forme de Cocci à Gram positive, sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin, ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase. Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à 36 ± 2 °C

sur un milieu sélectif Chapman au mannitol qui contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium

Le genre *Staphylococcus* est constitué de plusieurs espèces dont : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus Intermedius*.

Le milieu Chapman permet l'isolement sélectif de *Staphylococcus* sur la base d'une tolérance à La forte teneur en Na Cl, et la différenciation de l'espèce *Staphylococcus aureus* par la mise en évidence de la dégradation du mannitol. A partir de la solution mère, on ensemence par des stries toute la surface une boîte de Pétri contenant le milieu Chapman. Par la suite, la boîte est incubée à 37°C pendant 24 h. Après la période d'incubation spécifiée, les Staphylocoques à coagulase positive ou plus particulièrement *Staphylococcus aureus*, apparaissent sous forme de petites colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentées en jaune (fermentation du mannitol) ou en blanc. Les principaux caractères pour l'identification de *Staphylococcus* : La coloration de Gram, le test catalase, le test et la coagulase (**Figure 11**).

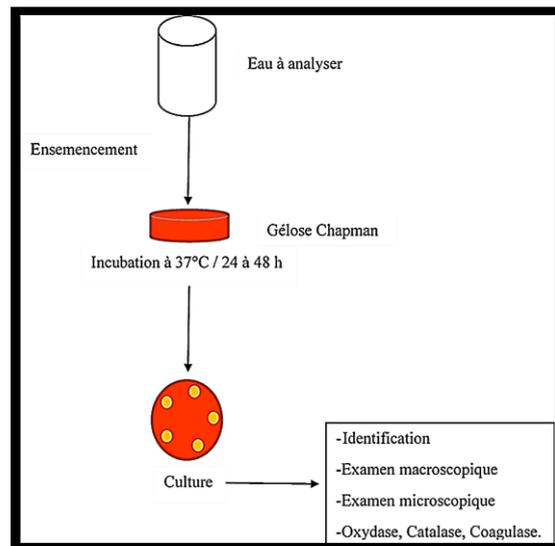


Figure 11 : Protocole opératoire de recherche et identification des staphylocoques dans les eaux

2.4.2. Recherche des Salmonelles

Les salmonelles sont des bacilles Gram négatifs, anaérobies facultatives, mobiles pour la plupart avec des flagelles périt riches, ne fermentant pas le lactose, mais fermentant le glucose avec production de gaz et de H₂S. Le premier enrichissement s'effectue sur le milieu de SFB

S/C réparti à raison de 10 ml par tube, puis on ensemence ce milieu par 2 ml d'eau à analyser, on incube par la suite à 37 °C pendant 16 à 24 heures. Le bouillon sélénite cystéine incubé la veille fera l'objet d'un enrichissement secondaire sur bouillon sélénite-cystéine en tubes à raison de 10 ml par tube. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures. Les géloses Hektoen et SS ont été ensemencés d'une part avec 0.1 ml de culture prélevée en milieu d'enrichissement et d'autre part avec 0.1 ml de chaque échantillon mère sans enrichissement préalable. L'incubation se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures

Sur la gélose Hektoen, les présumées colonies de salmonelles ont présenté une coloration bleue ou verte à centre noir tandis que sur la gélose SS et Mac Conkey, les colonies sont incolores transparentes et incolores à centre noir (**Figure 12**).

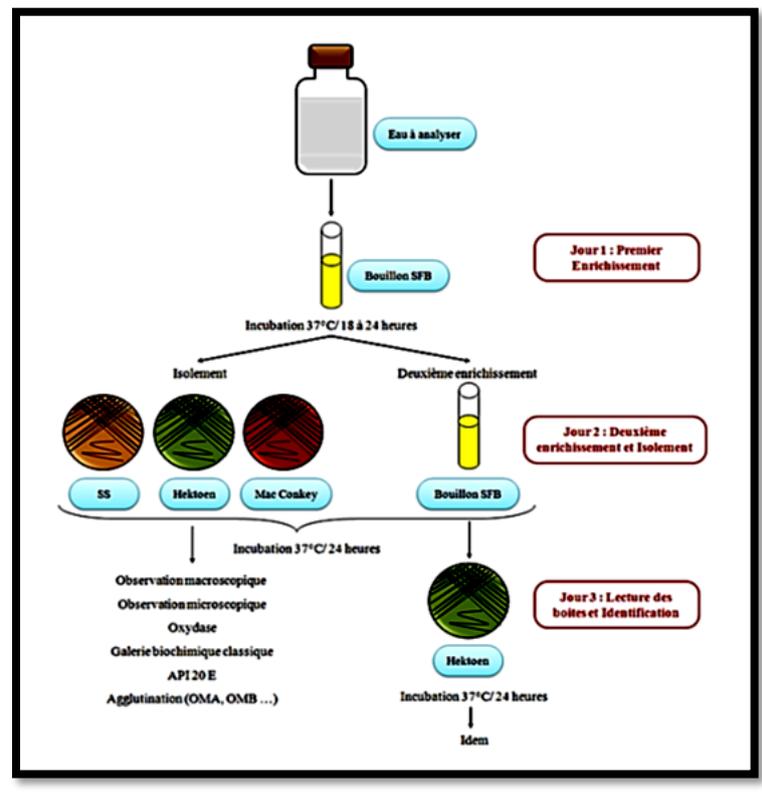


Figure 12 : Protocole opératoire de recherche et identification des salmonelles

2.4.3. Recherche des *Vibrio*

Les Vibrionaceae sont des bactéries qui se présentent sous forme de Bacilles à Gram Négatifs droits ou incurvés (BGN), très mobiles, possédant une oxydase, aéro-anaérobies facultatifs,

fermentant le glucose sans production de gaz ni d' H_2S , hautement pathogènes. La recherche de *Vibrio cholerae* se fait sur milieu d'enrichissement eau péptonée alcaline (EPA) et le repiquage sur gélose nutritive alcaline biliée GNAB. Les colonies de *Vibrio* sont fines, plate, transparente

Le premier enrichissement (Jour 1) s'effectue dans des tubes portés 10ml de milieu eau péptonée alcaline (EPA), Ce dernier sera par la suite incubé à 37°C pendant 18 à 24h. (Jour 2) Deuxième enrichissement et isolement ; A partir du premier enrichissement (EPA1) on effectue un premier isolement sur gélose GNAB1 nous réalisons un deuxième enrichissement en portant 1ml de flacon d'enrichissement sur eau peptone (EPA 2) on incube pendant 24h à 37°C. Jour 3 : Lecture des boites et identification (**Figure 13**).

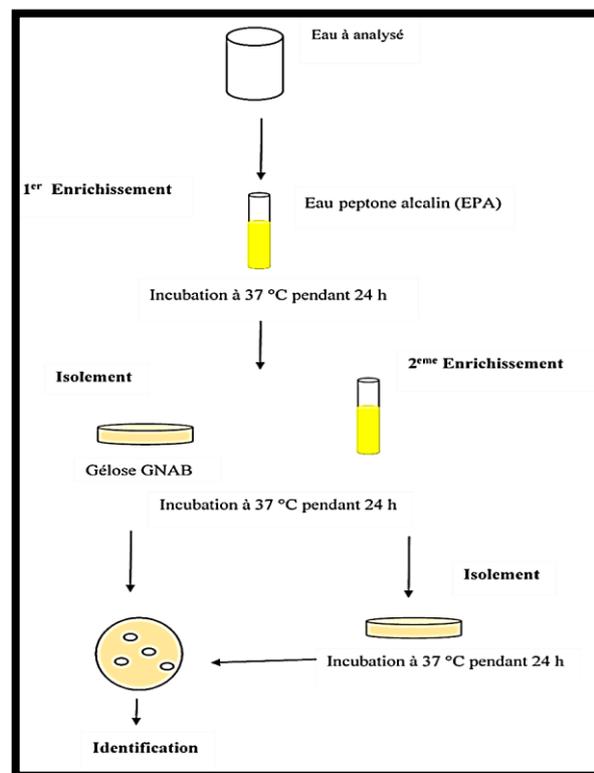


Figure 13 : Protocole opératoire de recherche et identification des *vibrio* dans les eaux

2.4.4. Recherche des Shigelles

Les Shigelles (bactéries du genre *Shigella*), sont des Enterobactériaceae, rencontrées exclusivement chez l'homme, elles sont toutes pathogènes et spécifiques du tube digestif. Morphologiquement ce sont des bacilles Gram négatifs, immobiles ; dépourvus de spores et de

capsules très proches de l'*E. Coli.* A partir de l'eau à analyser porter aseptiquement 0.1 ml et l'on étale à la surface de gélose Mac Conkey, gélose *Salmonella-Shigella* (gélose SS), et gélose Hektoen, par la méthode des quatre quadrants, puis les incubent à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24h et l'identification (Etat frais ; Coloration de Gram et la galerie biochimique API 20 E) (**Figure 14**).

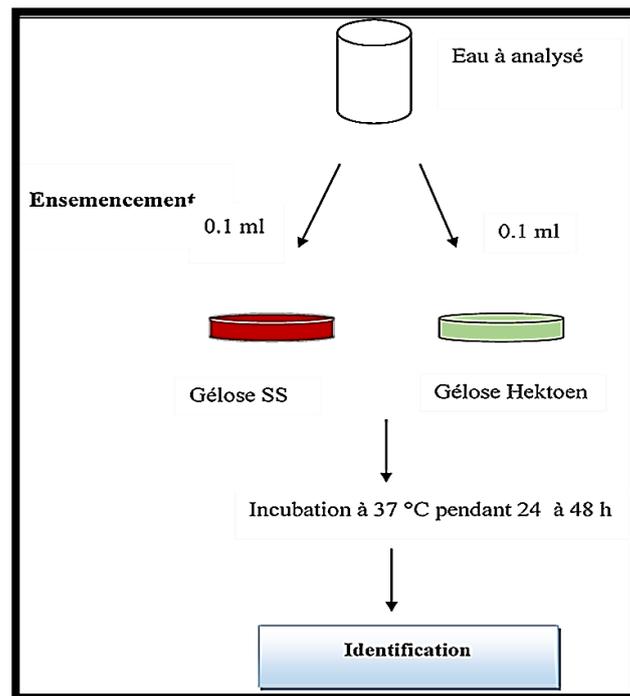


Figure 14 : Protocole opératoire de recherche et identification des Shigelles dans les eaux

2.4.5. Recherche des *Pseudomonas aeruginosa*

Le genre *Pseudomonas* de la famille des Pseudomonaceae comprend une soixantaine d'espèce pouvant répondre à la définition suivant : bacilles à Gram négative, aérobies stricts, capable de se multiplier sur milieu usuels, incapable de fermenter le glucose

A partir de l'eau à analyser porter aseptiquement deux gouttes et l'on étale à la surface de gélose type Cétrimide, alors que les colonies de bactéries lactose positives sont bleu ou bleu vert, et se fait des stries par une pipette Pasteur fermé et stérile, puis les incubent à 37°C pendant 24 à 48 h. Considérer comme colonie caractéristique toute colonie présentant une fluorescence. Du fait de la sélectivité du milieu Cétrimide, on peut suspecter les colonies présentes d'être

Pseudomonas. Dans tous les cas, il faudra réaliser une identification d'espèce (Coloration de Gram ; Examen directe à l'état frais, Oxydase... la recherche de la pyocyanine et de la pyoverdine (**Figure 15**).

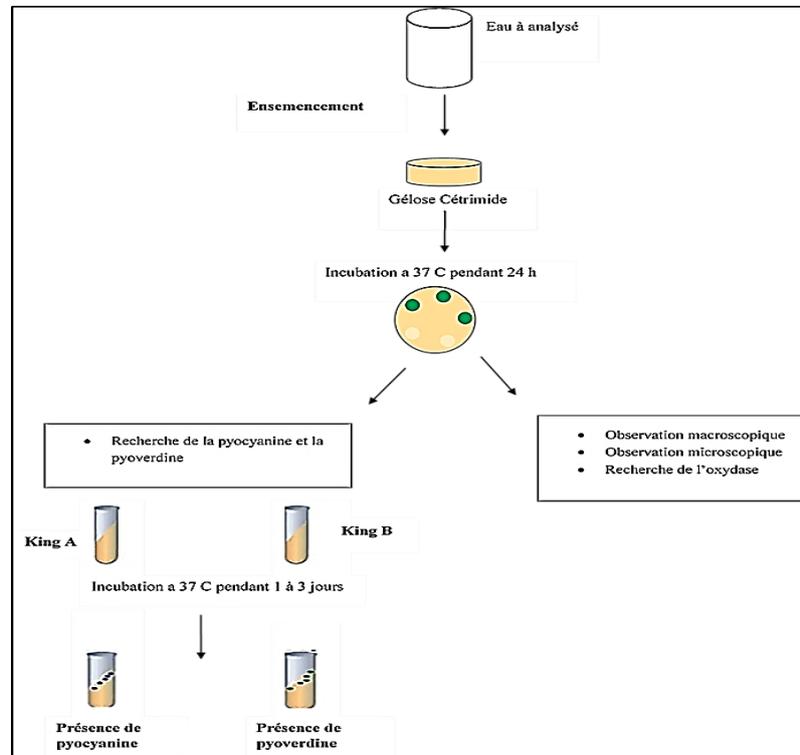


Figure15 : Protocole opératoire de recherche et identification de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux

2.5. Recherche des levures et moisissures

Les levures sont des champignons unicellulaires capables de se multiplier par multiplication végétative (bourgeoisement) ou par reproduction sexuée, et leurs classifications est très complexe et basée sur des caractères morphologiques (forme Sphérique, ovoïde cylindrique, triangulaire...). Les moisissures sont des organismes eucaryotes et la plupart sont pluricellulaires, qui se propagent par leurs spores. Ces éléments se développent en filaments appelés hyphes, lesquels, en s'agglomérant, forment le mycélium. Les levures et les moisissures pathogènes pour l'homme peuvent être isolées sur le milieu sélectif Sabouraud incliné et additionnée d'un ou plusieurs antibiotiques (chloramphénicol, gentamicine), pour limiter le

développement des autres germes surtout lorsque les prélèvements sont fortement contaminés par des bactéries.

Un ml de la solution mère et ses dilutions décimales ($10^{-1} \dots 10^{-5}$) est ensemencé en masse dans la gélose Sabouraud, ou bien 0,1 ml de la dilution choisie ($10^{-1} \dots 10^{-5}$) et ensemencé en surface dans la même gélose puis incubé à 28°C pendant 5 jours. Les colonies des levures et moisissures sont dénombrées séparément, selon la norme. Pour le dénombrement des colonies, faire la distinction entre les levures et les moisissures selon leur aspect macroscopique :

Les moisissures sont des colonies toujours pigmentées, à l'aspect velouté plus ou moins renflé ; pour les levures sont des colonies ressemblant à celle des bactéries, peuvent avoir des bords réguliers ou irréguliers, des formes convexes ou plates et sont souvent opaques. Multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution et les résultats sont exprimés en UFC/ml ou UFC/g de produit analysé (loi de KOSS). A partir des dilutions décimales

On utilise la méthode d'ensemencement par stries sur gélose coulée dans des boîtes de pétri contenant de la gélose Sabouraud.

- Coloration de bleu de méthylène
 - Déposer une goutte d'eau sur une lame de verre.
 - Prélever une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.
 - Dissocier soigneusement l'inoculum dans la goutte d'eau et laisser sécher.
 - La lame est recouverte de bleu de méthylène pendant 10 minutes, puis lavée doucement à l'eau.
- Observation microscopique à immersion (**Figure 16**)

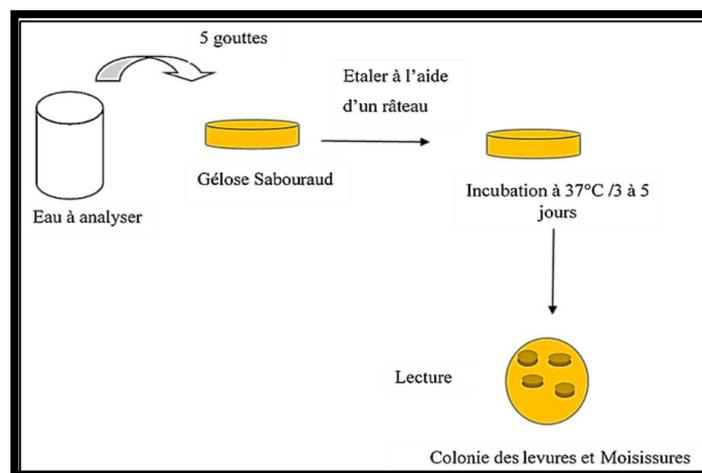


Figure 16 : Recherche et dénombrements des levures et moisissures

II. ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DU LAIT

1. Echantillonnage

Prélèvement (Usine / Point de vente)

Il existe des textes réglementaires et normes des opérations d'échantillonnage :

Chaque prélèvement doit être constitué au moins de 5 échantillons ($n= 5$) (si la qualité d'un lot doit être déterminée=> $n= 10$).

2. Technique de prélèvement

2.1. Lait en vrac

Prélèvement dans un bidon :

- Ouvrir le bidon ; homogénéiser
- Prélever à l'aide d'une grande pipette stérile (100 ml)
- Vider dans un flacon stérile (125 ml)

Prélèvement dans un bac :

- Homogénéiser par un agitateur en acier inoxydable (pendant 1 min)
- Le prélèvement est effectué à l'aide d'une louche en acier

Le prélèvement est effectué à l'aide d'une louche en acier inoxydable

2.2. Lait en poudre

Le prélèvement est effectué à l'aide d'une sonde stérile dans un endroit proche du centre du récipient.

3. Transport des échantillons

- Basse T° (4°C)
- A l'abri de l'humidité
- Le contrôle microbiologique doit être effectué au maximum 24 H après le prélèvement.

4. Analyse bactériologique

❖ Flore aérobie mésophile

- Plate Count Agar (PCA)
- Tryptocaséine Soja Agar (TSA)
- 3 jours à 30°C

❖ **Flore psychrotrophe**

- PCA, TSA - 0 à 5°C (7 à 10j)

❖ **Flore thermophile et thermotolérante**

- PCA, TSA ou milieux sélectifs
- 24 à 48 H, 55°C

❖ **Flore indologène** = qui produit l'indole (donnant des modifications du gout et de l'odeur)

- Préparer une dilution décimale (jusqu'à 10⁻³) en utilisant l'eau peptonée
- Incubation 48 H à 37°C
- Ajouter le réactif de Kovacs

❖ **Lecture** : nombre approximatif en examinant la plus grande dilution

10⁻³ : plus de 10³ germes indologènes / ml

10⁻² : entre 10² et 10³

10⁻¹ : entre 10 et 10²

Lait brut : mois de 10

❖ **Recherche des germes pathogènes**

- *Brucella* par des techniques immunologiques
- Entérobactéries pathogènes
- *Staphylococcus aureus*
- *Clostridium perfringens*
- *Listeria* : Enrichissement sur le bouillon Fraser, incubation à 30°C pendant 24H

Isolement sur le milieu Oxford/ Palcam

III. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES LAITS FERMENTES ET FROMAGES

1. Prélèvement et traitement des échantillons

1.1. Échantillonnage

1.1.1. Laits fermentés et desserts lactés frais

Des prélèvements peuvent être effectués au long de la chaîne de fabrication ou au niveau du produit fini. Dans le premier cas, un bon contrôle est réalisé lorsqu'au moins 2 échantillons sont prélevés toutes les 2 heures. Dans le cas de produits conditionnés tels que livrés à la vente, il faut prélever au hasard entre 0,5 et 2% des pièces pour avoir une bonne étude statistique le nombre conseillé de prélèvements est de 10. Pour réaliser une analyse dans le cadre d'un plan à 2 ou 3 classes, chaque prélèvement doit comporter 5 échantillons (lorsque $n = 5$).

1.1.2. Fromages

Les contrôles de fabrication doivent faire intervenir de nombreux prélèvements. Leur nature dépend du type de fromage, de la durée de la fabrication et de l'affinage. Pour une très bonne étude de l'évolution de la flore microbienne au cours de l'élaboration du fromage, il faut prévoir des prélèvements :

- Avant et pendant l'emprésurage (plusieurs prélèvements sur 24 heures) :

- Avant et après les opérations du type égouttage, salage, lavage, cuisson, pressage, piquage, plombage, et parfois pendant ces opérations (prélèvements tous les jours ou tous les 2 ou 3 jours) ;

- Pendant l'affinage et la conservation (prélèvement tous les 10 ou 15 jours ou tous les mois). Il est intéressant de confronter les résultats obtenus pour chaque prélèvement avec des déterminations chimiques, ainsi qu'avec des indications telles que la température d'entreposage, les techniques de fabrication utilisées et les qualités organoleptiques. Les contrôles peuvent aussi être réalisés pour comparer plusieurs lots de fabrication. En effet, les variations saisonnières de la composition du lait et des conditions météorologiques (comme la température ou l'humidité) ont une grande influence sur la flore des fromages et son évolution il est utile de connaître cette influence. Dans tous les cas, il est intéressant d'effectuer sur une même pièce de

fromage plusieurs prélèvements, en particulier lorsqu'il s'agit d'une grosse pièce ou lorsque le fromage présente une hétérogénéité de structure. Par exemple on pourra prélever : (- sur la surface par écouvillonnage, - un échantillon de croûte, - un échantillon du centre ou cœur du fromage. un échantillon intermédiaire). Lorsqu'il s'agit de contrôler la qualité générale du produit, il faut effectuer un prélèvement composite comportant la croûte dans le cas où elle est consommée ou ne la comportant pas si elle ne l'est pas.

1.2. Techniques de prélèvement

1.2.1. Laits fermentés et desserts lactés frais

Lorsque le produit est conditionné, chaque échantillon est constitué par un emballage plein et fermé. Lorsqu'il est en vrac, 10 à 100 mL (ou g) sont recueillis à l'aide d'une louche ou d'une cuillère stérile, après agitation. L'échantillon est alors placé dans un récipient stérile.

1.2.2. Fromages

Les techniques de prélèvement dépendent de la nature du fromage et du but recherché. Elles sont toujours réalisées dans les meilleures conditions d'asepsie (Fromages de grand format plus de 5 kg généralement à la sonde ; de format moyen à l'aide du couteau et de petit format à la sonde ou avec la louche)

3. Précautions de transport

Les échantillons doivent être maintenus à une température intérieure à +5 °C lorsqu'il s'agit de laits fermentés ou de fromages frais. Le délai séparant l'analyse du prélèvement ne doit pas en principe dépasser 24 heures.

❖ Laits fermentés

- Examen microscopique d'un frottis coloré au Gram, l'état frais,
- Dénombrement des coliformes totaux et fécaux
- Recherche de germes pathogènes (*Listeria*, *Salmonella*).
- Dénombrement de la flore totale (FAMT) sur PCA au lait et au BCP après 72 heures à 30 °C (dilution jusqu'à 10⁻⁹),
- Dénombrement de la flore indologène et putride (jusqu'à dilution 10⁻³),

- Dénombrement de la flore lactique sur lait gélosé à 30 °C.
- Dénombrement des streptocoques lactiques sur milieu de Chalmers à l'acétate de thallium à 30 ou 37 °C et des lactobacilles sur milieu de Rogosa,
- Dénombrement des germes citrate + sur gélose au jus de tomate au citrate et au lactate après 3 jours à 25 °C.
- Dénombrement des levures et moisissures sur milieu OGA,
- Dénombrement des contaminants non glucidolytiques sur tryptone-agar.

❖ **Fromages**

La législation distingue plusieurs catégories de fromage en fonction de leur nature (fromages à pâte dure et à pâte molle, fromage à pâte persillée, fromage non affiné, autre fromage, fromage de lactosérum frais ou sec) et du traitement du lait (lait traité thermiquement pasteurisé, lait cru ou thermisé).

- Dénombrement des coliformes sur BLBVB ou sur milieu gélosé VRBL à 30-37 °C, après 48 heures
- Dénombrement des coliformes totaux et fécaux
- Dénombrement de la flore indologène et putride,
- Dénombrement des levures et moisissures sur -milieu OGA –
- Dénombrement de la flore anaérobie totale, sporulée et butyrique,
- Recherche des staphylocoques pathogènes
- Recherche de *Salmonella* et de *Listeria monocytogenes*
- Dénombrement de la flore lactique totale, des streptocoques et des lactobacilles.
- Dénombrement des lactobacilles hétérofermentaires, des *Leuconostoc*, des germes citrate +, des propionibactéries
- Dénombrement des flores caséolytiques, lipo-lytiques, des *Brevibacterium*, etc.

IV. ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DU BEURRE ET LA MATIERE GRASSE

1. Prélèvement et préparation des échantillons

1.1. Échantillonnage

L'échantillonnage pour la crème est identique à celui pratiqué pour le lait. Pour le beurre ou la margarine, il est recommandé d'échantillonner 1% des pièces dans le cas d'un très grand nombre d'emballages. L'utilisation de tables de nombres au hasard n'est valable que pour des lots homogènes. Au point de vue réglementaire, les usines et ateliers d'emballage doivent être contrôlés au moins une fois par mois. Pour les autres produits, l'échantillonnage se fait selon les règles classiques, en particulier dans le cadre des plans à 2 et 3 classes.

1.2. Techniques de prélèvement

1.2.1. Beurre ou margarine en vrac

Les échantillons doivent être au minimum de 200 g ; ils sont formés à l'aide de deux ou trois prélèvements effectués à la sonde. Dans le cas de grands emballages, la sonde est enfoncée obliquement, puis verticalement jusqu'au fond ; dans le cas de mottes, elle l'est obliquement jusqu'au fond. La partie prélevée est fractionnée et introduite dans un flacon stérile à l'aide d'un couteau stérile. La portion externe est conservée pour reboucher le trou de prélèvement.

1.2.2. Beurre ou margarine conditionnés

L'échantillon est constitué de un ou plusieurs emballages intacts.

1.2.3. Autres matières grasses

Le prélèvement est effectué selon le cas à la sonde, à la cuillère métallique ou à la pipette en respectant les précautions classiques.

1.3. Conservation des échantillons

Pour les produits conservés au froid (beurre, margarine), les échantillons doivent être maintenus à +5 °C, sauf s'ils sont constitués par un récipient étanche. Dans ce cas, ainsi que pour tous les autres produits, la conservation et le transport au laboratoire peuvent avoir lieu à température ambiante. Le contrôle bactériologique doit intervenir dans les 24 heures.

1.4. Préparation des échantillons

1.4.1. Beurre et margarine

Plusieurs types d'analyse sont possibles : elles demandent une préparation d'échantillon différente. Première méthode Elle est décrite par le British Standard. L'échantillon est fondu au bain-marie à 45 °C puis homogénéisé par agitation manuelle. Une dilution au 1/10 est préparée en pipetant 10 mL de produit fondu et en les transférant dans un flacon de 200 mL contenant 90 mL de solution de Ringer au 1/4 additionnée de 0,1% de gélose pour stabiliser l'émulsion. Le diluant et les pipettes doivent être à 45 °C. Après homogénéisation, d'autres dilutions peuvent être préparées de la sorte. Les inoculations sont réalisées dans les 10 minutes qui suivent.

2. Méthodes d'analyse

Les dilutions sont généralement effectuées jusqu'à 10^{-4} .

- Dénombrement de la flore (FAMT) sur milieu PCA en boîtes de Pétri pendant 3 jours d'incubation à 30 °C. Il a peu d'intérêt dans le cas de produits anhydres.
- Colimétrie sur milieu liquide (milieu BLBVB, milieu laurylsulfate ou milieu de Mac Conkey) ou sur milieu solide (milieu au désoxycholate-lactose ou milieu VRBL) avec ensemencement dans la masse et incubation 24 heures à 30°C. *Escherichia coli* est caractérisé par les tests d'Eijkman ou de Mackenzie à partir de la colimétrie ou il est recherché directement sur des milieux au MUG. Pour certains auteurs, la numération des Entérobactéries (sur VRBG par exemple) est plus significative. Dans les beurres pasteurisés, la présence des coliformes est souvent l'indice d'un lavage réalisé avec une eau polluée.

2.1. Flores particulières

- Flore psychrophile : milieu PCA ou lait levuré gélosé incubés à 5 °C pendant 7 à 10 jours ;
- Flore lipolytique mésophile milieu au bleu Victoria ou gélosé à la tributyrine incubés 3 jours à 30 °C ; psychrophile : mêmes milieux incubés 7 à 10 jours à 5 °C ;
- Flore caséolytique: gélose au caséinate ou lait gélosé incubés 5 jours à 30 °C. La caséolyse peut être visualisée en utilisant la révélation au réactif de Frazier ;

- Flore indologène : eau peptonée incubée 3 jours à 30 °C avec révélation par la méthode classique ;
- Flore des levures et moisissures sur milieu OGA 3 a 5 jours à 25 °C.

On effectuera pour une étude sanitaire les tests indiqués pour la crème, soit :

- Epreuve de la phosphatase pour le beurre pasteurisé,
- Colimétrie sur milieu solide ou liquide (à 30°C) avec caractérisation d'*Escherichia coli*
- Recherche des germes pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* et *staphylocoques*).
- Dénombrement de la flore «globale» (FAMT) sur PCA, à 30 °C (dilutions jusqu'à 10⁻⁴),
- Dénombrement de la flore lipolytique sur gélose au bleu Victoria, 3 jours à 30 °C
- Dénombrement de la flore caséolytique, 3 jours à 30 °C (dilutions jusqu'à 10⁻³),
- Dénombrement des levures et moisissures sur milieu OGA, 3 jours à 25 °C
- Dénombrement des indologènes (dilutions jusqu'à 10⁻³),
- Dénombrement de la flore psychrophile sur PCA, 10 jours à 5 °C (dilutions jusqu'à 10⁻⁴).

VI. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES BOISSONS ALCOOLISEES ET NON ALCOOLISEES

Les boissons non alcoolisées sont essentiellement des produits à base de fruits ou de légumes non fermentés. On distingue plusieurs catégories : jus de fruits ou de légumes, Sirop de fruits. Et sodas et limonades.

1. Boissons non alcoolisées

Les germes présents dans les jus de fruits et les autres boissons hygiéniques non alcoolisées proviennent en grande partie de la matière première. Le nombre de microorganismes dans les jus fraîchement pressés est souvent très élevé ; il dépend de l'état des fruits (maturation, propreté) et du type d'extraction. On trouve des levures, des spores de moisissures et des bactéries (*Archromobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, etc..).

D'autres contaminations sont apportées par le sucre et les sirops sucrés (levures osmophiles, moisissures, *Leuconostoc*), par le matériel utilisé pour la fabrication (levures, moisissures) et par les manipulations (*Micrococcus* et germe des contaminations fécales)

De nombreuses variétés de germes peuvent donc contaminer les boissons non alcoolisées. Les conditions particulières qu'ils rencontrent dans ces produits font qu'une grande partie d'entre eux est incapable de se développer. Le pH est bas (aux alentours de 3) et il règne dans certains produits une forte pression osmotique due à la présence de sucre. Seules les germes acidophiles et osmophiles pourront se multiplier. La présence de CO₂ dans les produits gazeux est un autre facteur sélectif. Les germes pathogènes qui ne sont pas T acidophiles se trouvent dans des conditions défavorables et disparaissent rapidement : les boissons à base de fruit ne sont donc pas dangereuses du point de vue sanitaire.

La flore banale acidophile et osmophile peut entraîner un certain nombre d'altérations malgré les traitements de stabilisation.

Une fermentation alcoolique peut être provoquée par des levures qui appartiennent le plus souvent au genre *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*; *S. carisbergensis* ou *uvarum*, *S. cidifaciens*, etc), parfois à d'autres genres (*Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Candida*): on distingue souvent les

levures à fermentation rapide (essentiellement les *Saccharomyces*) et celles à fermentation lente (les autres).

Dans les sirops concentrés, la fermentation est le fait de levures osmophiles, *Zygosaccharomyces baillii* variété *osmophilus* et *Zygosaccharomyces rouxii*. L'altération se manifeste par un goût alcoolisé et surtout par un intense dégagement gazeux qui rend la boisson pétillante et qui peut faire gonfler ou éclater les emballages. L'action des levures se manifeste lorsque la température n'excède pas 35°C. Dans certains cas, la fermentation alcoolique peut s'accompagner d'une production importante d'acides volatils, de la formation de troubles ou de dépôts ainsi que de l'apparition d'odeurs et de goûts anormaux. Des levures non fermentantes (*Pichia membranaefaciens*) peuvent également se développer en occasionnant un trouble.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires (*Lactobacillus pastorianus*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*) et homofermentaires (*Lactobacillus arabinosus*, *Lactobacillus leichmanii*, *Microbacterium*) peuvent fermenter les sucres et entraîner l'apparition des goûts, d'odeurs anormales et le cas échéant de gaz. Certaines bactéries lactiques comme *Lactobacillus pastorianus* dégradent les acides organiques (acides malique et acide tartrique). *Leuconostoc citrovorum* peut libérer de grandes quantités de diacétyle, ce qui entraîne un goût de beurre.

Des *Clostridium* butyriques peuvent se développer dans les jus de tomates dont le pH n'est pas très élevé (pH 4,2). Ils provoquent la formation d'une grande quantité de gaz. Les *Acetobacter* peuvent entraîner un goût de « sûr >>> par fermentation acétique de même que les *Gluconobacter*.

De nombreux germes sont susceptibles d'entraîner des modifications de texture. Les moisissures se développent lorsque les conditions d'aération le permettent. Certaines (*Byssoschlamys*) sont très pectinolytiques et peuvent clarifier des jus naturellement troubles ; d'autres au contraire donnent des troubles, des flocons, un brunissement des jus (*Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*). certaines bactéries lactiques peuvent donner une viscosité anormale, un aspect huileux, ou une gélification par l'excrétion de polysaccharides (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*).

Toutes les altérations mentionnées ici sont peu dangereuses du point de vue sanitaire, mais elles ont une grande importance du point de vue économique. Elles sont souvent très lentes et peuvent apparaître après un temps de latence important. Dans d'autres cas, au contraire, elles apparaissent très rapidement. La prévention s'effectue par des traitements de pasteurisation, filtration, éventuellement augmentation de la pression osmotique (sucre) et abaissement du pH.

2. Techniques de prélèvement

Il n'existe pas de méthodes particulières. Pour les produits embouteillés, les schémas classiques d'échantillonnage sont applicables. Outre les flacons, bouteilles ou bidons anormaux qui sont prélevés à part, des contrôles systématiques sont réalisés par des sondages basés sur des données statistiques ; dans ce cas, un minimum de 5 (ou 10) échantillons est nécessaire. Pour réaliser une analyse dans le cadre d'un plan à 2 ou 3 classes, chaque prélèvement doit comporter 5 échantillons (lorsque $n=5$). Dans le cas où un étuvage est nécessaire, deux éléments au moins sont prévus par échantillon. Pour les produits en vrac, des prélèvements sont effectués à tous les stades de la fabrication et des traitements. Les prélèvements sont réalisés de façon classique.

3. Techniques d'analyse microbiologique des boissons non alcoolisées

3.1. Essais de stabilité

Dans le cas de produits conditionnés, l'essai de stabilité peut être réalisé sur un emballage tel qu'il est livré à la vente : il consiste en une incubation à 30°C pendant au moins 15 jours. Les produits destinés aux pays chauds doivent être incubés à des températures supérieures. L'aspect général de l'échantillon est examiné de façon à déceler une éventuelle altération (déformation d'un bidon métallique, apparition d'un trouble, ect...).Après ouverture, l'analyse microbiologique classique peut-être entreprise, ainsi que les analyses physico-chimiques et organoleptiques. Cet essai de stabilité peut également s'effectuer sur une partie aliquote de l'échantillon (100 ml) que l'on transvase aseptiquement dans un erlenmeyer stérile. Il est dans ce cas possible d'effectuer une incubation avec agitation, ce qui peut favoriser la détection des contaminants dangereux. Dans le cas de jus concentrés, il est intéressant de procéder aussi à un essai de stabilité sur le jus reconstitué par dilution.

3.2. Examen microscopique

L'étude directe n'est pas possible lors des examens de routine en raison du très faible nombre de germes généralement présents. Dans le cas de fortes altérations, il peut permettre l'orientation des recherches ; il est intéressant d'examiner les dépôts formés. Des méthodes de concentration sont utilisables (centrifugation), mais elles sont peu employées et peuvent être gênées par la viscosité de certains produits.

3.3. Analyse des jus de fruits (et légumes), limonades, sodas etc...

Elle ne s'applique qu'à la recherche et au dénombrement de germes non pathogènes, contrairement à ce qui était envisagé pour les aliments précédents.

3.3.1. Préparation de l'échantillon

Dans le cas des boissons gazeuses, l'analyse s'effectue après dégazage. Environ 50 ml de produit sont versés stérilement dans un erlenmeyer de 100 ml bouché coton et contenant quelques bille de verre. Le gaz dissous est éliminé par quelques minutes d'agitation à température ambiante. L'utilisation d'une fiole à vide stérile peut faciliter cette opération. Il est intéressant, dans le cas de produits très acides (ce qui est fréquent), d'effectuer le dénombrement de la flore totale sur le produit neutralisé. Un échantillon de 50 ml de produit est prélevé aseptiquement et sert à déterminer la quantité d'agent neutralisant nécessaire. La détermination s'effectue au pH-mètre à l'aide de phosphate tripotassique à 20%. On note la quantité nécessaire pour obtenir un pH égal à 7, il suffit ensuite d'ajouter à l'échantillon destiné à l'analyse la quantité nécessaire de phosphate tripotassique stérile.

3.3.2. Dénombrement des constituants de la flore par culture classique en milieu gélosé

Dans la majorité des contrôles de routine, on étudie seulement la flore totale et la flore fongique.

La flore totale (flore aérobie mésophile qui inclue certaines levures et moisissures) est dénombrée sur milieu malt gélosé, sur milieu PCA ou sur milieu TDYM. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 3 à 7 jours après ensemencement en surface de 0,1 ml de produit ou de ses dilutions dans l'eau physiologique ou le milieu tryptone-sel. Lorsque les moisissures

sont abondantes, elles peuvent envahir le milieu et gêner l'interprétation de l'analyse. Il est conseillé dans ce cas d'ensemencer 1 ml de produit dans la masse de la gélose.

La flore fongique (levures et moisissures) est dénombrée sur des milieux classiques milieux PDA (pomme de terre dextrose agar) ou malt gélosé acidifiés à pH 3,5, milieu OGA oxytetracycline, gélose glucosée au chloramphenicol, gélose mycofile). Après ensemencement en surface (plutôt qu'en profondeur), les boîtes sont incubées à 25 ou 30 °C pendant 3 à 10 jours. Il est possible de différencier levures et moisissures par emploi de milieux différents : milieux ci-dessus additionnés de 0.03% de propionate pour isoler les levures et milieu de Litmann pour isoler les moisissures. D'autres types de flores peuvent être étudiés dans des cas spéciaux. Les germes osmophiles sont dénombrés par ensemencement d'un milieu malt gélosé additionné de 20% de glucose. L'ensemencement est réalisé dans la masse et les boîtes sont incubées à 25°C. Selon le pH du milieu, on pourra sélectionner divers types de flore (à pH 3,5, la flore fongique ; à pH 5,4, la flore totale).

Les coliformes peuvent être dénombrés en milieu solide sur gélose DL ou VRBL (ensemencement dans la masse) ou en milieu liquide sur bouillon laurysulfate puis BLBVB avec incubation à 30°C (ou 44°C pour les coliformes thermotolérants). Il s'agit là d'un test de qualité microbiologique générale. On peut le remplacer par la numération des Entérobactéries totales sur gélose VRBG ou sur bouillon EE de Mossel. La recherche d'*Escherichia coli* est réalisée à partir des tubes positifs de la colimétrie par repiquage sur EMB et test de production d'indole, ou de manière plus « ciblée » sur un milieu au MUG à 44°C (par exemple VRBL-MUG). La recherche des *Salmonella* se fait sur milieu gélosé d'Edel-Kapelmacher, après pré-enrichissement sur eau peptonnée tamponnée et enrichissement sur les bouillons de Rappaport-Vassiliadis et sélénite-cystine ; une identification biochimique et/ou immunologique est nécessaire.

Les spores mésophiles et thermophiles peuvent être dénombrées après un traitement thermique de sélection. Un échantillon de 10 ml est chauffé pendant 10 minutes à 80°C puis refroidi rapidement. La numération s'effectue partir de la liquide face (0,1 ml) des milieux DTA ou tryptone-soja contenant 0,2% d'amidon. Selon la température d'incubation, on dénumbrera les mésophiles (30°C) ou les thermophiles (55°C). Les spores très résistantes sont sélectionnées

par un traitement thermique de 5 minutes à 100°C. Pour lise la gélose de Mossel et pour *Clostridium perfringens*, la gélose TSC avec repiquage sur bouillon thioglycolate résazurine.

La mise en évidence des bactéries lactiques (milieu MRS à pH 6,5 incubation à 30°C) et des *Leuconostoc* peut être utile pour l'étude des altérations et celles des entérocoques (bouillons de Rothe puis Litsky) et staphylocoques (bouillon de Baird-Parker puis coagulase) pour celle de la qualité hygiénique. Les *Clostridium* butyriques sont parfois recherchés.

La gélose WL-actidione (ou WLN-actidione ou WLD) est fréquemment utilisée pour dénombrer les bactéries des boissons : ce milieu, qui contient de l'actidione à 4mg/L pour inhiber les levures, permet d'isoler en aérobiose *Flavobacterium* et *Acetobacter* et en anaérobiose les bactéries lactiques. La gélose à l'extrait d'orange permet la numération des germes acidophiles des jus de fruits.

3.3.3. Méthodes par filtration

Les méthodes par filtration (comptage des cellules ou des micro-colonies au microscope, comptage classique des colonies avec ou sans marqueur coloré ou fluorescent) sont particulièrement adaptées aux produits à faible concentration microbienne et aux analyses de routine. La plupart des analyses décrites plus haut peuvent être réalisées par ces méthodes à condition que la viscosité ou la teneur des produits en particules le permettent. On peut pallier cet inconvénient en ne filtrant les produits visqueux qu'après dilution (diluante additionnée de 0,3% de Tween 80). Il est également possible de préfiltrer les produits soit avant, soit pendant la filtration : il est alors conseillé de pratiquer un rinçage de la membrane de préfiltration pour recueillir les germes pouvant se trouver retenus. Enfin, on peut utiliser des membranes de porosité différente selon la flore à dénombrer. Pour la numération des levures et des spores de moisissures, on peut employer des filtres à pores de 0,8 à 1,2 µm (on peut aller jusqu'à 3µm sans trop de pertes dans les cas de produits à fort pouvoir 'colmatant >>) et travailler avec le produit brut. Pour les bactéries, il est nécessaire d'utiliser des filtres à pores de 0,45µm et de travailler sur des dilutions (au 1/10°, parfois plus). Le volume de filtration varie de 25 à 500 ml. Les milieux cités plus haut ou les autres milieux classiques sont utilisables dans les conditions d'incubation indiquées plus haut. Notons qu'il existe des milieux spéciaux recommandés par les divers fabricants de membrane.

La filtration sur membrane est très utile lorsque l'on désire mettre en évidence un petit nombre de germes en présence de conservateurs. Elle permet en effet d'effectuer un véritable (lavage) des cellules recueillies avant culture. Il suffit de faire passer au travers du filtre, après le produit à analyser, un liquide de rinçage stérile, par exemple du milieu tryptone-sel à 0,3% de Tween 80.

3.3.4. Autres méthodes

- ✓ Le dosage de l'ATP par le système luciférase/luciférine (bioluminescence) et la mesure de la modification du potentiel redox (activité réductrice) sont utilisables.
- ✓ Le test de viabilité en cytométrie de flux est également employé pour les levures des jus de fruits.

3.4. Analyse des concentrés et extraits de fruits (et légumes)

La caractéristique principale de ces produits est la forte pression osmotique qui y règne et qui conduit à la sélection d'une flore osmophile.

3.4.1. Préparation de l'échantillon

Selon la nature du produit ou celle des analyses à effectuer, l'échantillon doit être utilisé tel quel ou dilué. La flore osmophile est dénombrée de préférence à partir du produit pur. Pour les extraits de fruits, le jus de départ est reconstitué à l'aide d'eau distillée. Les dénombrements sur membrane sont ici particulièrement difficiles en raison de la forte viscosité des produits ; cette méthode n'est utilisable que pour les produits contenant suffisamment de germes pour qu'ils puissent être détectés dans un faible volume ou dans des dilutions. Dans les cas de produits riches en pulpe, elle peut être impossible.

Le dénombrement de la flore totale peut être réalisé après neutralisation. Cette neutralisation s'effectue comme décrit plus haut sur une dilution au 1/10^o.

3.4.2. Dénombrement de la flore

Il s'effectue le plus souvent par culture classique sur milieu gélosé ou si cela est possible sur membrane. Les analyses décrites sont très voisines de celles décrites pour les jus de fruits. On dénombre pratiquement dans tous les cas :

- La flore aérobie mésophile totale sur 25 ml de dilution 1/10° neutralisée lorsque l'in utilise la méthode par filtration ; à partir de 0,1 ml ou 1 ml de produit brut ou de ses dilutions par culture classique (incubation pendant 3 à 7 jours à 30°C) ;
- La flore fongique sur 100 ml de produit brut par filtration mais avec une membrane à gros pores, ou à partir de 1 ml ou 5 ml de produit brut ou de ses dilutions par culture classique (incubation 3 à 10 jours à 25°C). Lorsque le produit contient des conservateurs, on ne pratique généralement les dénombrements qu'à partir des dilutions. Pour une étude plus complète de la flore, on dénombre en outre.
- La flore osmophile totale. On utilise des milieux à forte pression osmotique, par exemple les milieux gélosés, levurés, glucosés à 37,5% ($a_w = 0,92$) à 50% ($a_w = 0,84$) ou à 60% ($a_w = 0,80$), dits (honey agar), ou la gélose de Whalley. Le dénombrement s'effectue à partir de 1 à 5 ml de produit brut ou à partir de dilutions. Certains auteurs recommandent d'effectuer les dilutions nécessaires dans l'eau glucosée à 20% pour ne pas 'choquer les germes habitués à une forte pression osmotique, en particulier lorsque la dilution dépasse 1/10°. Le rinçage des membranes de filtration est effectué dans le même esprit à l'aide d'une solution à 20% de glucose, 0,5% d'extrait de levure et 0,3% de Tween 80, lorsque l'on désire éliminer des traces de conservateurs
- Les spores mésophiles et exceptionnellement les coliformes, les entérocoques et les staphylocoques.
- Les méthodes de cytométrie de flux et le dosage de l'ATP sont utilisables.

VI. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES CONSERVES

1. Prélèvement

- Au point de vente => au hasard. Noter : les conditions d'apparition du défaut, les détails de fabrication, les conditions de stockage
 - Au laboratoire
- La surface de la boîte est nettoyée à l'aide coton imbibé d'alcool puis flambée à l'alcool ;
- Agiter pour homogénéiser le contenu ;
- Ouvrir dans des conditions d'aseptie ;
- Le prélèvement s'effectue selon le cas à la pipette Pasteur / pipette harpon, à la spatule, à la sonde.

2. Examen organoleptique et physico-chimique

- Noter soigneusement : l'aspect, la texture, la couleur, l'odeur mais il ne faut jamais goûter ;
- Mesurer le pH à l'aide d'un pH mètre après homogénéisation.

3. Examen microscopique

On peut réaliser un frottis à partir d'un produit solide ou liquide (si le produit est gras, il faut dégraisser au xylol)

4. Analyse microbiologique

4.1. Préparation d'une suspension

- Produit liquide : l'analyse s'effectue directement
- Produit solide : Un échantillon de 25 g est broyé dans 100 ml d'eau peptonée ou tryptone-sel puis une série de dilution doit être réalisée (jusqu'à 10^{-6})

4.2. Dénombrement

- **Flore aérobie mésophile totale :**
 - Ensemencement en surface de 0.1 ml sur PCA ou tryptone-agar
 - Incubation à 30°C pendant 3 jours
- **Flore sporulée mésophile et thermophile :**

- Traitement thermique du produit ou de sa dilution (5 minutes à 80°C)
- Inoculation de 0.1 ml en surface sur PCA ou sur DTB-amidon
- Incubation à 30°C pendant 72 H pour les mésophiles et à 55°C pendant 48H pour les thermophiles
 - ***Clostridium* sulfito-réducteurs** : recherchés sur le milieu VF sulfité après 48 H d'incubation à 37°C
 - **Levures et moisissures** sont dénombrées sur la gélose Malt agar à pH 3,5 ou 4,5 par ensemencement de 0,1 ml. L'incubation s'effectue pendant 5 jours à 25°C
 - **Lactobacilles** sont dénombrés sur la gélose MRS ; l'incubation s'effectue à 30°C pendant 5j.
 - **Les coliformes**
 - **Les salmonelles**
 - **Les staphylocoques**

Remarque : l'analyse des conserves nécessite au moins trois boîtes identiques :

- Une boîte est examinée immédiatement : elle sert de témoin
- Une boîte est incubée 7 j à 55°C puis examinée
- Une boîte est incubée 21 j à 30°C puis examinée

Les boîtes incubées sont refroidies par un séjour à 4°C ; lorsqu'on ne décèle aucune modification de texture ou d'odeur => on considère que la conserve est stérile au moins au sens « commercial »

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait Abdelouahab N. (2001) Microbiologie alimentaire. Alger. Office des Publications Universitaires. Algérie.
- Benhalima L. (2019). Microbiologie alimentaire, Support du cours de Microbiologie alimentaire, Université 8 mai 1945-Guelma, 34 p.
- Bonnefoy C, Leyral Guy, Guillet F et Bourdais E V. 2002. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires édition bio-sciences et techniques, Paris
- Bourgeois, Mesclé, Zucca.1988. Microbiologie alimentaire, vol 1. ed. Lavoisier, Paris.
- Charles A, GUY L, 1997. Abrégé de biochimie alimentaire. 4ème édition. Masson éd. Paris. 248 p.
- Cuq, J.L. (2007). Microbiologie Alimentaire : Les relations microorganismes /aliments/consommateurs, Département Sciences et Technologies des Industries Alimentaires 4^{ème} année. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc. 133p.
- De W Blackburn, C. (2006). Food spoilage microorganisms. Woodhead Publishing. 712p.
- Federighi M. (2005). Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments. 2ed. Economica. Paris, pp 224-233.
- Galzy P. 1980. Analyse microbiologique dans les industries alimentaires.
- Gueroui Y. (2018). Aspect Microbiologique de la Sécurité et de la Qualité, Polycopie du cours Qualité des produits et sécurité alimentaire, Université 8 mai 1945-Guelma, 105 p.
- Guiraud, J. P. (2012). Microbiologie Alimentaire. France. DUNOD. p 140, 141.
- Hygiène et sécurité alimentaires édition bio-sciences et techniques, Paris.
- Jeantet R., 2001. Génie des procédés appliqué à l'industrie alimentaire.
- leclerc H. 1995. Microbiologie générale. Edition. Doin Paris.
- Leyral, G., Vierling, E. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. Wolters Kluwer, France. 287p.
- Mafart P., 2004. Génie industriel alimentaire.
- Meyer, A. (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés.
- Oudot C., 1999. La transformation des aliments. Edition Techni-plus. 79 pages.
- Pelmont J. 1993. Bactéries et environnement adaptations physiques. Presses universitaire de Grenoble.

- Prescott L.M., J.P. Harley, D. Klein, J.M. Wiley, L.M. Sherwood et C.J. Woolverton. (2010). Microbiologie. 3^e édition, Groupe de Boeck s.a. Bruxelles.