الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire

وزارة التعليم و العالي البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

المدرسة الوطنية للبيطرة
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE – ALGER

MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE MAGISTERE EN SCIENCES VETERINAIRES

Option : Hygiène et Sécurité alimentaire

THEME

EFFET INHIBITEUR DE BACTERIES LACTIQUES ISOLEES DE VIANDES BOVINES SUR DES GERMES INDESIRABLES

Présenté par : **BENBERNOU Sennia**
Docteur vétérinaire

Jury :

♦ **Président:**	**Dr. A. BOUAKANE**	**Maître de conférences**	**E.N.V Alger**
♦ **Promoteur:**	**Pr. N-E. KARAM**	**Professeur**	**Université d'Oran**
♦ **Co-Promoteur:**	**Dr. K. HARHOURA**	**Chargé de cours**	**E.N.V Alger**
♦ **Examinateurs:**	**Dr. Y. TEBBANI**	**Maître de conférences**	**I.S.V Blida**
	Dr. B. BENDEDDOUCHE	**Maître de conférences**	**E.N.V Alger**

Année Universitaire 2006/2007

A celui qui a créé toute chose avec perfection,
Qui détient la clé de tous les mystères,
Qui a appris à l'homme comment les découvrir.

La réalisation de ce travail a été effectuée d'abord grâce à Dieu
Qui nous a donné la force et le courage de surmonter toutes les difficultés
auxquelles nous avons été confrontées.

REMERCIEMENTS

****

Mes profonds et sincères remerciements :

A Monsieur le Professeur N-E. KARAM et au Docteur K. HARHOURA, qui ont mis toute leur expérience et leur savoir à notre disposition et m'ont encouragé avec patience à l'élaboration de ce mémoire.

Au Docteur A. BOUAKANE, Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire- Alger pour avoir accepté de présider mon Jury d'examination.

Aux Docteur Y. TEBBANI et au Docteur B. BENDEDDOUCHE, examinateurs pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

J'exprime mes sentiments de gratitude et de reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont assistée, pour la bienveillance qu'elles ont manifestée à mon égard et pour l'intérêt qu'elles ont apporté à mon travail.

A Monsieur le Professeur L. GHEZLANE, Directeur l'E.N.V - Alger

Au Docteur M. AISSI, à qui j'exprime toute ma considération pour ses précieux conseils, sa grande gentillesse et surtout son soutien moral.

A tous les enseignants de cette Ecole qui ont participé à ma formation.

Mes vifs remerciements et toute ma reconnaissance vont aussi,
Pour leur aide et leur contribution durant toute mes expérimentations,

Au Docteur A. BOUHBAL, Directeur Général de l'I.N.M.V, ainsi qu'au Docteur A. SALAH, qui n'ont pas hésité à me soutenir avec tous les moyens dont ils disposent.

A M. A. KHARROUBI, directeur du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Mostaganem.

A M. M. BENYAMINA, responsable du service d'hygiène alimentaire et tout le personnel du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Mostaganem pour leur disponibilité et leur précieuse aide.

A Mme Z. OTHMANE, directrice du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Tiaret

Au Dr GHZIEL, directrice du laboratoire d'hygiène de la Wilaya d'Oran.

A M. Dj. BOUZIANE, responsable du laboratoire de microbiologie de l'Université de Mostaganem

Au Dr. F. DALACHE, Maître de conférences du Département de Biologie à l'Université de Mostaganem

A Mme K. DJELLOUL, enseignante au département de biologie à l'Université de Mostaganem

A M. F.BAGHOUSSI, technicien vétérinaire au L.V.R Mostaganem

A tout le personnel de l'Ecole Nationale Vétérinaire - Alger, en particulier celui de la bibliothèque, pour sa précieuse disponibilité et sa grande patience.

A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Que toutes les personnes dont les noms n'ont pas été cités
veuillent trouver l'expression de ma reconnaissance

****
****
****
****
*****
***
*

DEDICACES

****

Je dédie ce travail

A la mémoire de mes très chers parents qui m'ont appris à ne jamais me décourager et toujours progresser dans la connaissance.

En témoignage de toute mon affection.
En hommage à leur grand sacrifice et leur amour pour nous.

A mon très cher époux AOUED qui m'a encouragé et oeuvré pour ma réussite.

A mes frères ainsi qu'à leur femmes et leur enfants.

A tous les membres de ma belle-famille.

A ma meilleure amie Madame KESSAI Keltoum, son mari Achour et leurs enfants Fatima et Mouloud.

A mes amies Fatima OUDDAHI, Daouia BENGANA et toute leur famille.

A ma cousine Attika et toute la famille BENBERNOU.

A MM.B. MAHMOUDI, MM. M.BOUBEKRI et MM. ISLAMI.

A tous (es) mes amis (es) de la promotion 1990 de l'Ecole Nationale Vétérinaire Alger

EFFET INHIBITEUR DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES DES VIANDES BOVINES SUR LES GERMES INDESIRABLES

SOMMAIRE

1 - I N T R O D U C T I O N 1

1-1-GENERALITES SUR LES VIANDES 2

1-1-1 – Définitions – importance de la viande 2

1-1-2 - Transformation du muscle en viande 4

1-1-3 - Caractéristiques de la viande 6

1-1-4 – Composition de la viande 7

1-1-5 – Microflore de la viande 8

1-1-5.1- Contamination initiale 10

1-1-5.2- La contamination profonde 12

1-1-5.3- Les altérations de la viande 12

1-1-5.4- Les principaux genres bactériens recherchés dans la viande 13

1-2 - LES BACTERIES LACTIQUES 16

1-2-1 –Définition – Découverte des bactéries lactiques 16

1-2-2 - Propriétés générales des bactéries lactiques 17

1-2-3 -Rôle des bactéries lactiques 17

1-2-4 - Classification des bactéries lactiques 18

1-2-5 - Les bactéries lactiques des produits carnés 21

1-2-5.1 – Les lactobacilles 22

1-2-5.2 – Les carnobactériums 27

1-2-6 - Identification des bactéries lactiques 30

1-2-7 - Nutrition des bactéries lactiques 34

1-2-7.1 -Exigences en nutriments indispensables 35

1-2-7.2 -Activité protéolytique 35

1-2-8 - Métabolisme des bactéries lactiques 36

1-2-8.1 -Métabolisme des sucres et production d'acide lactique 37

1-2-8-2 -Métabolisme des lipides 37

1-2-9 -Effet inhibiteur des bactéries lactiques 39

2 – MATERIEL ET METHODES 42

2-1 –Matériel 42

2-1-1 -Matériel biologique 42

2-1-2 -Matériel expérimental, réactifs et milieux de culture 43

2–2 –Méthodes 43

2-2-1 -Cultures à partir des prélèvements de viande 43

2-2-2 -Analyse bactériologique 44

2-2-2-1 -Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale 44

2-2-2-2 -Dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux 45

2-2-2-3 -Dénombrement des anaérobies sulfito réducteurs 45

2-2-2-4 -Dénombrement de *Staphylococcus aureus* 46

2-2-2-5 -Recherche de Salmonelles 46

2-2-2-6 -Dénombrement des levures et moisissures 46

2-2-2-7 -Recherche et dénombrement des bactéries lactiques 48

2-2-2.7.1 - Purification des souches 48

2-2-2-7.2 -Etudes des caractères physiologiques et biochimique 49

2-2-2-7.3 -Conservation des souches 51

2-3 - Recherche de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques 51

3 – RESULTATS ET DISCUSSION 53

3-1 -Analyse microbiologique de la viande fraîche bovine 53

3-1-1- Flore microbienne 53

3-1-2 -Flore lactique 53

3-2 -Identification des souches isolées 55

3-2-1 -Caractérisation morphologique 55

3-2-2 -Caractérisation biochimique et physiologique 57

3-3 -Inhibition des germes indésirables par les bactéries lactiques 59

4 - CONCLUSION 63

5 - ANNEXES 64

6 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 79

Les abréviations

ORVIC :	Office Régional des Viandes du Centre
FAO :	Food and Agriculture Organization (organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
ATP :	Adénosine triphosphate
PC :	Phosphocréatine
C.E :	Communauté européenne
ABVT :	Azote basique volatil total
AFNOR :	Agence Française de Normalisation
NF :	Normes françaises
NA :	Normes algériennes
rH :	Potentiel rédox
pH :	Potentiel hydrogène
G:	Guanine
C:	Cytosine
% :	Pourcentage
mn :	Minute
ml :	Millilitre
mm :	Millimètre
°C :	Degrés Celsius
h :	Heure
g :	Gramme
E.coli :	*Escherichia coli*
INRA :	Institut National de la Recherche Agricole
E1...E5 :	Echantillon 1....Echantillon 5
ECT :	Echantillon Congelé en Tube

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique moyenne du muscle et de la viande maigre 7

Tableau 2: Principaux microorganismes présents dans les viandes 9

Tableau 3: Caractères des bactéries rencontrées sur les viandes 10

Tableau 4: Températures optimales et extrêmes de croissance des bactéries lactiques 20

Tableau 5: Les différents genres de bactéries lactiques 20

Tableau 6: Principaux caractères des *Lactobacillus* 26

Tableau 7 : Critères distinctifs de *Lactobacillus* et de *Carnobacterium* 28

Tableau 8: Caractères permettant de différencier les espèces du genre *Carnobacterium* 29

Tableau 9: Genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques 31

Tableau 10: Dénombrement de la flore microbienne de la viande bovine fraîche 53

Tableau 11: Dénombrement de la flore lactique de la viande bovine fraîche durant les 48 heures après abattage 54

Tableau 12: Flore lactique et non lactique de la viande bovine fraîche durant les cinq heures après abattage 55

Tableau 13: Caractères physiologiques et biochimiques des souches lactiques isolées à partir de la viande bovine 58

Tableau 14: Fermentation de quelques sucres par des bactéries lactiques 59

Tableau 15: Inhibitions de certains germes indésirables par les bactéries lactiques isolées à partir de la viande bovine fraîche par la méthode de diffusion 61

Liste des figures

Figure 1 : Transformation du muscle en viande 3

Figure 2 : Chaîne de contamination de la viande 11

Figure 3 : Classification phylogénétique des bactéries lactiques 18

Figure 4 : Dénombrement des flores contaminantes dans de la viande de bœuf après cinq semaines de stockage à 2°C sous différentes atmosphères. 21

Figure 5 : Principales voies fermentaires chez *Lactobacillus* 24

Figure 6 : Identification des coques lactiques 32

Figure 7 : Identification des bacilles lactiques 33

Figure 8 : Utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques 36

Figure 9 : Transport et métabolisme du glucose par les bactéries lactiques 38

Figure 10 : *Lactobacillus sakei* en culture 39

Figure 11: Aspect des échantillons de viande bovine fraîche dans des sachets stériles 42

Figure 12 : Cultures de la viande bovine fraîche et congelée 1 mois sur bouillon MRS 43

Figure 13 : Protocole expérimental de l'analyse bactériologique et de recherche des bactéries lactiques dans la viande bovine fraîche 47

Figure 14 : Protocole de recherche de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques sur les germes indésirables 52

Figure 15 : Aspect macroscopique des colonies de bactéries lactiques sur milieu MRS 54

Figure 16 : Aspect microscopique des lactocoques isolés à partir de viande fraîche 56

Figure 17 : Aspect microscopique des lactobacilles isolés à partir de viande fraîche 56

Figure 18: Type fermentaire des bactéries lactiques 57

Figure 19 : Mise en évidence de l'arginine dihydrolase 57

Figure 20 : Activité antibactérienne des souches lactiques sur *E. coli.* 60

Figure 21: Activité antibactérienne des souches lactiques sur *Shigella flexnerei* et *Shigella sonei* 60

Figure 22: Effet antibactérien des souches lactiques vis-à-vis de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis* et *Salmonella thyphimurium.* 60

1 - INTRODUCTION

Introduction

Qu'elle soit fraîche ou transformée, la viande présente un intérêt particulier et constitue depuis toujours une des bases de notre alimentation. Elle est consommée davantage et sous des formes de plus en plus diverses. En raison de sa valeur nutritive, la viande est considérée comme un aliment de choix. Par sa richesse en protéines, elle reste un aliment difficilement remplaçable, mais constitue de ce fait un terrain très favorable au développement microbien.

La viande est l'aliment le plus facilement et, rapidement altérable notamment après sa transformation. Elle est très périssable et soutient la croissance de nombreux microorganismes qui peuvent se concentrer et se retrouver à des teneurs plus ou moins élevées, dont l'intérêt peut être bénéfique parfois ou bien nuisible provoquant des altérations qui ont de graves conséquences sur la santé humaine.

Actuellement, l'industrie de la viande représente un des principaux secteurs de l'industrie alimentaire. En Algérie, la principale préoccupation est la recherche des meilleures méthodes de conservation et d'amélioration de la qualité dans le but de protéger le consommateur. De plus, la substitution de certains produits chimiques par des microorganismes utiles comme les bactéries lactiques diminue les risques liés à la santé humaine en éliminant les bactéries indésirables qui pourraient entraîner la destruction d'une richesse nutritionnelle incomparable et une grande perte dans notre production.

Dans notre travail, nous voudrions démontrer l'intérêt de la recherche de bactéries lactiques dans les viandes bovines et leur rôle dans la conservation de cette denrée, ce qui pourrait protéger le consommateur contre des germes indésirables responsables de graves intoxications. Ces bactéries pourront être utilisées comme agents conservateurs dans la préparation et la transformation des produits carnés.

GENERALITES SUR LES VIANDES

1-1-GENERALITES SUR LES VIANDES

1-1-1 – Définitions – importance de la viande

La définition de la viande n'est pas universelle. On distingue plusieurs définitions selon les auteurs ou les réglementations considérées.

Selon l'ORVIC dépendant du Ministère de l'Agriculture et du Développement rural (Algérie) :

La viande est constituée de la musculature des mammifères domestiques ovins, bovins, caprins, camelins, etc..., détachée ou non des parties squelettiques et accompagnée d'une part variable de tissus adipeux (gras). La partie primordiale qui offre les caractéristiques les plus intéressantes est donc l'ensemble des muscles rouges striés .

La production de viande dans le monde est estimée à 247,3 millions de tonnes (année 2002, source FAO), dont 24,7 % de viande bovine. **(http//fr.wikipedia. org/wiki/viande).**

Quantitativement, au niveau mondial, la demande de la viande ne peut qu'augmenter au cours des vingt prochaines années, ne serait –ce que par le jeu de la croissance démographique.

En données approximatives, les démographes prévoient environ 7,5 milliards d'habitants sur la planète dans vingt ans contre 5,5 aujourd'hui. Pour maintenir le niveau actuel de consommation par personne (35 kg environ), la consommation totale passerait d'environ 190 millions de tonnes aujourd'hui à 260 millions de tonnes. Mais si, comme c'est probable, la consommation individuelle continue d'augmenter dans les pays à revenu moyen ou bas, la consommation mondiale pourrait atteindre 300 millions de tonnes (40 kg/personne/an) à 350 millions de tonnes (46 kg/personne/an) en 2020. **(Boutonnet**, article paru dans **Déméter 1999) (http://epe.cirad.fr/fr/doc/marche_mondial_viandes.pdf**).

En Algérie et en 2002, le niveau de consommation des viandes rouges se situerait à 10 kg/h/an **(CENEAP-Algérie).** Ce niveau est relativement faible comparativement au pays industrialisés. En terme d'habitudes alimentaires, le marché algérien est un marché de consommation de viandes fraîches ovines et bovines. Les viandes camelines et caprines étant marginalement consommées notamment dans les régions du sud du pays.

Il existe différentes sortes de viande qui sont classées en viandes rouges (bœuf, mouton, cheval), viandes blanches (veau, lapin, volaille) et viandes noires (gibier).

La viande est le produit de l'évolution post mortem du muscle. Les muscles se présentent sous des formes variées mais ont une structure unique. C'est un ensemble de faisceaux de fibres contractiles. L'unité de base du tissu musculaire est la fibre musculaire qui est une cellule plurinuclée de plusieurs centimètres de longueur et de 0,01 à 0,1 mm de diamètre.

La viande comprend en proportions variables le tissu musculaire (fibre striée), le tissu conjonctif (nerfs et aponévroses) et le tissu gras (graisses).

La qualité de la viande est appréciée selon cinq critères : la couleur, qui dépend de la quantité de myoglobine, la tendreté, qui est l'aptitude de la viande à être tranchée, la capacité de rétention en eau, qui traduit la force de liaison de l'eau avec les protéines, la succulence, qui est l'aptitude du muscle à rendre son jus, et la saveur, qui correspond au goût de la viande et dépend de la quantité de la graisse intramusculaire **(Microsoft ® Encarta ® 2007).**

1-1-2 - Transformation du muscle en viande :

Comme tous les aliments, le muscle doit être conservé un minimum de temps en vue d'en assurer sa transformation en viande et sa distribution. Cette nécessité de conservation se trouve accrue par le fait que contrairement à tous les aliments frais, la viande fraîche ou très fraîche n'est pas appréciée. Elle est en effet peu sapide, sèche et dure, l'acquisition des qualités organoleptiques (couleur, flaveur, jutosité, tendreté) impose un sursis à la mise en vente, qui oscille, selon les pays autour d'une semaine.
La mort de l'animal n'est pas la mort des organes et des tissus : les muscles et leurs cellules encore vivantes, subissent un ensemble important de réactions connues sous le nom de Rigidité Cadavérique et de Maturation : les muscles se transforment en viande **(Bourgeois *et al,* 1996).**

La transformation du muscle en viande repose très largement sur des mécanismes biochimiques qui, après la mort des animaux, modifient plus ou moins profondément la composition et la structure du muscle. Les réactions mises en jeu, essentiellement sont des réactions hydrolytique, dissipent les réserves énergétiques du muscle (ATP, PC, Glycogène) et affecte l'état d'organisation et la structure même des protéines et des différentes fractions lipidiques musculaires **(Pilet *et al*** cités par **Sutra *et al*, 1998).**

L'évolution normale de la viande se fait en trois phases :

- Persistance de l'excitabilité musculaire ou l'état pantelant *PRE- RIGOR*..

  C'est la phase de flaccidité ou la viande retient encore son eau. Les muscles sont flasques, mous et élastiques, de couleur rouge soutenue. Le pH est voisin de la neutralité (pH 7,1).

- Apparition de la rigidité cadavérique : *RIGOR MORTIS*.

  C'est une phase qui est plus rapide chez les bovins, due aux réserves de glycogène, à l'état de l'animal avant abattage (stress, faim, etc.) et à la température de stockage de la carcasse. L'arrêt de la circulation provoque une chute de la quantité d'oxygène dans les muscles avec comme conséquence au niveau du métabolisme cellulaire une glycolyse anaérobie. Les cellules vont dès lors consommer le glycogène pour produire de l'acide lactique. Suite à la présence d'acide lactique, le pH diminue, et ceci a deux conséquences : agrégations des protéines et diminution de la production enzymatique. Ceci entraîne la réduction de la quantité d'ATP, et l'actine et la myosine se lient irréversiblement pour former l'actomyosine. L'action conjointe des deux précipités a pour conséquence la diminution de la capacité de rétention d'eau dans le muscle, ce qui influe sur la texture de la viande. **(http://fr.wikipédia.org/wiki/viande).**

  Les masses musculaires sont dures et inextensibles. Elles deviennent inconsommables. Le pH diminue pour atteindre 5,5 à 5,6 ainsi que l'ATP par activation de l'ATPase. Il y a apparition d'une action plastifiant du muscle : c'est la Rigidité Cadavérique.

- Disparition de la rigidité cadavérique : *LA MATURATION*.

  C'est la phase d'évolution post mortem au cours de laquelle la viande s'attendrit. La tendreté est la caractéristique la plus importante en particulier dans le cas des bovins où elle constitue finalement le principal facteur limitant de l'acceptabilité par le consommateur. La viande est rassis ou mure par production d'un phénomène enzymatique qui est l'autolyse. Ce dernier est consécutif à l'attaque des protéines par les protéases musculaires. La viande devient tendre, molle, friable avec un arôme agréable et un écoulement du suc musculaire. Le pH augmente de quelques dixièmes d'unités (pH 5,7 à 5,8).

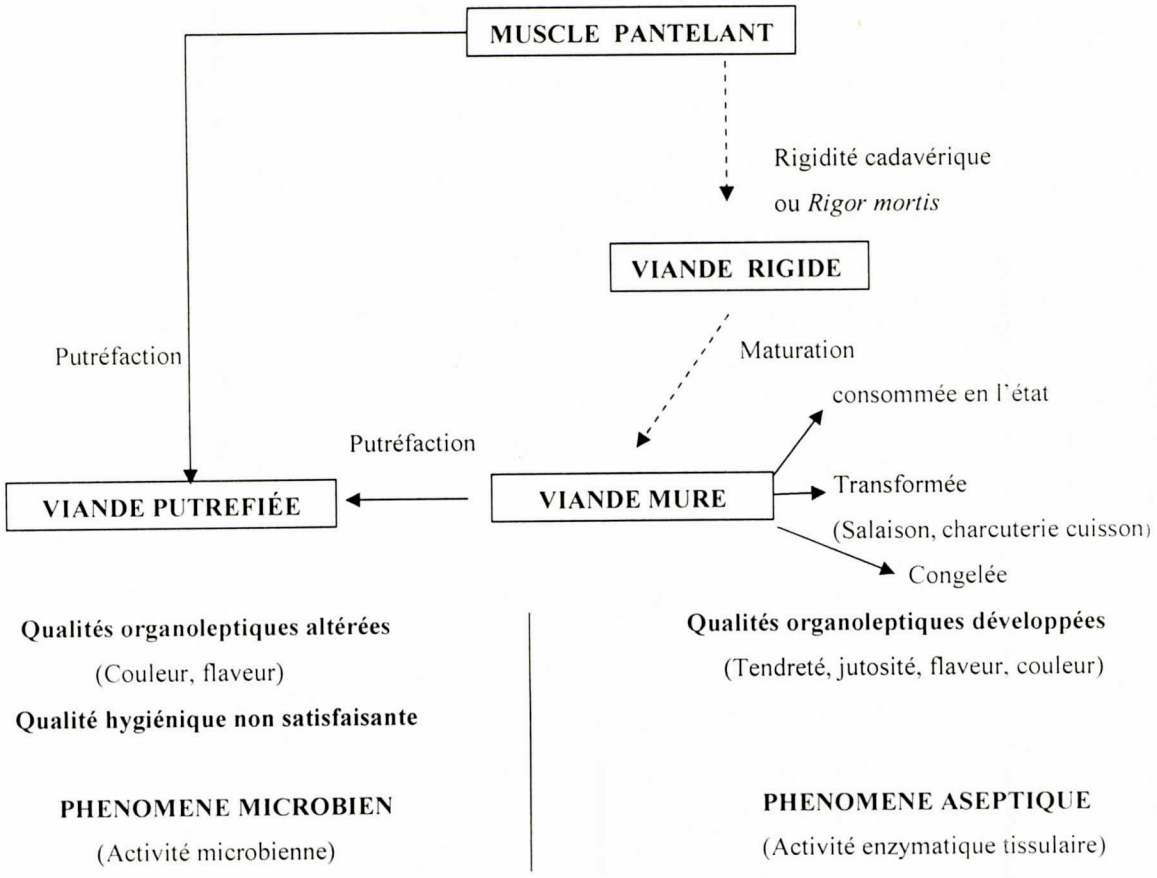


Figure 1 : Transformation du muscle en viande

(D'après Rosset *et al,* 1984)

1-1-3 - Caractéristiques de la viande:

Le muscle est constitué d'un faisceau de fibres contractiles entouré d'une enveloppe de tissus conjonctifs. Ces tissus sont formés de protéines fibreuses (collagène, réticuline, élastine) sans valeur alimentaire Ils constituent une protection efficace contre la contamination extérieure **(Bourgeois** et **Leveau, 1991)**

Après abattage, le muscle subit différentes évolutions :

- **Une évolution physique** : le muscle perd de l'eau par évaporation et exsudation, ce qui entraîne une diminution de masse de la carcasse ou de la viande découpée.

- **Une évolution biochimique** : les activités enzymatiques du muscle subsistent mais se modifient : l'arrêt de la circulation sanguine supprimant d'une part les apports en glucose et en oxygène et d'autres part élimination des déchets. On passe de l'aérobiose à l'anaérobiose avec accumulation des résidus métaboliques : des substrats disparaissent et des métabolites apparaissent. Ce sont ces modifications qui caractérisent la rigidité cadavérique (le muscle souple, élastique, contractile devient rigide) et la maturation (les qualités organoleptiques et en particulier la tendreté se manifestent). Les modifications biochimiques principales portent d'une part sur les structures myofibrillaires (Actine, Myosine, strie Z) et d'autre part sur trois constituants sarcoplasmiques (glycogène, Adénosine TriPhosphate ou ATP et phosphocréatine ou PC), sources d'énergie qui sont normalement renouvelées, disparaissent après la mort en libérant des substances acides (chute du pH) et des précurseurs d'arôme (flaveur accrue) **(Lawrie, 1974)**

- **Une évolution microbiologique :** au cours de la conservation, les microorganismes présents vont se multiplier d'autant plus que le terrain et l'environnement s'y prêtent. Plus le délai de mise en consommation est long (en vue de l'installation des qualités organoleptiques) plus les chances de proliférations microbiennes sont grandes, avec ainsi une diminution des qualités hygiéniques et sanitaire de la viande **(Bourgeois *et al*, 1996)**. Le développement microbien est influencé essentiellement par les modifications concernant l'ATP, la PC, le glycogène et l'oxygène. Ainsi l'acidification retarde le développement des microorganismes, surtout des putréfiants, et la disparition de l'oxygène (chute de rH) facilite la multiplication des anaérobies, germes putréfiant dont la croissance est fonction de la température.

Une anaérobie trop précoce (2-3h post mortem) installée sur un muscle chaud (35-40°C) se traduit par une putréfaction profonde. C'est ce danger qui justifie le recours à une réfrigération précoce et rapide des carcasses.

1-1-4 – Composition de la viande :

La viande est un aliment de grande valeur nutritionnelle contenant de nombreux acides aminés essentiels (ceux que l'organisme humain est incapable de synthétiser) et renferme des vitamines du groupe B notamment la vitamine B1, la vitamine B12 anti anémique, la vitamine A et la vitamine D.

C'est une source importante de fer, de phosphore et du calcium. Elle apporte aussi des quantités notables de lipides et de cholestérol.

La composition de la viande est variable entre animaux et chez l'animal lui même, d'un muscle à un autre. La composition chimique comparée du muscle et de la viande met en évidence l'évolution de la teneur des différents constituants. L'eau et les protéines sont les principaux constituants tandis que les glucides se trouvent sous forme de glycogène dans le muscle. Ce dernier sera complètement dégradé en acide lactique qui s'accumulera dans la viande **(Tableau 1).**

Tableau 1 : Composition chimique moyenne du muscle et de la viande maigre.

Les valeurs sont données en % **(D'après Forrest *et al,* 1975)**

Constituants	Muscle	Viande
Eau	75	75
Protéines	18,5	18,5
Lipides	3	3
Substances azotées non protéiques	1,5	1,5
dont phosphocréatine (PC)	0,5	0
nucléotides (ATP, ADP)	0,3	0
peptides	0,3	0,3
acides aminés libres	0,3	0,3
autres substances non protéiques	0,1	0,9
Glucides et catabolites	1 à 1,3	1 à 1,3
Dont glycogène	**0,8 à 1,1**	**0,1**
glucose	**0,1**	**0**
acide lactique	**0,1**	**0,8 à 1,1**
Composés minéraux	1	1

1-1-5 – Microflore de la viande

La chair d'un animal sain vivant est pratiquement stérile. Chez un animal malade, il peut y avoir contamination directe par le système lymphatique. La viande est donc susceptible de contenir des germes pathogènes pour l'animal et pour l'homme. Dans la plupart des cas, au moment de l'abattage la viande se contamine à partir de la flore de l'intestin, de la peau ou des muqueuses. Les bactéries provenant de l'extérieur de l'animal sont inévitablement incorporées dans la flore superficielle de la carcasse **(FAO, Refaï, 1981).**

Parmi les bactéries présentes sur la viande on peut trouver :

-Des bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, certaines formes d'*Escherichia coli*) qui sont à éviter car dangereuses pour l'homme

-Des bactéries d'altération (*Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fragi* par exemple) qui sont à limiter car si elles ne présentent pas de danger pour la santé, elles peuvent provoquer une perte économique importante pour les producteurs, à cause du retrait du marché des produits altérés.

-Des bactéries lactiques observées dans les produits laitiers et qui existent aussi sur les produits carnés ou dérivés des poissons, des produits végétaux, et parfois dans notre tractus digestif et ont, peut-être pour certaines, un effet bénéfique pour la santé de l'homme. Ces bactéries sont actuellement largement utilisées dans la fabrication de produits fermentés entrant depuis longtemps dans la nourriture de l'homme (le vin, la choucroute, les poissons fermentés, les saucissons secs, les yaourts et fromages, représentent les produits les plus courants).
(http://www.nature.com/nbt/journal/vaop/ncurrent/index.html).

Les microorganismes de la viande ont des origines diverses. Ils peuvent soit contaminer *in vivo* le muscle lui même, soit pénétrer au cours de la mort de l'animal, soit enfin être apportés par les manipulations que subissent les carcasses et les produits des viandes au cours de la découpe et de la distribution. Les germes se multiplient par la suite, provoquant éventuellement des altérations ou rendant la viande dangereuse pour le consommateur **(Bourgeois *et al*, 1996).**

Les germes susceptibles d'être rencontrés dans la viande **(Tableau 2)** proviennent de l'intestin par franchissement de la barrière intestinale, ils sont véhiculés par le sang, et peuvent être à l'origine de contamination profonde. La surface de la carcasse, quand à elle, porte toujours un nombre important de germes divers, ce nombre varie avec l'emplacement sur l'animal et les conditions d'hygiène à l'abattoir.

Tableau 2: Principaux microorganismes présents dans les viandes (D'après Larpent & Larpent-Gougaud, 1990)

Microorganismes	Viande fraîche	Viande maturée	Viande sous vide	Bacon
Acinetobacter	++	+	+	+
Aeromonas	++			+
Lactobacillus	+	++	++	
Moraxella	++			+
Pseudomonas	++		+	
Streptococcus	+	+	+	
Pediococcus	+	+	+	
Corynebacterium	+	+	+	+

Généralement les groupes bactériens lactiques rencontrés dans la viande sont essentiellement des lactobacilles et des leuconostocs. Ce sont des bactéries non pathogènes, d'intérêt technologique.

Les germes ou familles bactériennes dominant sur les viandes fraîches sont : *Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter, Lactobacillus, Micrococcus, Brochothrix, Microbacterium.* Ces germes peuvent être responsables d'altération : putréfaction, verdissement, surissement, lipolyse. **(Tableau 3)**

On rencontre aussi un certain nombre d'entérobactéries (*Klebsiella, Yersinia, Serratia, Proteus)* ainsi que différentes variétés de *Bacillus, Chromobacterium, Flavobacterium, Alcaligenes, Vibrio, Aeromonas, Corynebacterium, Arthrobacter, Clostridium, Streptococcus, Staphylococcus,* des levures et des moisissures.

Tableau 3: Caractères des bactéries rencontrées sur les viandes

(D'après Marchal, 1976)

Caractères métaboliques				
Putréfiant	Verdissant	Lactique acidifiant	Lipolytique	Indéterminé
• Pseudomonas • Acinetobacter * Entérobactéries (gaz) • Flavobacterium • Alcaligenes * Aeromonas (gaz) **Clostridium(gaz) * Alteromonas • Kurthia	*Enterobacteries (proteus) * Microbacterium * Lactobacilluis ** Clostridium * Alteromonas *Pediococcus	* Microbacterium * Lactobacillus * Streptococus * Pediococcus *Leuconostoc (gaz)	• Pseudomonas **Micrococcaceae	•* Bacillus •*Corynebacterium • Arthrobacter •* Chromobacterium

Sensibilité à l'oxygène : • Aérobie strict ; * Anaérobie facultatif ; ** Anaérobie strict ;

•* Aérobie strict ou anaérobies facultatif

1-1-5.1- Contamination initiale

La chaîne de contamination peut commencer de l'animal lui même, à partir de son abattage jusqu'au produit final qui est la viande livrée à la consommation et les produits de charcuterie **(Figure2).**

Entre l'abattage de l'animal et la consommation du produit carné, les étapes susceptibles d'introduire des micro-organismes contaminant sont nombreuses.

- Lors de l'abattage lui-même, les germes peuvent franchir la barrière intestinale, et parvenir au muscle par voie sanguine, ceci principalement dans le cas d'animaux stressés.
- L'outil utilisé pour l'abattage peut entraîner en profondeur les germes de la peau.
- L'éviscération est une opération capitale. Elle peut être la cause de diverses souillures.
- Les opérations de découpe de la viande peuvent véhiculer les microorganismes issus de l'environnement et/ou du personnel.
- La contamination peut aussi intervenir lors du transport ou du stockage, dans les conditions d'hygiène insuffisantes (**Bourgeois** et **Leveau , 1991).**

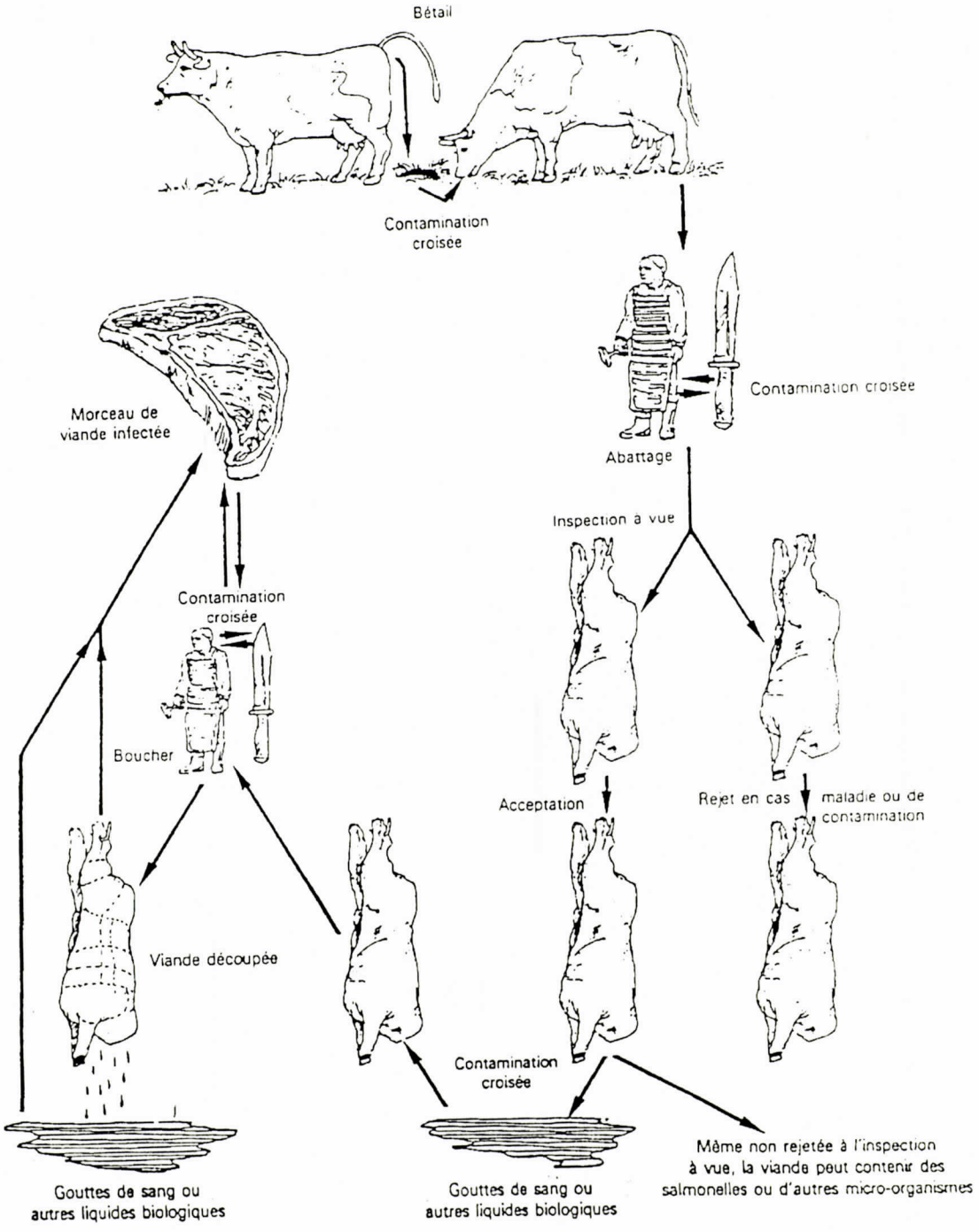


Figure 2 : Chaîne de contamination de la viande

(D'après ZARROUK, 1994)

Les produits obtenus à partir de la transformation de la viande sont exposés à des contaminations très diverses qui peuvent être initiales ou finales. Ainsi, ces germes contaminent la viande même après sa transformation.

1-1-5.2- La contamination profonde

Le muscle vivant est un tissu aseptique grâce aux barrières naturelles, grâce aussi aux aponévroses. Tant que la paroi du tube digestif n'est pas altérée après l'abattage, il ne peut pas y avoir de passage de germes dans le muscle qui se transformera par la suite en viande.

La contamination profonde ou intrinsèque a pour origine une bactériémie d'abattage. Elle existe essentiellement *in vivo* chez les animaux malades ou accidentés et peut survenir aussi lors de l'abattage lui même en cas de stress. Il arrive que des animaux apparemment sains, hébergent des germes dangereux dans leur tube digestif qui, lors de mauvaises conditions d'abattage, ou à la suite d'un traumatisme, se retrouvent dans le muscle. Ce sont surtout des anaérobies gram positif et les bactéries mésophiles.

Cette contamination est exceptionnelle et faible en quantité de germes de l'ordre de 1 germe par 10 gramme et souvent 1 germe par 100 grammes dans le cas d'animaux sains abattus dans de bonnes conditions. **(Bourgeois *et al*, 1996).**

1-1-5.3- Les altérations de la viande

La présence de microorganismes dans la viande présente un danger pour le consommateur, affecte ses qualités organoleptiques (aspect, texture, consistance, flaveur) et va engendrer la saisie et le retrait de ces viandes du marché, ce qui occasionne des pertes économiques considérables.

Les animaux sains, reposés, proprement abattus, fournissent une viande très peu contaminée. Par contre, dans le cas des animaux malades ou abattus in extremis dans des affections digestives, abattage d'urgence, donnent des viandes riches en microorganismes s'altérant facilement (« viandes fermentées »). L'envahissement microbien se fait de proche en proche progressant principalement par les travées conjonctives et plus rapidement encore par les vaisseaux sanguins. Il s'agit de germes psychrotrophes aérobies.

C'est pour limiter ces manifestations microbiennes qu'il est nécessaire de soumettre au froid des viandes immédiatement après abattage **(Danal, 1972)**. Le froid positif (la réfrigération) ralentit en effet le développement des psychrotrophes.

Les principales altérations sont de trois types :

- **Altération à température basse (<10°C) :** c'est la putréfaction superficielle qui se traduit par l'apparition d'une couche visqueuse avec une odeur de relent, avec installation du poissage puis du limonage qui est dû à la multiplication de germes aérobies généralement les psychrotrophes.
- **Altération à température intermédiaire (10 - 25°C) :** c'est la putréfaction verte appelée aussi le verdissement et la puanteur des os, due à des germes toxiques. La viande a une odeur très désagréable et devient teintée en vert par la réduction de l'hémoglobine en méthémoglobine. Il y a catabolisme des protéines avec libération d'anhydride sulfureux qui se combine avec la méthémoglobine pour donner la thiométhémoglobine de couleur verte.
- **Altération à température élevée (25 - 40°C) :** c'est la putréfaction profonde ou le sûrissement anaérobie qui est dû à la prolifération des germes anaérobies se traduisant par l'apparition d'odeur putride dans les parties profondes de la viande généralement à proximité de l'os autour des articulations avec dégagements de gaz. La masse musculaire devient brune, grisâtre ou verdâtre et de consistance molle. Les viandes dont le pH est trop élevé (pH>6,2) sont les plus exposées à ce type d'altération.

1-1-5.4- Les principaux microorganismes recherchés dans la viande :

Les recherches et dénombrement effectués dans le cadre de contrôle de routine sont tout à fait classiques. Ils concernent :

- La flore aérobie mésophile
- Les indicateurs fécaux (coliformes et coliformes fécaux)
- *Staphylococcus aureus*
- Ies anaérobies sulfito-réducteurs
- Les salmonelles
- Les levures et moisissures

A ces recherches sont souvent associées des analyses chimiques. Le dosage de l'ABVT, en particulier, constitue un indice d'altération **(Bourgeois** et **Leveau , 1991).**

Les levures et moisissures ne figurent pas dans la Norme Algérienne N°35 du 27 mai 1998**(annexe A3)**

- ***Flore totale aérobie mésophile :*** L'évaluation de cette flore est un test important en particulier dans le cadre du contrôle industriel. Un nombre élevé de microorganismes viables traduit souvent une contamination des matières premières, un manque d'hygiène, des conditions de durée ou de température impropres au stade de la production ou de l'emmagasinage ou une combinaison de ces facteurs. Les bactéries aérobies mésophiles peuvent être considérées comme des microorganismes indicateurs bien qu'elles permettent de mesurer avec beaucoup moins de précision et de fiabilité que les autres indicateurs le risque de toxi-infection alimentaire **(FAO, Refaï , 1981)**.

- ***Coliformes totaux, coliformes fécaux et E. coli :*** Le groupe des coliformes comprend toutes les bactéries en bâtonnet, aérobies et anaérobies facultatives, Gram négatives et non sporogènes, qui fermentent le lactose avec formation de gaz dans les 48 heures à 35°C. Toutefois, les coliformes autres que *E.coli* sont des indicateurs utiles d'un traitement peu satisfaisant ou d'un manque d'hygiène. La présence de coliformes en grand nombre dans un aliment traité indique qu'il y a eu possibilité de prolifération, ce qui peut permettre de soupçonner la présence de *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, etc. **(FAO, Refaï , 1981).**

- ***Staphylococcus aureus :*** On rencontre occasionnellement des staphylocoques pathogènes dans la viande fraîche contaminée par des manipulateurs humains (plaies aux mains, angine, sinusite). Toutefois, ce germe ne semble pas se développer aisément dans les conditions normales de stockage et la formation d'entérotoxine à l'origine de l'intoxication est inhibée par la flore superficielle des viandes **(Bourgeois *et al*, 1996)**..

- ***Anaérobies sulfito-réducteurs :*** En théorie, le dénombrement des spores et des cellules végétatives de *Clostridium* indiquent la présence de *Clostridium perfringens*. La pratique du laboratoire montre que ce sont en réalité, dans la grande majorité des cas, des bactéries du genre *Bacillus* qui se développent, ce qui ne permet pas d'estimer s'il y a ou non présence de *Clostridium perfringens*. Dans ces conditions, il parait plus pertinent de dénombrer *Clostridium perfringens* **(Jouve, 1996).** Ce germe est susceptible de transmettre des affections graves chez l'animal et des toxi-infections chez l'homme.

- ***Les Salmonelles*** : La contamination *post mortem* par les salmonelles des viandes manipulées n'est pas exceptionnelle. Les salmonelles sont en effet des hôtes fréquents de l'intestin des diverses espèces animales (y compris l'homme). L'ouverture accidentelle des réservoirs digestifs d'animaux apparemment sains peut contaminer l'aire d'abattage ainsique les carcasses et d'être à l'origine de pollutions directes ou croisées. Au cours des différents traitements, la viande peut également être contaminée par des manipulateurs porteurs de germes (malades guéris cliniquement) hébergeant dans leur tube digestif des salmonelles qu'ils excrètent dans leurs matières fécales. La souillure de leurs mains est ainsi possible notamment s'ils ne respectent pas les règles d'hygiène les plus élémentaires. La multiplication de ces germes est nécessaire pour provoquer des intoxications (mauvaise réfrigération, régime thermique inadéquat). Les intoxications à salmonelles dues aux viandes sont sérieuses tant par le nombre de malades que par la gravité des symptômes. Tous les sérotypes peuvent être impliqués : ils varient avec les pays et les époques. Les plus fréquents sont les suivants : *S. thyphimurium, S. dublin, S. saint - paul, S. senftenberg, S. heidelberg, S. virchou, S. infantis, S. bredeney, S. derby, S. panama, S. agona, S. newport, S. goldcoast, S. enteritids* **(Bourgeois *et al*, 1991)..**

- ***Les levures et moisissures*** : La flore fongique correspond aux champignons qui comprennent en particulier les levures et les moisissures. Ces champignons sont capables de se développer en milieu acide et au froid. Leur croissance est moins rapide, en général que celle des bactéries **(Bourgeois *et al*, 1996)..** Elle est à l'origine de contamination superficielle.

BACTERIES LACTIQUES

1-2 - LES BACTERIES LACTIQUES

1-2-1 –Définition – Découverte des bactéries lactiques

Il n'existe pas de définition précise des bactéries lactiques mais, généralement, on regroupe sous ces termes des bacilles ou des coques à Gram positif, non sporulés, catalase négative, dépourvus de cytochrome, anaérobies mais parfois aérotolérants, de culture difficile, à métabolisme fermentatif, fermentant les sucres en produisant principalement de l'acide lactique et appartenant à l'ordre des "*Lactobacillales*" (classe des "*Bacilli*", phylum des "*Firmicutes*").
(http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/thermotolerans.html).

Certaines bactéries lactiques produisent des exopolysaccharides qui influencent l'aspect et la texture des produits fermentés, ainsi que du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines inhibant la croissance de bactéries indésirables. **(Dellaglio *et al.*, 1994).**
Les bactéries lactiques sont normalement présentes dans la peau, le système digestif et la muqueuse vaginale où elles accomplissent de nombreuses fonctions, elles créent notamment un environnement hostile (milieu acide grâce à la production d'acide lactique) aux bactéries pathogènes.

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elle rassemble en effet un certain nombre de genre de bactéries à Gram positif possédant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes, mais avec parfois peu d'homologie de leurs acides nucléiques.
Les bactéries lactiques sont des micro-organismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver nombre de ses aliments. Malgré leur importance, peu de travaux de phylogénie sont consacrés à préciser leur position et leur rôle dans l'évolution de la vie sur notre planète. La phylogénie basée sur la comparaison des séquences d'ADN ribosomique et sur l'analyse de séquences signatures dans les protéines très conservées suggère une position ancestrale des bactéries Gram positif à bas taux de guanine et cytosine (GC %), dont les bactéries lactiques, dans l'évolution. Ces bactéries seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques **(annexe A6).** Ces dernières ayant laissé des traces fossiles datées d'au moins 2,75 milliards d'années, les bactéries lactiques pourraient donc avoir vu le jour il y a près de 3 milliards d'années. Leur médiocre adaptation à la vie en aérobiose concourt à penser qu'elles se seraient plutôt développées au cours d'une période de transition entre un monde anaérobie et un monde micro-aérobie. **(http ://www.edpsciences.orgo.html).**

1-2-2 Propriétés générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont principalement sélectionnées pour leurs activités acidifiantes et protéolytiques dans les ferments classiques, d'autres propriétés doivent être étudiées dans le cas des probiotiques. Pour exercer leur effet bénéfique sur la santé, les probiotiques doivent, comme pour les ferments classiques, survivre en grand nombre au procédé de fabrication, à la lyophilisation éventuelle et à l'entreposage qui s'en suit. Il est en effet généralement admis qu'un nombre minimal de 10^7 cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique **(Ishibashi et Shimamura, 1993).** Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées. De plus, ces souches devraient être viables sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effet indésirable sur le goût ou l'arôme du produit ni augmenter l'acidité **(Mattila-Sandholm *et al*, 2002).**

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que des cellules en phase stationnaire de croissance, plus tolérantes aux stress environnementaux que des cellules en phase exponentielle, devraient être privilégiées pour la confection de produits contenant des probiotiques en grand nombre **(Kolter, 1993; Hartke *et al*, 1994; Rallu *et al*, 1996; Heller, 2001).** Les interactions possibles entre bactéries lactiques et probiotiques devraient également être prises en compte pour sélectionner la meilleure combinaison de souches afin d'optimiser le procédé et la survie cellulaire dans le produit entreposé **(Vinderola *et al*, 2002)**

1-2-3 Rôle des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont partout dans la nature, et ont des rôles multiples dans différents domaines, surtout technologique. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons.

Nul besoin d'explication scientifique pour de nombreux peuples qui, depuis des milliers d'années, se servent des bactéries lactiques comme produit final du processus de fermentation. Ils en améliorent ainsi la conservation, et agissent sur les textures et les saveurs qui se révèlent différentes de celles de l'aliment à son état originel.

Les bactéries lactiques se comportent comme d'excellents ambassadeurs d'un monde microbien souvent calomnié. Elles ne se réduisent pas à leur importance économique, mais jouent un rôle important dans l'entretien et l'amélioration de la santé de l'homme **(http://www.caducee.net/Fiches-technuiques/EUCIF/bactéries-lactiques.asp)**.

Les bactéries lactiques sont souvent employées pour contrôler les pathogènes alimentaires sur les produits alimentaires ou les viandes cuites, fermentées ou réfrigérées. Jusqu'à maintenant, la plupart des recherches se sont intéressés à l'inhibition de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Clostridium botulinum* et des micro-organismes causant la détérioration. Les bactéries lactiques représentent d'excellents candidats pour la diminution des niveaux de pathogènes dans les aliments parce qu'elles inhibent la croissance de ces micro-organismes par divers mécanismes sans entraîner des changements sensoriels inacceptables **(Kostrzynska et Bachand, 2006).**

Le suivi des bactéries lactiques s'affine grâce aux récentes techniques de laboratoire **(Devos, la semaine vétérinaire, 2005)**

1-2-4 Classification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes **(Figure 3).**

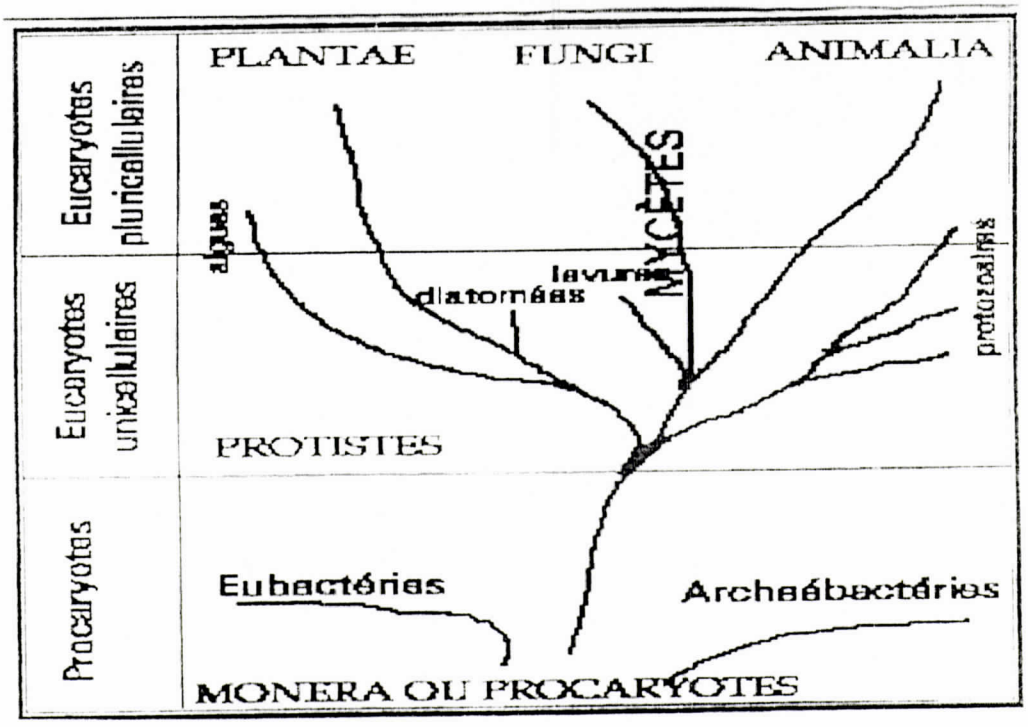


Figure 3 : Classification phylogénétique des bactéries lactiques (http://www.gch.ulaval.ca/ agarnier/bcm20239//bcm2b)

La classification qui fait habituellement référence est celle du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. La classification du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" reconnaît deux domaines ou empires, "*Archaea*" et "*Bacteria*". Chaque domaine est divisé en phylums qui sont à leur tour subdivisés en classes, ordres, familles, genres, espèces et, éventuellement, sous-espèces.

Le domaine des "*Bacteria*" rassemble 25 phylums : "*Aquificae*", "*Thermotogae*", "*Thermodesulfobacteria*", "*Deinococcus-Thermus*", "*Chrysiogenetes*", "*Chloroflexi*", "*Thermomicrobia*", "*Nitrospira*", "*Deferribacteres*", "*Cyanobacteria*", "*Lentisphaerae*", "*Chlorobi*", "*Proteobacteria*", "*Firmicutes*", "*Actinobacteria*", "*Planctomycetes*", "*Chlamydiae*", "*Spirochaetes*", "*Fibrobacteres*", "*Acidobacteria*", "*Bacteroidetes*", "*Fusobacteria*", "*Verrucomicrobia*", "*Dictyoglomi*" et "*Gemmatimonadetes*". Les bactéries lactiques sont trouvées dans le phylum des *Firmicutes* **(http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/systematique/nomenclature.html)**.

Les bactéries lactiques sont classées selon des caractères morphologiques et biochimiques : on peut distinguer, selon Euzéby (Bergey's Manual 2002) et NCBI Taxonomy Browser **(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/Browser/wwwtax.cgi)**, des coques et des bâtonnets.

- Coques Gram (+) aérobies, catalase (-) :

  Streptococcaceae : *Lactococcus*, *Streptococcus*

  Leuconostocaceae : *Leuconostoc*, *Oenococcus*

  Lactobacillaceae : *Pediococcus*

- Bacilles Gram (+) aérobies, catalase (-) :

  Enterococcaceae : *Enterococcus*

  Lactobacillaceae : *Lactobacillus*

A l'intérieur de chaque genre les températures de croissance varient d'une espèce à l'autre : on distingue des souches mésophiles et des souches thermophiles **(Tableau 4).**

Tableau 4: Températures optimales et extrêmes de croissance des bactéries lactiques (Desmazeaud et De Roissart, 1994)

Genres bactériens	Température optimale	Températures extrêmes
Carnobacterium	22 – 30°C	0 – ≤ 30°C
Leuconostoc	18 – 30°C	≤ 5 – < 40°C
Vagococcus	25 – 30°C	≤ 5 – ≤ 40°C
Lactococcus	27 – 32°C	≤ 10 – ≤ 40°C
Pediococcus	25 – 40°C	≤ 15 – ≤ 45°C
Enterococcus	30 – 40°C	≤ 10 – ≤ 50°C
Bifidobacterium	37 – 41°C	25 – 45°C
Streptococcus thermophilus	42 – 43°C	20 – < 50°C
Lactobacillus (mésophiles)	30 – 35°C	≤ 15 – ≤ 45°C
Lactobacillus (thermophiles)	40 – 45°C	≤ 30 – ≤ 52°C

Une donnée importante pour la classification bactérienne est le pourcentage en nucléotides **G et C** (ou **%GC**) de chaque génome. Chez les bactéries lactiques, les valeurs du %GC sont très dispersées et elles varient de 34 % à 67% **(Tableau 5).**

Tableau 5: Les différents genres de bactéries lactiques

GC% : pourcentage molaire de l'ADN en bases G et C.

(a) Schleifer, 1986; (b) Farrow *et al*, 1989; (c) Kandler& Weiss, 1986 ; (d) Scardowi, 1986.

	Cellules :		**Fermentation**	**ADN : GC%**
	Forme	**Arrangement**		
Streptococcus	Coque	chaînes	Homolactique	34-46 (a)
Leuconostoc	Coque	chaînes	Hétérolactique	36-43 (b)
Pediococcus	Coque	tétrades	homo lactique	34-42 (a)
Lactobacillus	Bacille	chaînes	homo lactique hétérolactique	32-53 (c)
Bifidobacterium	Variée	Variée	acétique et lactique	55-67 (d)

Il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO2 en plus de l'acide lactique.

La taxonomie des bactéries lactiques, plus que tout autre groupe bactérien est soumise à une constante évolution qui montre la nécessité d'utiliser une approche combinatoire des techniques d'identification.

1-2-5 Les bactéries lactiques des produits carnés

Les bactéries lactiques sont retrouvées dans la viande conservée car celle-ci contient les nutriments (glycogène, protéines, lipides, vitamines, minéraux…) et les facteurs favorables à leur développement (humidité, pH, température,….) **(Figure 4).**

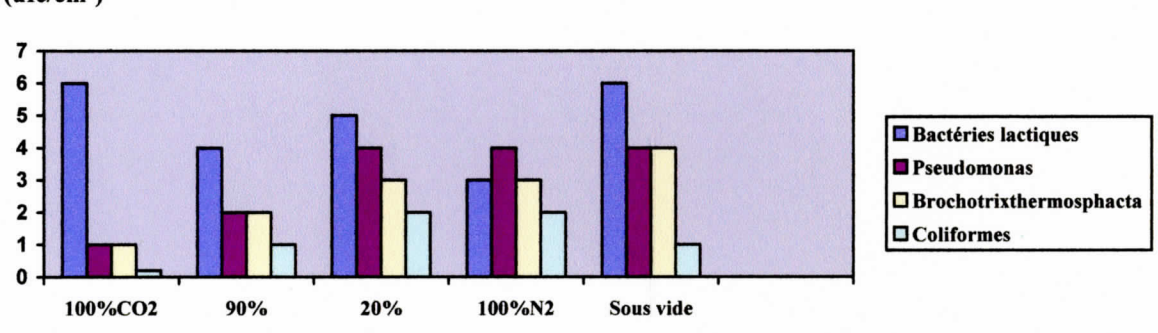


Figure 4 : Dénombrement de flores contaminantes dans de la viande de bœuf après cinq semaines de stockage à 2°C sous différentes atmosphères (Pilet *et al.* 1998).

Les groupes bactériens rencontrés sont essentiellement des lactobacilles et des leuconostocs, qui sont dénombrés selon la norme Afnor **NF V04 503** ou norme algérienne **NA 1903.**

Les bactéries lactiques se développent dans les produits conditionnés sous vide et sous atmosphère modifiée comme dans le cas de la viande ou sur des produits qui ont subi une maturation par le sel ou le vinaigre. Le filet de poisson conditionné sous vide, après un stockage à 0°C comporte essentiellement une flore lactique constituée de bactéries homofermentaires. La flore du saumon fumé sous vide est dominée par la présence de *Carnobacterium piscicola* et *Lactobacillus.*

Les bactéries du genre *Carnobacterium* sont isolées de la viande crue, de volaille et de poissons.

L'emballage sous atmosphère modifiée a grandement réduit les pertes d'aliments causées par *Pseudomonas* sp en favorisant la croissance de bactéries lactiques semblables à celles qu'on utilise en fermentation. Les bactéries lactiques interviennent comme agents de fermentation des viandes salées, épicées et ne subissant aucun traitement thermique d'assainissement, comme les saucissons. Les bactéries lactiques ajoutées sont des lactobacilles, avec trois espèces principales : *Lb.sake, Lb.curvatus* et *Lb. plantarum. Pediococcus damnosus, pentosaceus* et *acidilactici* interviennent également. Ils participent à l'acidification rapide du produit dans les premiers jours de fabrication, puis à sa maturation. Des souches sauvages de *Carnobacterium* ont également un rôle dans la production de composés organoleptiques. Les produits de la mer transformés sont également contaminés par des bactéries lactiques. Elles sont généralement absentes sur le poisson frais et contaminent les produits lors des étapes de transformation **(Pilet *et al*** cités par **Sutra *et al*, 1998).**

1-2-5.1 – Les lactobacilles

Les souches de lactobacilles sont constituées de bacilles à Gram positif, longs et fins (parfois incurvés) ou de coccobacilles dont la forme évoque une corynébactérie. Ils sont non sporulés, généralement immobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche), micro-aérophiles (mais certaines souches sont anaérobies strictes à l'isolement), catalase négative, généralement nitrate réductase négative, possédant un métabolisme fermentatif (l'acide lactique représente au moins 50 p. cent des produits de fermentation) et présentant des exigences nutritionnelles complexes.

Les *Lactobacillus* sp. sont associés aux muqueuses de l'homme et de l'animal et ils ont une importance considérable dans l'industrie agro-alimentaire (ferments, producteurs d'arômes, probiotiques...) ou dans l'industrie pharmaceutique (préparations visant à maintenir ou à restaurer les flores). **(http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/thermotolerans.html).** Ils sont parfois très proches des *Streptococcus, Lactococcus* ou des *Pediococcus* malgré la morphologie, qui peut d'ailleurs être coccoïde. **(http://www.techmicrobio.net systématique/ gram positif/ lactobacillus/lactoB html).**

Le genre *Lactobacillus* est, quantitativement, le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les *Lactobacillus sp* sont très hétérogènes et les diverses espèces présentent des caractères phénotypiques, biochimiques et physiologiques variés. Cette hétérogénéité est reflétée par les valeurs des % GC qui, selon les espèces, varient de 32 à 55.

Selon le type fermentaire **(Figure 5)**, on distingue :

- Les lactobacilles homofermentaires stricts (ancien sous-genre "***Thermobacterium***") qui dégradent les hexoses en acide lactique (exclusivement par la voie homofermentaire d'Embden Meyerhof), qui ne dégradent pas les pentoses et qui ne produisent pas de dioxyde de carbone lors de la fermentation du glucose ou du gluconate

- Les lactobacilles hétérofermentaires stricts (ancien sous-genre "***Betabacterium***") qui fermentent les hexoses (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase / phosphocétolase) en acide lactique, acide acétique ou éthanol et dioxyde de carbone et qui dégradent les pentoses (voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3-phosphate / pyruvate kinase / lactate déshydrogénase) en acide acétique et en acide lactique. Ces bactéries produisent du dioxyde de carbone lors de la fermentation du glucose ou du gluconate

- Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (ancien sous-genre "***Streptobacterium***") qui métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden Meyerhof et qui dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de dioxyde de carbone lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate **(http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/thermotolerans.html)**.

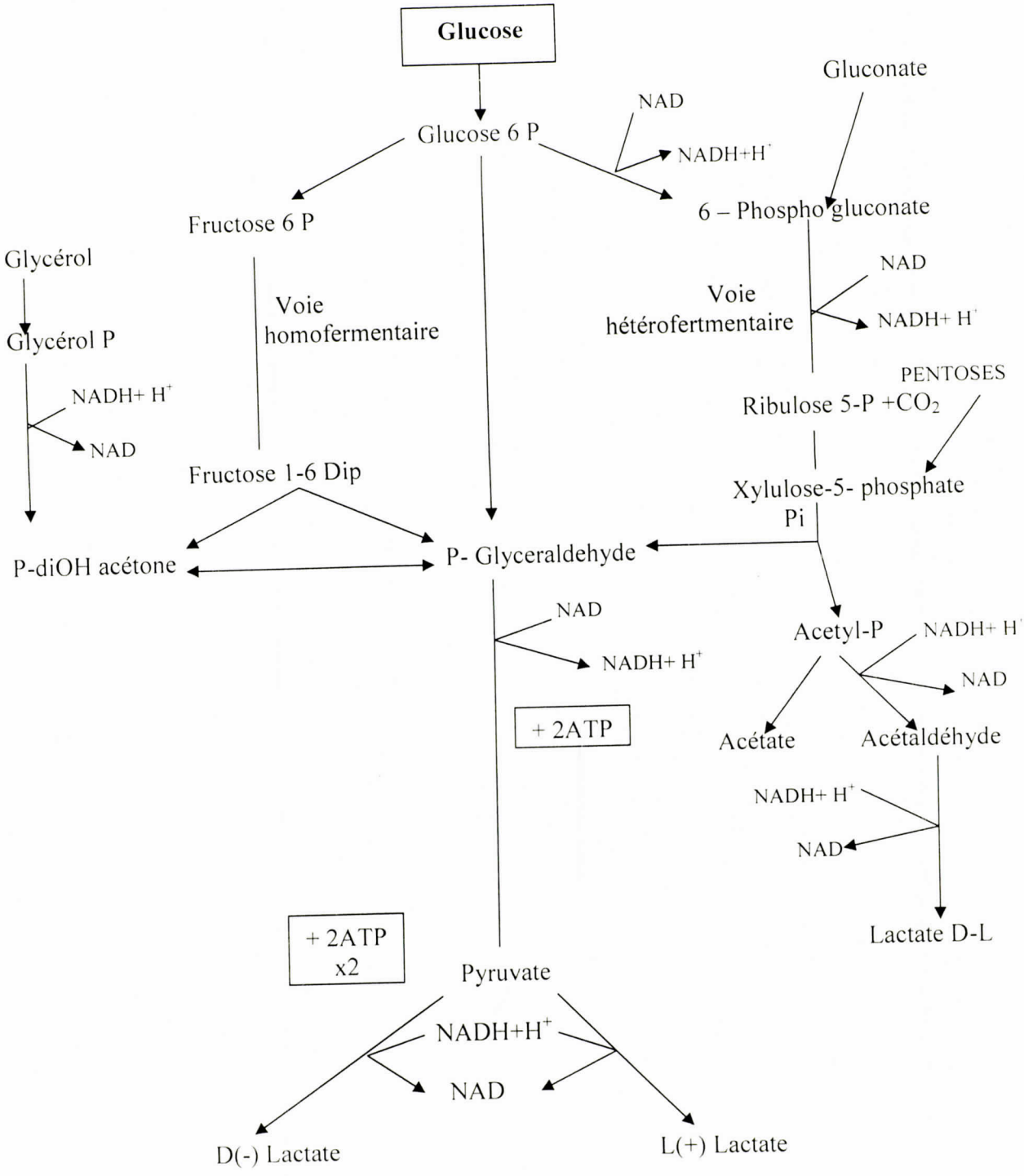


Figure 5 : Principales voies fermentaires chez *Lactobacillus*

(Larpent, 1996)

Des souches de *Lactobacillus acidophilus* ou un mélange de souches de diverses espèces de lactobacilles (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*) peuvent avoir un effet bénéfique sur la croissance lorsqu'elles sont administrées à des poulets de 1 jour. Des souches de *Lactobacillus animalis* et de *Lactobacillus fermentum* sont aptes à adhérer aux cellules épithéliales du tube digestif et à bloquer les sites nécessaires à l'attachement des salmonelles. La souche ST1 de *Lactobacillus crispatus* pourrait s'opposer à la colonisation de l'intestin par des souches de salmonelles ou de *Escherichia coli* pathogènes et la souche CTC2197 de *Lactobacillus salivarius* s'oppose à la colonisation par *Salmonella enteritidis* **(http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/thermotolerans.html).**

Les *Lactobacillus* sont des bactéries classiques du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus* en association avec *Streptococcus thermophilus*) dénuées de pouvoir pathogène. Ces bactéries interviennent d'ailleurs dans d'autres produits alimentaires comme le saucisson ("sorte de yaourt de viande"), la choucroute...
On rencontre des *Lactobacillus* dans la flore intestinale et la flore vaginale (sous le fameux nom de *Lactobacillus acidophilus* ou flore de Döderlein). On ne peut exclure une parenté entre flore vaginale et fécale. Ce sont des conditions écologiques qui favorisent la multiplication des *Lactobacillus* dans le vagin (production de glycogène par la femme, imprégnation oestroprogestative)
(www.techmicrobio.net/systématique/gram positif/lactobacillus/lacto.html).

Quelques espèces de lactobacilles sont utilisées industriellement pour la production du yaourt, de la choucroute, des pickles et d'autres aliments fermentés, ainsi que pour l'ensilage.
(http://fr.wikipedia.org/wiki/Lactobacille).

Lactobacillus fait partie de la flore de surface des carcasses. Ils se développent peu sur la viande fraîche par rapport aux autres bactéries contaminantes. En revanche, l'analyse microbiologique des viandes conservées sous vide ou sous atmosphère modifiée montre que la flore lactique est la plupart du temps majoritaire. Les différentes études d'identification effectuées sur cette flore ont montré qu'elle était essentiellement constituée de *Lactobacillus*, *Carnobacterium* et *Leuconostoc* **(Pilet *et al*** cités par **Sutra *et al*, 1998).** La production d'acide lactique entraîne une acidification de l'environnement, ce qui inhibe la croissance de certaines bactéries nocives.
Les principales caractéristiques des lactobacilles sont montrées dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Principaux caractères des *Lactobacillus* (LEVEAU *et al*, 1991)

	Croissance à 15°C	Croissance à 45°C	Lactose	Saccharose	Gluconate	Ribose	Xylose	Arginine dihydrolase
Lb delbrueckii ssp delbrueckii	-	+	-	+	-	-	-	±
Lb delbrueckii ssp bulgaricus	-	+	+	-	-	-	-	-
Lb delbrueckii ssp lactis	-	+	+	+	-	-	-	±
Lb acidophilus	-	+	+	+	-	-	-	-
Lb gasseri	-	+	±	+	-	-	-	-
Lb crispatus	-	+	+	+	-	-	-	-
Lb herlveticus	-	+	+	-	-	-	-	-
Lb plantarum	+	-	+	+	+	+	±	-
Lb casei ssp casei	+	-	±	+	+	+	-	-
Lb casei ssp pseudoplantarum	+	-	+	+	+	+	-	-
Lb casei ssp tolerans	+	-	+	-	-	-	-	-
Lb casei ssp rhamnosus	+	-	+	+	+	+	-	-
Lb sake	+	-	+	+	-	+	-	-
Lb curvatus	+	-	±	-	+	+	-	-
Lb bavaricus	+	-	+	+	+	+	-	-
Lb bifermentans	+	-	-	-	-	+	-	-
Lb brevis	+	-	±	±	+	+	±	+
Lb buchneri	+	-	±	±	+	+	±	+
Lb fermentum	-	+	+	+	+	+	±	+
Lb kefiri	+	-	+	-	+	+	-	+
Lb confusus	+	-	-	+	+	+	+	+
Lb viridescens	+	-	-	±	-	-	-	-

1-2-5.2 – Les carnobactériums

Des études menées sur les produits carnés ont conduits à isolés des bactéries lactiques décrites comme des lactobacilles atypiques peu acidifiantes et psychrotrophes.

Le genre *Carnobacterium* a été proposé en 1987 par Collins *et al* pour classer *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus divergens* et *Lactobacillus piscicola* ainsi que des souches ressemblant à des lactobacilles et isolées de viandes de volailles par Thornley en 1957. Les souches de Thornley sont hétérogènes et des études de taxonomie numérique ont montré qu'elles formaient trois groupes distincts désignés sous les noms de groupe 1, 2 et 3 de Thornley et Sharpe.

Toutes ces bactéries présentent un caractère inhabituel pour des *Lactobacillus* sp car elles sont incapables de croître sur la gélose à l'acétate de Rogosa (milieu commercialisé contenant 25,0 g d'acétate de sodium par litre). La détermination du G + C pour cent, les études d'homologies ADN - ADN, l'analyse des acides gras, la composition du peptidoglycane et les résultats d'études biochimiques et physiologiques montrent que:

- les souches du groupe 1 de Thornley et Sharpe appartiennent à l'espèce *Brochothrix thermosphacta* ;
- la majorité des souches du groupe 2 de Thornley et Sharpe sont identiques soit à *Lactobacillus divergens* soit à *Lactobacillus carnis* ;
- les souches du groupe 3 de Thornley et Sharpe ainsi que les souches MT44 et MT45 du groupe 2 constituent de nouvelles espèces ;
- *Lactobacillus carnis* est un synonyme ultérieur de *Lactobacillus piscicola* ;
- *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, les souches du groupe 3 de Thornley et Sharpe et les souches MT44 et MT 45 constituent un nouveau genre.

Les auteurs baptisent ce nouveau genre *Carnobacterium*, ils valident les nouvelles combinaisons de *Carnobacterium divergens* et de *Carnobacterium piscicola* et ils décrivent les nouvelles espèces *Carnobacterium gallinarum* (souches MT44 et MT 45 de Thornley et Sharpe) et *Carnobacterium mobile* (souches du groupe 3 de Thornley et Sharpe).

Les études phylogénétiques ont montré qu'en dépit d'une ressemblance avec les *Lactobacillus* sp. les *Carnobacterium* sp sont plus proches des genres *Isobaculum*, *Desemzia*, *Lactosphaera*, *Enterococcus*, *Vagococcus* et *Atopobacter* que du genre *Lactobacillus*. Selon **Montel *et al.* 1991**, il pourrait exister deux sous-espèces au sein de l'espèce *Carnobacterium maltaromaticum*.

Il est difficile de distinguer le genre *Carnobacterium* du genre *Lactobacillus*. On peut toutefois noter que les *Carnobacterium* sp. ne cultivent pas sur les milieux à l'acétate de Rogosa, qu'ils sont capables de se développer à des pH plus élevés que les *Lactobacillus* sp. (croissance possible jusqu'à pH 9,1), qu'ils sont parfois mobiles (*Carnobacterium alterfunditum*, *Carnobacterium funditum*, *Carnobacterium inhibens* et *Carnobacterium mobile*), qu'ils produisent principalement de l'acide L-lactique, que leur principal acide gras est l'acide oléique. **(http://www.bacterio.cict.fr).**

La distinction entre les genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium* se fait à partir de la croissance sur gélose à l'acétate, la composition de la paroi (présence d'acide méso-diaminopimélique) et le caractère psychrotrophe **(Tableau 7).**

Tableau 7 : Critères distinctifs de *Lactobacillus et des Carnobacterium* (Larpent *et al.* 1996).

CaractereS	*Lactobacillus*	*Carnobacterium*
Croissance sur gélose acétate (pH 5,4)	+	-
Croissance à pH 4,5	+	-
Croissance à pH 9 (MRS + saccharrose 2 %)	-	+
Acide lactique	L(+), D(-), DL	L(+)
Peptidoglycane	Lys, mDAP, Qm	mDAP
Acide gras principal C18 :1	Acide cis-vaccinique	Acide oléique
Fermentation du glucose	Homofermentaire ou hétérofermentaire	Homofermentaire avec production retardée de CO_2
G+C %	32-55	33-37,2

Le genre *Carnobacterium* est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, à Gram positif, se présentant de manière isolés ou groupés par deux ou parfois en courtes chaînes, non sporulés, mobiles ou immobiles, aéro-anaérobies, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative, à métabolisme fermentatif (production d'acide lactique), incapables de croître sur des milieux à l'acétate, ne cultivant ni en présence de 8 p.cent de NaCl ni à 45 °C, cultivant à 10 °C et parfois à 0°C. **(http://www.bacterio.cict.fr) (Tableau 8).**

Tableau 8: Caractères permettant de différencier les espèces du genre *Carnobacterium* (http://www.bacterio.cict.fr)

	C. alter-funditum	*C. divergens*	*C. funditum*	*C. gallinarum*	*C. inhibens*	*C. mobile*	*C. maltaro-maticum*	*C. viridans*
Croissance à 37 °C	-	+	-	+	-	D	+	-
Mobilité	+	-	+	-	+	+	-	-
VP	-	+	-	+	-	-*	+	-
ADH	-	+	-	+	-	+	+	
Phosphatase alcaline**	-	-	-	-		-	-	
Bêta-galactosidase**	-	-	-	-		-	-	
Bêta-glucosidase**	+	+	-	+		+ (faible)	-	
Bêta-glucuronidase**	+	+	+	+		+	+	
Amygdaline***	+	+	-	+	+	-	+	-
Cyclodextrine***	-	+	-	-		-	+	
Gluconate***		+*		+	-	-	+	-
Glycogène***	-	-	-	-		-	-	
Inuline***	-	-	-	-	+ (faible)	+	d	-
Lactose***	-	-	-	+		-	+ ou faiblement +	+
Mannitol***	-	-	+	-	+	-	+ ou faiblement +	-
Mélézitose***	-	D	-	+	-	-	d	-
Alpha-méthyl-D-glucoside***		-		+	-	-	+ (faible)	-
Alpha-méthyl-D-mannoside***		-		-	-	-	+*	-
Pullulane***	-	-	-	-		-	-	
D-ribose***	?****	+	?****	+	+	?****	+	-
D-tagatose***		-		+	-	-*	-	+
D-turanose***		-		+	-	-	+*	-
D-xylose***	-	-	-	+	-	-	-	-

* : Quelques souches peuvent faire exception ** : Caractères étudiés en galeries API ZYM
*** : Acidification **** : l'acidification du ribose est positive selon Holley *et al* 2002 et négative selon Collins *et al* 2002

1-2-6 Identification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont identifiées selon la physiologie ainsi que les caractères biochimiques.

Cette identification est en fonction :

- de la température de croissance
- du résultat de la coloration de Gram (coloration de Gram positive)
- de l'aspect macroscopique (taille, forme, couleur, ..) des colonies sur milieux de culture gélosés
- de leur aspect microscopique (bactérie de type coque ou bacille); avec un mode d'association de cellules isolées, en paires ou en chaînettes,...
- de leur mobilité (immobiles, sauf exceptions)
- du type respiratoire (aéro-anaérobie facultatif ou microaérophile)
- des besoins nutritionnels (nécessité de substances particulière pour le développement)
- de la capacité à utiliser certaines sources de carbone ou d'azote (on parlera de biotypes ou biovars, de zymotypes ou zymovars)
- du test de croissance en milieux hostiles

L'identification des espèces se base sur le profil de fermentation des différents glucides, sur la dégradation de l'arginine, la production de dextrane et l'isomère de l'acide lactique. D'autres tests peuvent être utilisés comme la recherche du pouvoir hémolytique ou le sérogroupage pour certaines espèces de *Streptococcus* et *Enterococcus*.

Pour d'autres espèces comme *Pediococcus* ou *Tetragenococcus*, leur croissance nécessite des conditions extrêmes de sel (18%) ou de température (50°C).

Selon la morphologie, il est essentiel de distinguer les bactéries lactiques sphériques (*Streptococcus, Lactococcus, Leuconostoc et Pediococcus*) des bactéries cylindriques (*Lactobacillus*). L'examen de préparations microscopiques révélées par la coloration de Gram permet de faire cette distinction. Certaines souches de *Leuconostoc* et de *Lactobacillus* peuvent être morphologiquement difficiles à différencier. **(http://www.bacterio.cict.fr/ bacdico/cc/carnobactérium html).**

- Méthodes traditionnelles d'identification

Les bactéries lactiques étaient identifiées principalement selon leur exigences nutritionnelles, leur capacité de fermenter les sucres (type fermentaire) d'où nécessité du choix du milieu sélectif riche en sucre, en matières azotées et surtout les facteurs de croissance (température, sel, pH), en plus de leur morphologie (cocci ou bâtonnet) et de la biochimie (composition de la paroi cellulaire, contenu en acide gras) **(Tableau 9, Figure 6 et Figure 7).**

Tableau 9 : Genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques

T°opt : température optimale de développement ; nb espèces : nombre d'espèce connues

(Pilet *et al.*,1998)

Genre	Morphologie	Fermentation	T°opt	Nb espèce
Lactobacillus	bacilles	homofermentaires ou hétérofermentaires	thermophiles ou mésophiles	GI : 23 GII : 16 GIII : 22
Carnobacterium	bacilles	hétérofermentaires	psychrotrophes	6
Lactococcus	coques	homofermentaires	mésophiles	5
Streptococcus	coques	homofermentaires	thermophiles ou mésophiles	19
Enterococcus	coques	homofermentaires	mésophiles	13
Vagococcus	coques mobiles	homofermentaires	mésophiles	2
Pediococcus	coques en tétrades	homofermentaires	mésophiles	7
Tetragenococcus	coques en tétrades	homofermentaires	mésophiles	1
Leuconostoc	coques	hétérofermentaires	mésophiles	11
Oenococcus	coques	homofermentaires	mésophiles	1
Bifidobacterium	forme irrégulière	acide acétique et lactique	mésophiles	25

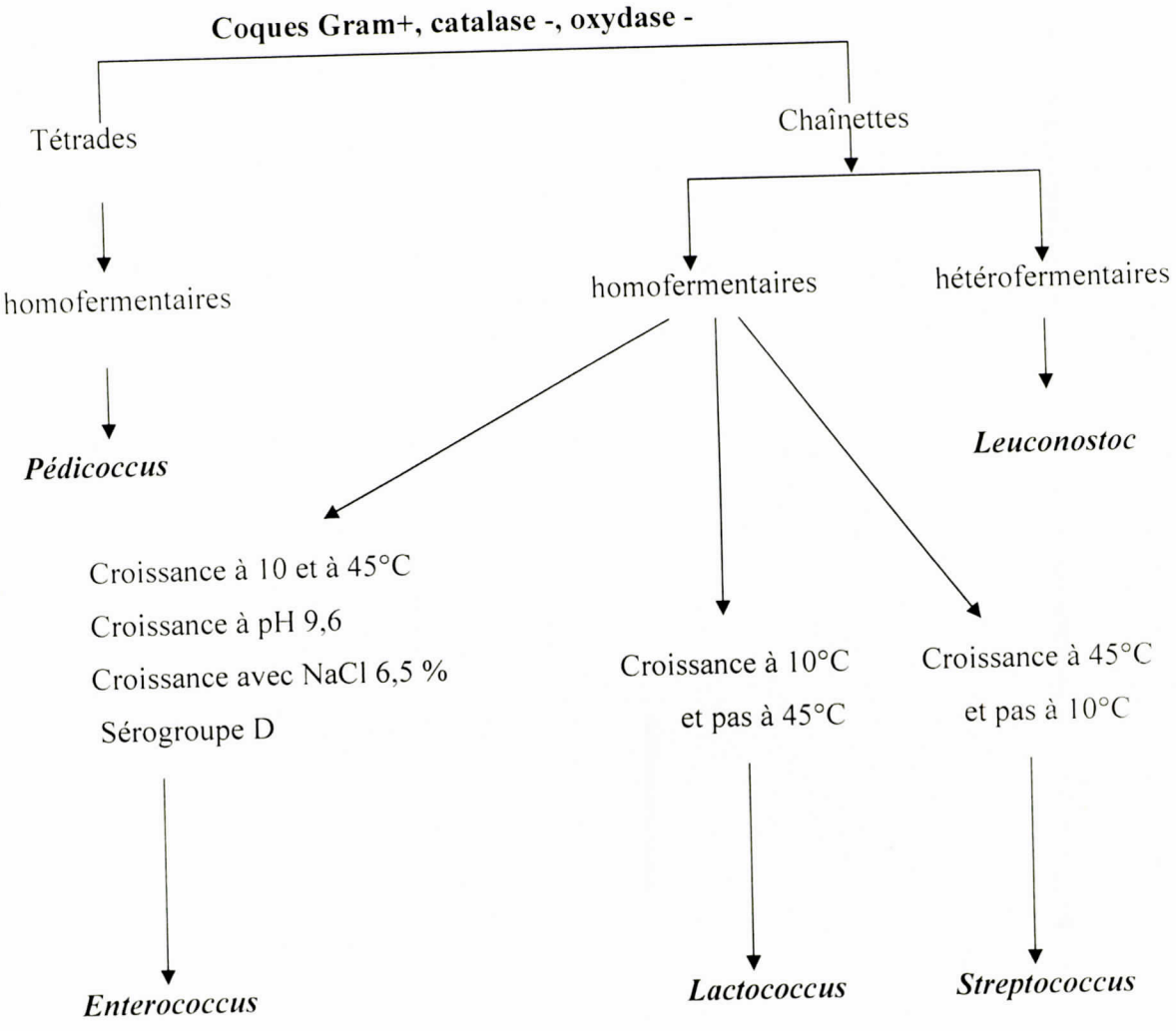


Figure 6 : Identification des coques lactiques

(Pilet *et al.* 1998)

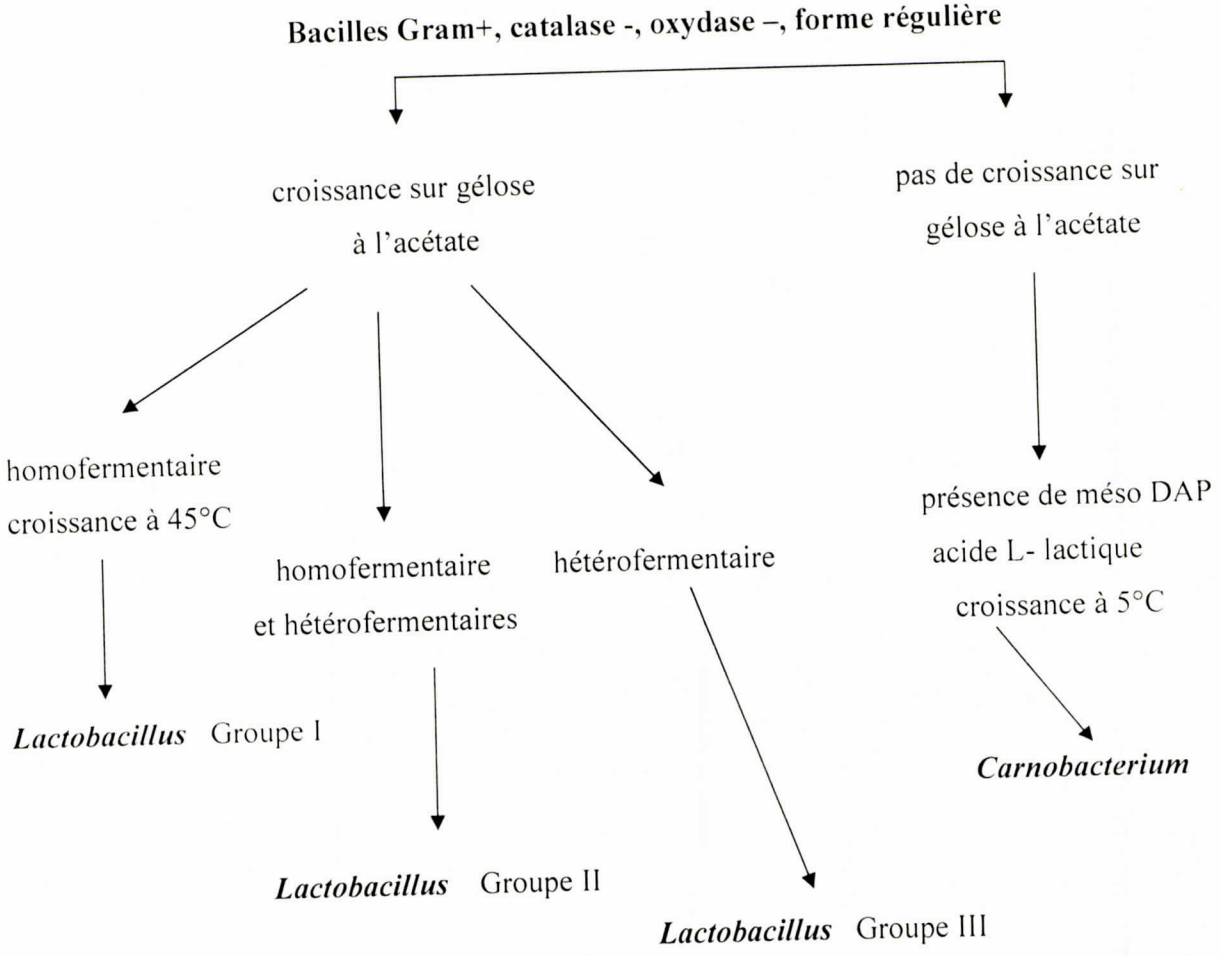


Figure 7 : Identification des bacilles lactiques

(Pilet *et al.* 1998)

- Méthodes modernes d'identification

Elles font appel à l'étude des constituants des cellules : composition en base de l'ADN : %GC ou identification moléculaire. Les bactéries de la flore lactique ont des %GC très différents d'une souche à une autre.

- pour *Lactococcus,Streptococcus thermophillus, Leuconostoc* et les *Pediococcus,* ces valeurs sont comprises entre 34 et 46 %.

- pour *Lactobacillus,* la valeur du %GC est comprise entre 32 et 53 %, ce qui indique une hétérogénéité avec l'existence d'un groupe taxonomique naturel pour les espèces appartenant à ce genre.

Il y a une homologie ADN/ADN et ADN/ARN entre les souches qui est établie par des techniques d'hybridation, la séquence nucléotidique de l'ARN16S.
Les propriétés technologiques (aptitude acidifiantes, aromatisantes, probiotiques, ...) permettent aussi de classer certaines souches de bactéries lactiques **(Bourgeois** et **Leveau, 1991).**.

L'identification des bactéries lactiques de la viande fraîche et des produits carnés est délicate. **Montel *et al.* 1991** ont proposé un schéma simplifié permettant d'identifier quelques espèces de *Carnobacterium* et de *Lactobacillus*. Dans ce schéma, *Carnobacterium maltaromaticum* et *Carnobacterium divergens* se caractérisent par la présence d'acide diaminopimélique dans la paroi (mis en évidence par chromatographie en couche mince), par l'absence de croissance sur le milieu à l'acétate de Rogosa, par la production d'acide L-lactique et par la production d'une arginine di-hydrolase.
La recherche de l'acidification du mannitol permet, ensuite, de différencier *Carnobacterium maltaromaticum* (réponse positive ou faiblement positive) de *Carnobacterium divergens* (réponse négative) **(http://www.bacterio.cict.fr/ bacdico/cc/carnobactérium html).**

1-2-7 Nutrition des bactéries lactiques :

Pour leur développement, les bactéries lactiques comme tous les micro organismes ont besoin de l'eau, d'une source d'énergie, de l'azote, des sels minéraux et des facteurs de croissance. La croissance ainsi que le métabolisme des bactéries lactiques sont fortement dépendant de l'environnement nutritionnel.

Ce sont des bactéries aéro-anaérobies, elles vivent dans le milieu où elles se trouvent grâce à un métabolisme respiratoire ou fermentaire. Elles sont saprophytes, chimio-organotrophes et hétérotrophes : elles puisent leur énergie à partir de composés organiques qu'elles décomposent en nutriments indispensables à leur survie, surtout des acides aminés et des peptides. Leur croissance est stimulée par le dioxyde de carbone.

1-2-7.1 Exigences en nutriments indispensables

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio *et al.*, 1994**) ; elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides (**Bourgeois** et **Larpent, 1996**). Elles tolèrent de petites quantités d'oxygène épuisées à partir du peroxyde d'oxygène. Les trop grandes teneurs peuvent leur être néfastes. Ceci peut probablement être relié au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le H_2O_2 doit être éliminé sinon son accumulation devient toxique. Le système le plus efficace d'élimination du H_2O_2 est une enzyme nommée catalase dont les bactéries lactiques sont déficientes. Les bactéries lactiques possèdent plutôt une peroxydase, moins efficace que la catalase. Ainsi, comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont considérées comme micro-aérophiles.

Les bactéries lactiques sont retrouvées dans divers environnements souvent enrichis en carbone inorganique. Elles ne peuvent croître que dans des milieux riches en vitamines, en bases nucléiques, source de carbone et d'azote. La plupart se développent sur des milieux qui contiennent tous les nutriments nécessaires. Elles ne se cultivent pas sur les milieux ordinaires.
Le milieu carné est un substrat particulièrement riche mais contient peut de sucre, essentiellement du glucose et du ribose

1-2-7.2 Activité protéolytique :

Les bactéries lactiques ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. La provenance de cet azote se fait par incorporation de composés azotés (réactions de désamination, de transamination).
La dégradation des protéines nécessite des enzymes protéolytiques qui sont les protéases et les peptidases.

Les enzymes extracellulaires des bactéries lactiques sont à l'origine de la dégradation des protéines en peptides. Après pénétration au niveau du cytoplasme, ces peptides subissent à leur tour un fractionnement par d'autres enzymes peptidiques intracellulaires **(Figure 8).** Les protéases interviennent sur les protéines pour les hydrolyser en peptides qui seront dégradés par la suite en acide aminés grâce aux peptidases Ces enzymes sont liées aux parois des enveloppes cellulaires et ont un rôle dans le développement des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés

Les acides aminés libres formés seront utilisés pour la biosynthèse des constituants cellulaires.

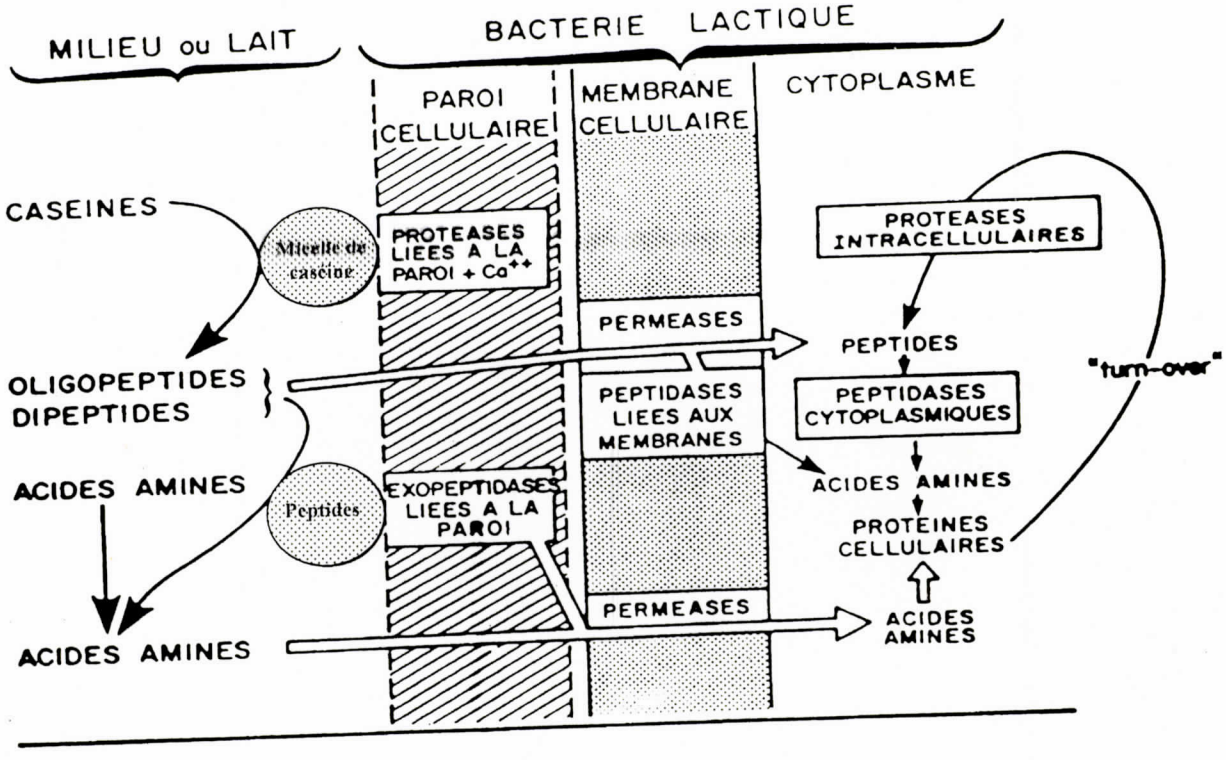


Figure 8 : Utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques (D'après Desmazeaud, 1983)

1-2-8 Métabolisme des bactéries lactiques :

C'est l'ensemble des réactions de dégradation (catabolisme) et de synthèse (anabolisme) permettant d'établir un cycle d'échanges avec le milieu environnant pour assurer la survie, la croissance et la reproduction. Les réactions cataboliques sont exergoniques c'est à dire qu'elles libèrent de l'énergie, alors que les réactions anaboliques sont endergoniques c'est à dire qu'elles consomment de l'énergie.

Au cours de la fermentation lactique, les diverses voies métaboliques servent à produire d'une part de l'énergie stockée dans des liaisons chimiques riches en énergie (ATP) et d'autre part, des précurseurs chimiques (sucres simples, acides aminés, nucléotides) nécessaires à la biosynthèse des macromolécules constitutives des bactéries **(De Roissart** et **Luquet, 1994).**

Chez les bactéries lactiques, l'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire. Si le substrat énergétique est complètement oxydé, il y a respiration mais s'il est partiellement oxydé donc une dégradation incomplète, il y a la fermentation qui peut être homo lactique ou hétérolactique.

1-2-8.1 Métabolisme des sucres et production d'acide lactique:

Les sucres sont les substrats énergétiques les plus importants chez les bactéries lactiques. Leur dégradation aboutit à la formation d'acide lactique par la voie homofermentaire ou bien l'acide lactique avec d'autres composés (éthanol et CO_2) par la voie hétérofermentaire. La différence qui existe entre les deux voies est détectable par le dégagement de CO_2 chez les bactéries hétérofermentaires. Par manque de fructose diphosphate aldolase, les glucides sont dégradés par la voie dite des pentoses phosphate ou des hexoses monophosphates. Les bactéries lactiques homofermentaires transforment une molécule de glucose en deux molécules de lactate par la voie de la glycolyse ou d'EMBDEN-MEYERHOF, PARNAS (EMP) **(Figure 9).**

1-2-8-2 Métabolisme des lipides :

Les bactéries lactiques présentent un faible pouvoir lipolytique et le rôle des acides gras dans la nutrition reste encore mal connu. Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et acides gras grâce à des enzymes exo ou endocellulaires. Le glycérol entre dans la voie de la glycolyse au niveau de la dihydroxyacétone phosphate. Les acides gras sont dégradés chez les microorganismes aérobies et aéro-anaérobies par oxydation qui se poursuit selon la longueur de la chaîne. Les triglycérides contenant des acides gras à chaîne courte sont facilement hydrolysées. Le système enzymatique intervenant dans ce processus dépend du pH et de la température selon les espèces présentes. L'activité estérasique des bactéries lactiques a été mise en évidence par plusieurs auteurs qui ont montré que ces enzymes pouvaient dégrader des lipides naturels. L'action sur les di ou mono glycérides semble plus importante que sur les triglycérides.

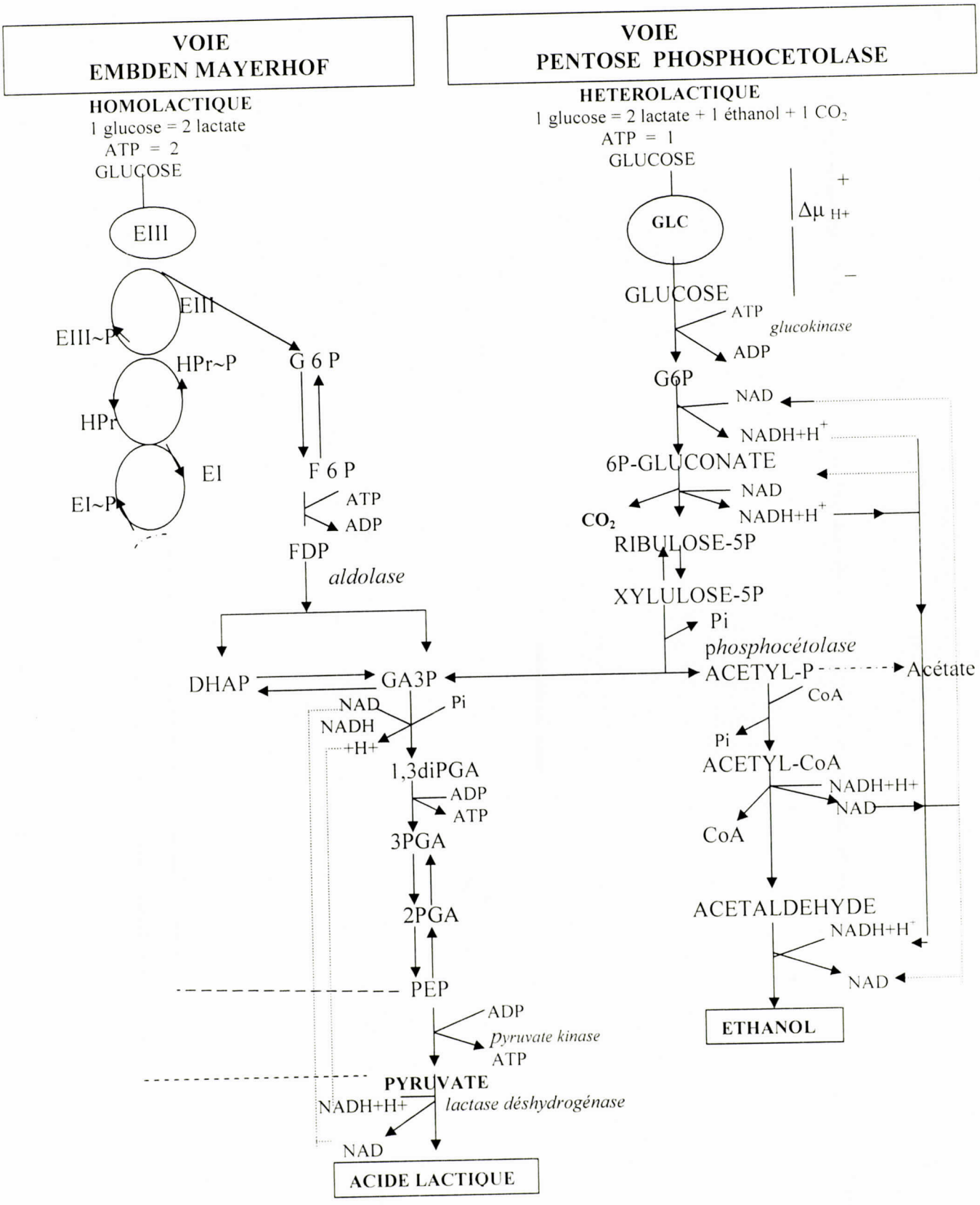


Figure 9 : Transport et métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (D'après Thompson, 1987)

1-2-9 Effet inhibiteur des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont souvent employées pour contrôler les pathogènes alimentaires sur les produits alimentaires ou les viandes cuites, fermentées ou réfrigérées. Jusqu'à maintenant, la plupart des recherches se sont intéressés à l'inhibition de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Clostridium botulinum* et des micro-organismes causant la détérioration.

Les bactéries lactiques représentent d'excellents candidats pour la diminution des niveaux de pathogènes dans les aliments parce qu'elles inhibent la croissance de ces micro-organismes par divers mécanismes sans entraîner des changements sensoriels inacceptables. Les recherches visent à maximiser l'utilisation des bactéries lactiques en sélectionnant les souches les plus appropriées.

Les produits carnés (viande fraîche, produits de salaison, saucisson sec) sont des milieux de prédilection pour différentes espèces bactériennes. Parmi celles-ci, certaines bactéries lactiques jouent un rôle important dans la conservation des produits carnés en inhibant le développement d'espèces pathogènes ou d'altération. Les premières sont responsables d'intoxication alimentaire et les secondes peuvent occasionner des pertes importantes pour l'économie de la filière viande.

La principale bactérie vivant sur la viande et le poisson frais : *Lactobacillus sakei* **(Figure 10)**. Cette bactérie, utilisée couramment en Europe pour la fermentation des produits carnés comme le saucisson sec, montre des propriétés qui pourraient être utilisées également pour une meilleure conservation de la viande fraîche (ou du poisson), en préservant sa qualité microbiologique.

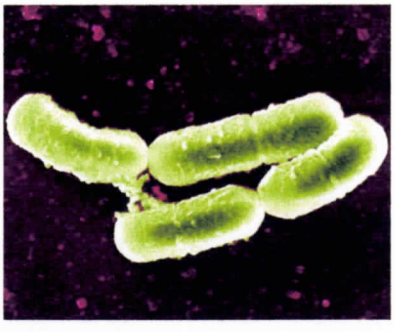


Figure 10 : *Lactobacillus sakei* en culture vu au microscope électronique (© INRA/A. Marceau,2005) (http://www.inra.fr/presse).

En ce qui concerne la conservation des produits carnés ou dérivés de poissons, l'utilisation de cette catégorie de bactérie est maintenant envisagée, non plus pour fermenter les produits, mais pour préserver leur qualité microbiologique. Dans ce cas, ces bactéries doivent être présentes, mais ne pas se développer en trop grande quantité, ne pas altérer les qualités organoleptiques du produit (couleur, flaveur, texture), et empêcher les bactéries indésirables de se développer.

On reconnaît depuis longtemps aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antagonistes tels que des acides organiques, les peroxydes d'hydrogènes et des protéines antimicrobiennes. Les acides lactique et acétique excrétés par ces bactéries, sont les principaux accepteurs d'électrons et les produits terminaux du métabolisme fermentaire. Ces acides organiques assurent deux importantes fonctions antimicrobiennes sous leur forme indissociée, ils traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acide, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire annulé **(Kashket, 1987)** ; ainsi l'accumulation d'acides organiques est directement inhibitrice pour les microorganismes nuisibles qui présentent un seuil bas de résistance aux changements de pH intracellulaire.

D'autre part, en condition acide, la compétitivité des bactéries lactiques se trouve améliorée, étant donné leur plus grande tolérance au bas pH extra et intra cellulaires. Les effets antimicrobiens dus à l'acidification du milieu revêtent une importance capitale dans le processus de conservation des aliments fermentés par ces bactéries **(De Roissart** et **Luquet, 1994).**

Les bactéries lactiques inhibent aussi la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs telles les bactériocines **(Piard et Desmazeaud, 1991)** et en abaissant le pH par la production d'acide lactique **(Gilliland, 1985)**
(http://www. théses.ulaval.ca/2003/20742/ch01html).

Les bactéries lactiques produisent une grande variété de peptides ou de protéines ayant une activité antibactérienne. **(http://www.inra.fr/Direction/DIC/ actualités/Dossiers/OGM/OGM html)**. Ce sont les bactériocines. Ces peptides antibactériens ont une action contre les bactéries à Gram positif associées à l'altération de la qualité hygiénique des aliments et à certaines pathologies humaines.

Afin d'élaborer des stratégies permettant d'assurer l'innocuité, la salubrité et la conservation des produits alimentaires, l'étude des bactériocines a été abordée sous différents aspects : recherche et isolement de bactéries lactiques présentant des propriétés fermentaires et antibactériennes ; détermination de la position taxonomique des souches isolées selon les critères moléculaires ; étude de la biosynthèse des bactériocines en vue d'optimiser leur production dans des bioréacteurs ; purification et étude structurale ; caractérisation biochimique et génétique et utilisation en lutte biologique dans les aliments. **(http://iphc.in2p3/index php).**

2 – MATERIEL ET METHOIDES

2-1 MATERIEL

2-1-1 Matériel biologique

- **Viande bovine**

Nous avons effectué trente cinq prélèvements de viande bovine fraîche au niveau des abattoirs des communes de Mostaganem, de Mazagran et de Hassi Mamèche étalés sur une période de trois mois. Avant chaque prélèvement, nous avons examiné la viande juste après abattage de l'animal. Un examen macroscopique indispensable est fait pour effectuer un échantillonnage sur les différentes parties de la carcasse. Le prélèvement est fait stérilement à l'aide d'une pince et d'un couteau ou un scalpel après cautérisation de la surface de la carcasse soit : au niveau de l'encolure, des faces internes et externes des cuisses ainsi qu'au niveau des épaules. Ce sont des sites préconisés pour les prélèvements car la portion musculaire est importante et privilégiés par les germes.

Deux prélèvements ont été effectués :

* Le premier de 50 grammes de viande est immédiatement placé dans un sachet stomacher stérile (**Figure 11**).

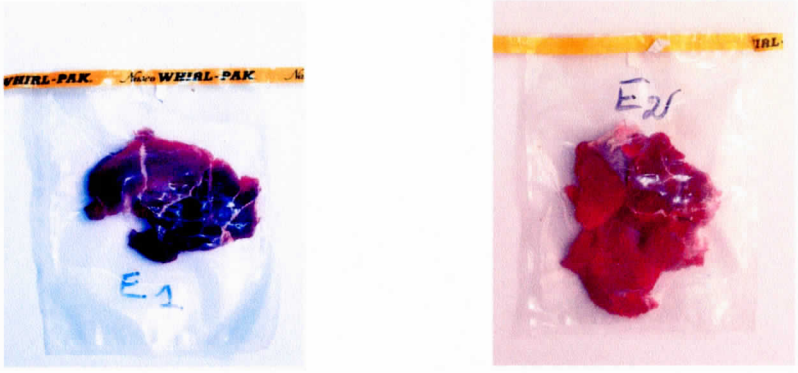


Figure 11: Aspect des échantillons de viande bovine fraîche dans des sachets stériles

* Le deuxième prélèvement de 1gramme est ensemencé directement dans un tube contenant 10 ml de milieu MRS liquide (**Figure 12**).

Un prélèvement de 50grammes qui sera congelé pour quatre semaines

E1T E2T E3T E4T E5T CT

Figure 12 : Cultures de la viande bovine fraîche (E1T, E2T, E3T, E4T et E5T) ou congelée 1 mois (CT) sur bouillon MRS.

- **Les bactéries tests**

Nous avons utilisé des souches de l'Institut Pasteur d'Alger qui ont été isolées à partir de différents produits alimentaires d'origine animale. Les souches sélectionnées sont *Salmonella enteritidis, Salmonella thyphimurium, Salmonella infantis, Shiguella sonei,* Shiguella flexnerei, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Streptococcus* D.

2-1-2 Matériel expérimental, réactifs et milieux de culture

Les principaux matériels, réactifs et milieux utilisés dans ce travail sont donnés **en annexe A1 et A2**

2–2 –METHODES

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire vétérinaire de Mostaganem ainsi qu'au laboratoire de Wilaya de Mostaganem et le laboratoire de l'Université de Mostaganem.

2-2-1 -Cultures à partir des prélèvements de viande

Nous avons utilisé deux méthodes :

- La première est celle envisagée par la norme algérienne **NA 1903** ou à la norme Afnor **NF V04 503** pour le dénombrement des bactéries lactiques dans les viandes et produits à base de viande. Les prélèvements en sachets stomacher stériles seront traités en plusieurs étapes :

***Préparation de la solution mère :**

- 25 g de l'échantillon sont placés dans un sachet stomacher stérile après une pesée à l'aide d'une balance à précision.
- 225 ml de Tryptone sel ou eau peptonnée tamponnée sont rajoutés afin d'obtenir la première dilution **(annexe A2.1).**

***Homogénéisation et dilution:** la préparation est placée dans un stomacher afin d'effectuer un broyage pendant une minute. La solution obtenue constitue la dilution mère DM (1/10). Une deuxième dilution est effectuée jusqu'à (1/100).

- La deuxième consiste à ensemencer directement 1 gramme de viande bovine fraîche à partir de la carcasse dans un tube contenant 10ml de bouillon MRS **(annexe A2.3)** (méthode non publiée, proposée par N-E. Karam).

2-2-2 Analyse bactériologique :

Les techniques appliquées sont conformes aux normes d'analyse microbiologiques de l'AFNOR. Ces normes comportent le dénombrement des levures et moisissures ainsi que le dénombrement de la flore lactique, qui ne figure pas dans les normes algériennes telles que décrites dans l'arrêté interministériel du 24 Janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 23 Juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires qui correspond au journal officiel N° 35 du 27 Mai 1998 **(annexe A3).**

Nous avons donc effectué :

- Le dénombrement de la flore mésophile totale
- Le dénombrement de la flore contaminante fécale : *E.coli* et coliformes thermotolérants à 44°C
- Les germes responsables d'intoxication : les anaérobies sulfito-réducteurs, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella.*
- Le dénombrement des levure et moisissures
- Le dénombrement de la flore lactique

2-2-2-1 Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale :

C'est la flore indicatrice : ces microorganismes sont aptes à se multiplier à l'air aux températures moyennes plus précisément ceux dont la température optimale de croissance est située entre 25°C et 40°C. L'ensemencement de ces germes se fait en profondeur sur la gélose nutritive ou la gélose PCA **(annexe A2.1).**

A partir des dilutions décimales, porter aseptiquement à l'aide d'une pipette graduée, 1ml dans une boite de Pétri vide puis compléter avec 15 à 20ml de gélose fondue et refroidie à 45°C ± 0,5°C. Bien mélanger l'inoculum au milieu de culture et laisser se solidifier sur une surface fraîche et horizontale (NA 1207/ISO 4833).

Après solidification, les boites sont incubées à 30°C pendant 72 heures. La première lecture est effectuée après 24 heures, ensuite la deuxième après 48 heures et la troisième après les 72 heures **(Bourgeois** et **Leveau, 1980).**

Le dénombrement des colonies est valide sur les boites de pétri contenant entre 30 à 300 colonies, les autres cas étant éliminés (absence de colonies ou nappe bactérienne).

2-2-2-2 Dénombrement de E.Coli et des coliformes thermotolérants à 44°C :

Les coliformes se caractérisent par leur aptitude à fermenter plus ou moins rapidement le lactose.

L'inoculation se fait par la technique de la double couche. Les milieux utilisés le plus couramment étant la gélose au désoxycholate ou de la gélose lactosée biliée au violet de gentiane et rouge neutre VRBL **(annexeA2.1)**. La technique a été normalisée par AFNOR **(NF V08-015)** ou **(NA 1615).**

Pour le dénombrement des coliformes totaux, les boites sont incubées à 37°C ±1°C pendant 24 heures.

Pour le dénombrement des coliformes fécaux, l'incubation se fait à 44°C ±1°C pendant 24 heures.

La lecture se fait par comptage de toutes les colonies typiques qui ont une coloration variant du rose au rouge foncé ayant poussées en masse dans les boites contenant entre 15 et 300 colonies (**FAO, Refaï , 1981.**).

2-2-2-3 Dénombrement des anaérobies sulfito réducteurs :

Ce sont des bactéries qui appartiennent à la famille des bacillaceae, anaérobies Gram positif, sporulés. Elles sont thermophiles, préférant une température de l'ordre de 45°C à 65°C. La température optimale de croissance est de 34°C à 37°C **(Christiane** et **Joffin, 1992).** L'ensemencement se fait sur le milieu Viande Foie additionné avec l'alun de fer et sulfite de sodium en tubes de puis incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures dans l'anaérobiose stricte après un chauffage de 10 minutes à 80°C dans un bain marie afin d'éliminer les formes végétatives et de garder uniquement les formes sporulées.

Le sulfite est réduit en sulfate par les *Clostridium* sulfito-réducteurs et réagit avec les ions ferriques en provoquant le noircissement des colonies. **(annexe A2.1)**

2-2-2-4 Dénombrement de *Staphylococcus aureus*

L'ensemencement est réalisé à partir des dilutions décimales sur un milieu spécifique BAIRD PARKER additionné au téllurite de potassium et au jaune d'œuf **(annexe A2.1).** 0.25 ml de chaque dilution sont étalés à l'aide d'un râteau stérile à la surface du milieu Baird partker en boites de Petri. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 heures à 48 heures. La lecture se fait sur toutes les colonies noires, convexes, brillantes de diamètre entre 0,5 et 2mm avec un liseré blanc opaque entouré d'une auréole claire. **(Christiane et Joffin, 1992).** La méthode de dénombrement est essentiellement basée sur la mise en évidence de la coagulase. Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma de l'homme et des animaux en 24 heures.

2-2-2-5 Recherche de Salmonelles

Ces germes appartiennent à la famille des entérobactériaceae, Gram négatif, hétérotrophes, aéro-anaérobies, mobiles grâce à une ciliature. Elles fermentent le glucose, le mannitol et le sorbitol avec production de gaz. Elles ne fermentent pas le lactose, le saccharose, et la salicine. Elles ne possèdent pas d'uréase, réduisent les nitrates en nitrites, ne produisent pas d'indole. Elles produisent de l'anhydride sulfureux. La recherche est faite selon le protocole suivant :

- Un pré enrichissement consiste à placer la solution mère préparée stérilement (25gr de viande fraîche homogénéisée avec 225ml d'eau peptonée tamponnée) dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.
- Un enrichissement à travers lequel un prélèvement de 1ml de la solution mère est ensemencé dans des tubes contenant des milieux sélectifs, le bouillon au sélénite **(annexe A2.2)** et 0,1 ml dans le bouillon Rappapport Vassiliadis **(annexeA2.2).**. Ces tubes ensemencés sont incubés à 37°C pendant 24 heures
- Isolement sur des milieux solides : ensemencement en stries sur la gélose HECKTOEN avec additif ou gélose SS **(annexe A2.1).** L'incubation est à 37°C pendant 24 heures.

Les colonies suspectes sont très petites, vertes ou bleues avec au sans un centre noir sur milieu.

- Identification avec galerie biochimique classique : Milieu urée indole, TSI, Citrate de Simmons, mannitol mobilité,... ou galerie API 20 ou API Z : Ensemencement de la colonie suspecte et incubation à 37°C pendant 24 heures.

2-2-2-6 Dénombrement des levures et moisissures

Elles sont dénombrées sur milieu Sabouraud **(annexe A2.1)** par ensemencement en surface et après incubation de 72 heures à 5 jours à 20-25 °C± 1°C. Elles sont capables de se développer en milieu acide et au froid. Leur croissance est moins rapide en général que celle des bactéries.

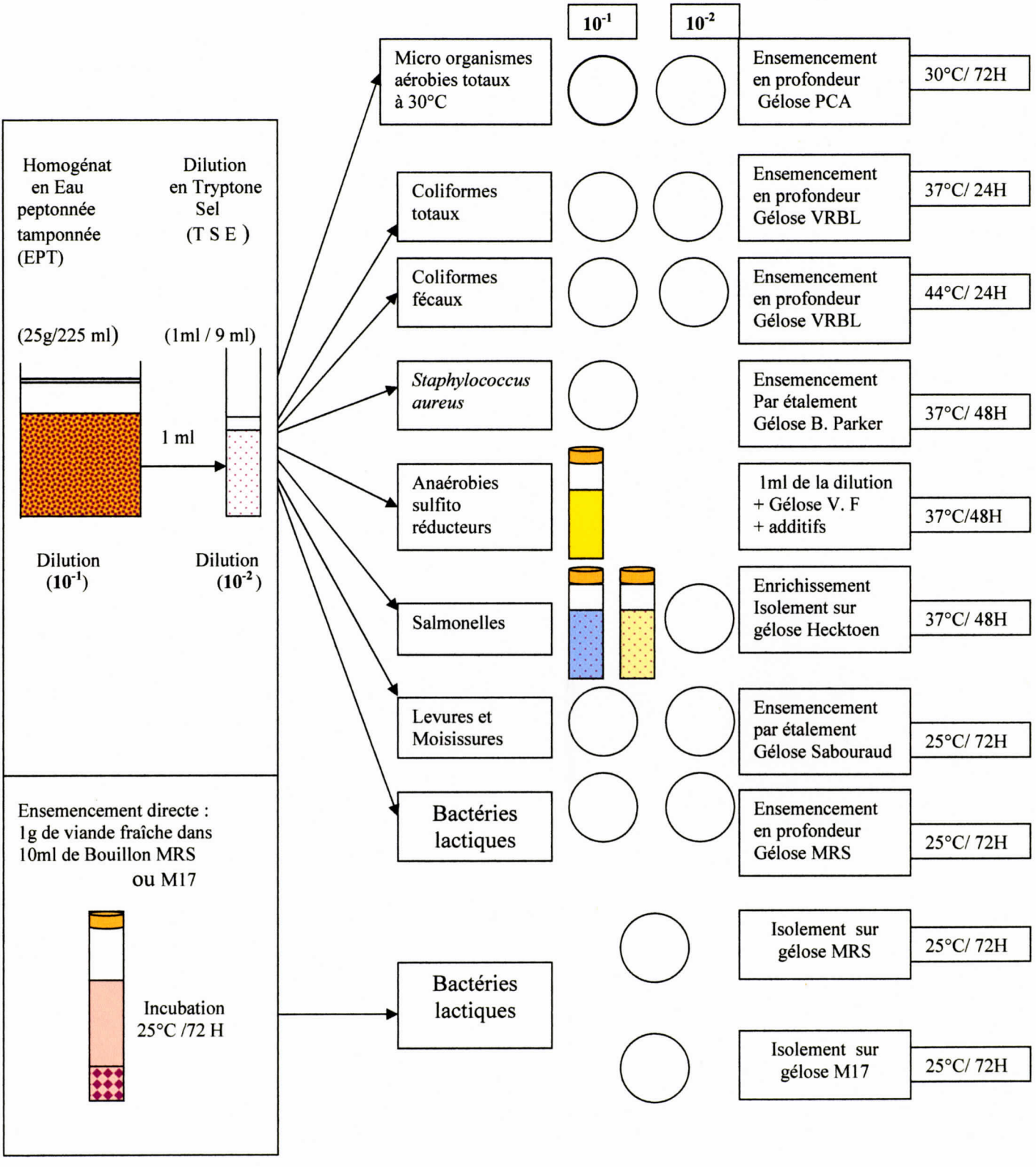


Figure 13 : Protocole expérimental de l'analyse bactériologique et de recherche des bactéries lactiques dans la viande bovine fraîche (manuel de Christiane et Joffin, 1992).

2-2-2-7 Recherche et dénombrement des bactéries lactiques

Le principe de la recherche et de dénombrement des bactéries lactiques dans la viande fraîche consiste en deux méthodes comme décrit sur la **figure 13.**

- La première méthode est décrite selon la norme algérienne **NA 1903** qui correspond à la norme Afnor **NF VO4 503** et consiste à ensemencer en profondeur 1ml des dilution préparées (1/10 et 1/100) dans des boites de pétri sur lesquelles sera coulé le milieu sélectif MRS solide **(annexe A2.3)** à pH 5.7 fondu et refroidi à 45°C.
- La seconde méthode consiste en un ensemencement direct de la viande bovine fraîche dans des tubes contenant 10 ml de milieu MRS liquide ou de milieu M17 liquide **(annexe A2.3)**.

L'incubation des cultures dure 24 à 72 heures à 25°C.

Un isolement par stries est réalisé pour les ensemencements en tubes sur milieu MRS solide préparé dans les boites de pétri qui seront incubées à 25°C de 72heures ± 3 heures. Après l'étape d'incubation, les colonies bactériennes sont isolées à partir de chaque boite de pétri ceci pour les colonies ayant poussées sur milieu MRS ou milieu M17.

Un dénombrement est effectué sur les boites ensemencées en masse. Le choix des souches est basé sur les critères auxquels répondent les bactéries lactiques.

2-2-2.7.1 Purification des souches, observations macroscopiques et microscopiques

La purification a été réalisée par repiquages successifs par la méthode des stries de colonies isolées en milieu solide, d'abord sur bouillon MRS puis sur milieu MRS solide jusqu'à obtention de colonies bien distinctes et homogènes.

La pureté des souches est estimée par des observations microscopiques.

L'observation à l'œil nu des colonies obtenues sur milieu solide permet d'en apprécier l'aspect, la forme, la taille et la couleur ainsi que leur nombre.

Les colonies de bactéries lactiques doivent répondre aux critères suivants :

- diamètre compris entre 0,5 à 1mm
- couleur blanchâtre ou opaque parfois translucide, laiteuse à crémeuse
- forme circulaire, lisse, arrondie et bombée
- contour régulier.

Une coloration de Gram est effectuée afin de déterminer la forme et la disposition des cellules bactériennes ainsi que leur comportement par rapport aux colorants utilisés **(annexe A7).**

La différence de coloration provient des différences structurales de la paroi bactérienne. Les bactéries à Gram positif prennent une coloration violette (celle du premier colorant) alors que celles à Gram négatif une coloration rose (celle du second colorant).

Les souches à Gram positif ont été retenues pour effectuer les différents tests d'identification.

2-2-2-7.2 Etudes des caractères physiologiques et biochimique

Ce sont des tests d'identification qui permettent de définir le genre bactérien ou éventuellement l'espèce bactérienne.

- **Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme qui existe chez les bactéries aérobies (strictes) et aussi, anaérobies facultatives **(Delaras, 1998)**. Elle leur permet de vivre en présence d'O_2 et de la production de peroxyde d'hydrogène lors du phénomène respiratoire. Cette enzyme décompose l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. Elle est mise en évidence par contact d'une colonie avec une solution d'eau oxygénée à 10 volumes. Le dégagement gazeux abondant sous forme de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée par action de la catalase selon la réaction :

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + \tfrac{1}{2}\, O_2$$

Ce test est déterminant dans l'identification des bactéries lactiques qui sont toutes catalase négative à l'exception de quelques lactobacilles qui possèdent une activité pseudocatalasique.

- **Recherche de l'oxydase**

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes. Elle assure la fixation de l'oxygène moléculaire sur le cytochrome réduit. Sa recherche se fait avec des disques imprégnés d'oxalate de diméthyl parphénylène diamine à 1%.

La présence d'oxydase se traduit par la présence d'une coloration violet après contact sur une disque imbibé d'eau distillée en quelques secondes d'une colonie et qui devient noire par la suite.

- **Croissance à différentes températures**

Ce test permet de distinguer les souches selon leur température optimale de croissance. Il sert à distinguer les bactéries mésophiles des thermophiles

Les souches sont ensemencées dans du milieu MRS liquide et sont incubées à différentes températures : 4°C, 10°C, 30°C, 45°C et 60°C. L'appréciation du trouble indique le développement de la culture.

- **Croissance sur milieu hypersalé**

Les souches sont ensemencées sur milieu MRS additionné de 6,5 % de Na Cl et incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures. La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble du milieu.

Les bactéries lactiques réagissent différemment à ce test.

- **Type fermentaire**

Le type du métabolisme de dégradation d'un substrat carboné est apprécié par la recherche du type fermentaire mettant en évidence la formation de CO_2 à partir de la dégradation du glucose.

Les bactéries lactiques sont ensemencées dans des tubes contenant 10ml de milieu MRS liquide et des cloches de Durham, puis incubés à 30°C pendant 24 à 72 heures.

L'apparition de gaz dans la cloche de Durham démontre qu'il y a un processus hétérofermentaire. L'absence de gaz signifie que le processus est homofermentaire.

- **Thermo résistance à 63°C pendant 30 minutes**

Les bactéries lactiques sont ensemencées en tubes contenant du milieu MRS liquide. Les tubes sont placés dans un bain marie à 63°C pendant 30 minutes puis, après refroidissement, ils sont mis à l'étuve à 30°C pendant 24 à 72 heures. L'absence de croissance indique que les bactéries ne sont pas thermo-résistantes.

- **Mise en évidence de l'arginine dihydrolase**

Ce test permet de caractériser les bactéries lactiques. Cette enzyme a l'aptitude de libérer l'ammoniac (NH_3) et la citrulline à partir de l'arginine. La décarboxylation de l'arginine conduit à la production de l'agmatine ou cadavérine (paraméthylène diamine) avec libération de NH_3 par désamination oxydative de l'arginine. Le milieu Moeller ou ADH **(annexe A2.3)**, enrichi avec de l'arginine, de couleur violette est distribué dans des tubes stériles à raisons d'1ml par tube puis ensemencé avec une colonie de

bactérie lactique. Ces tubes sont mis à l'étuve à 30°C pendant 24 heures. L'apparition de couleur jaunâtre dans les tubes témoigne de l'existence d'une activité arginine dihydrolase.

- **Fermentation des sucres :**

Ce test a été réalisé sur milieu MRS liquide où le glucose est remplacé par un autre sucre. Les sucres testés sont le rhamnose, le dulcitol, l'arabinose, le raffinose ou le mannose ainsi que les dextrines, saccharose, le lévulose pour certaines souches. L'appréciation de la croissance se fait par l'apparition du trouble du milieu ensemencé.

2-2-2-7.3 Conservation des souches :

Toutes les souches à coloration Gram positive, catalase négative, oxydase négative ont été retenues et conservées sur gélose inclinée à 4°C pour effectuer le test d'inhibition sur les germes indésirables.

2-3 - RECHERCHE DE L'EFFET INHIBITEUR DES BACTERIES LACTIQUES

Les souches des bactéries indésirables ont été revivifiées et réensemencées dans le milieu spécifique.
La méthode utilisée est celle de la diffusion sur milieu gélosé ou méthode des puits inspirée des travaux de LABIOUI H. *et al,* 2005. Elle consiste à préparer des boites de pétri avec le milieu spécifique (Hecktoen, VRBL) ensemencé par la souche de bactérie indésirable sélectionnée. Après solidification, des puits de 0,5ml sont creusés à l'intérieur de la gélose. Chaque puit reçoit 50 microlitres du surnageant d'une culture de 72 heures de bactéries lactiques en milieu MRS liquide.
Ces boites sont alors incubées à 37°C pendant 24 heures.

La recherche de l'effet inhibiteur est faite selon le schéma simplifié suivant : **(figure 14)**

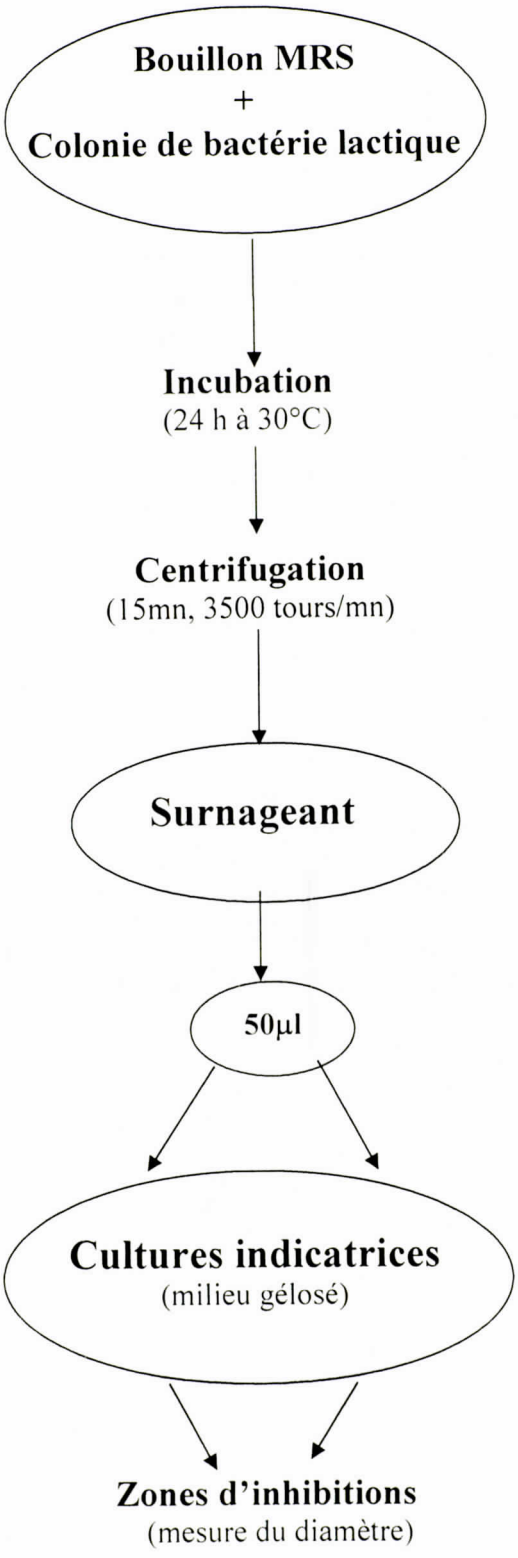


Figure 14 : Protocole de recherche de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques sur les germes indésirables par la méthode spot agar (schéma personnel).

3 – RESULTATS ET DISCUSSION

3-1 ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE LA VIANDE FRAICHE BOVINE

3-1-1 Flore microbienne

La flore microbienne était recherchée sur eau peptonée tamponnée. L'analyse de cinq échantillons de viande bovine fraîche a permis de constater la présence de levures et de moisissures mais par contre nous n'avons observé aucune croissance pour les germes de contamination. Les résultats de notre première expérimentation sont résumés dans le **tableau 10**

Tableau 10 : Dénombrement de la flore microbienne de la viande bovine fraîche(germes/gr).

Germe / Echantillon	Flore totale à 30°C	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	*Staphylococcus Aureus*	Anaérobies Sulfito Réducteurs	*Salmonella*	Levures et Moisissures
E1	**45.10^2**	-	-	-	-	-	+
E2	**5.10^2**	-	-	-	-	-	+
E3	**5.10^2**	-	-	-	-	-	+
E4	**6.10^2**	-	-	-	-	-	-
E5	**4.10^3**	-	-	-	-	-	-

E : échantillon **(-) : absence de culture** **(+) : présence de culture**

3-1-2 Flore lactique

La flore lactique a été recherchée sur milieu MRS. Nous avons observé la présence des colonies de couleur blanchâtre, opaque, laiteuse parfois translucide à contour régulier, d'un diamètre de 0,5 à 1mm et de forme circulaire dans toutes les boites ensemencées sur milieu MRS solide (**Figure 15**) par l'application des deux méthodes mais les résultats était plus significatifs par la méthode en tubes proposée par KARAM N.E. La mise en évidence des bactéries lactiques dans la viande bovine fraîche a été confirmée.

Figure 15: Aspect macroscopique des colonies de bactérie lactiques sur milieu MRS (Photo personnelle, 2007)

Lors d'un deuxième essai, nous avons pu isoler et dénombrer des bactéries lactiques à partir de 5 autres échantillons de viande analysés sur milieu MRS à 1 heure, à 24 heures et à 48 heures après abattage. Le dénombrement après 1 heure d'abattage est d'environ $\mathbf{2.10^2}$ pour tous les échantillons analysés. Après 24 heures de réfrigération, le nombre a diminué jusqu'à environ $\mathbf{10^2}$ mais inclue des levures et moisissures. Après 48 heures, on constate qu'il y a une diminution du nombre de bactéries lactiques pour certains, il y a une absence totale qui peut être du à la présence d'un stress du à la manipulation.

Les résultats du dénombrement de la flore lactique pour ces échantillons sont reportés sur le **tableau11**.

Tableau 11 : Dénombrement de la flore lactique de la viande bovine fraîche 48 heures après abattage.(germes /gr)

Temps d'abattage / Echantillons De viande bovine fraiche	1H	24H*	48H*
E1	180	140	100
E2	140	90	50
E3	230	100	90
E4	140	30	0
E5	90	120	70

* présence de levures et moisissures

Un 3ème essai nous a permis d'isoler et de dénombrer la flore lactique et non lactique sur milieux adéquats durant 5 heures après abattage selon les deux méthodes décrites en 2-2-1 ainsi que sur les échantillons congelés durant un mois. Les bactéries lactiques étaient recherchées sur milieu MRS.

Les résultats obtenus sont consignés dans le **tableau 12**.

Tableau 12 : Dénombrement de la flore lactique et non lactique de la viande bovine fraîche durant les cinq heures après abattage. (germes/gr)

Germes recherchés / Echantillon Temps	Flore totale à 30°C	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	*Staphylococcus Aureus*	Anaérobies Sulfito Réducteurs	*Salmonella*	Levures et Moisissures	Bactéries lactiques
1P 1h	**33.10^2**	-	-	40	-	-	-	5.10^2
2P 2h	**27.10^2**	-	-	20	-	-	-	2.10^2
3P 3h	**7.10^3**	100	-	-	-	-	-	2.10^2
4P 4h	**5.10^3**	3.10^2	-	50	-	-	-	**90**
5P 5h	**9.10^3**	2.10^2	10	120	-	-	-	**40**
CP 1 mois	**10**	-	-	-	-	-	-	2.10^2

- : absence de culture

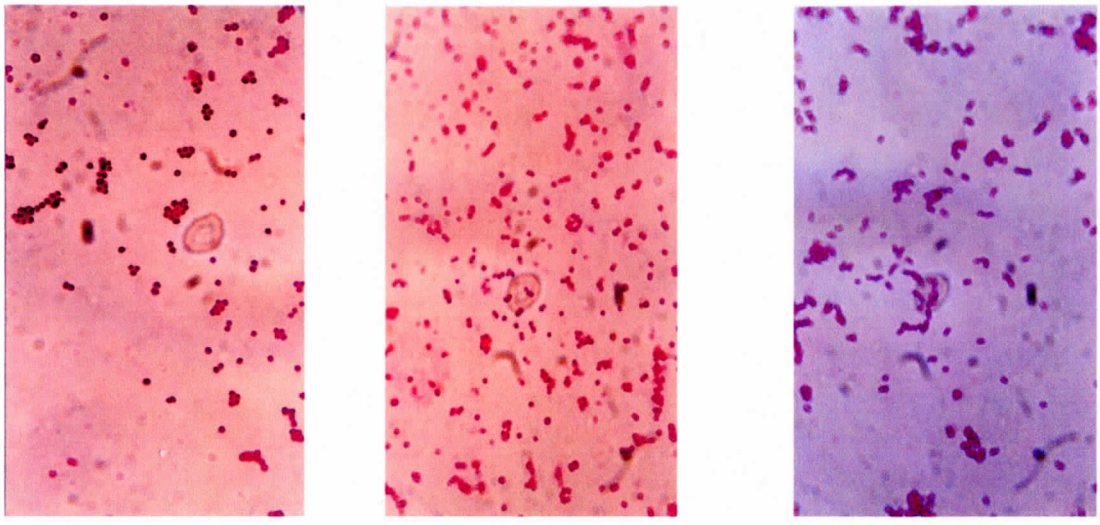
Durant les heures qui suivent l'abattage, il y a d'abord une augmentation de la flore qui s'explique par le phénomène de multiplication des bactéries lactiques. A la première heure, les bactéries lactiques s'attaquent aux glucides présents dans la viande, puis aux autres composés en produisant de l'acide lactique. Ensuite (un certain temps après abattage), on constate une diminution du nombre des bactéries lactiques : Sans doute à cause de la réfrigération. En ce qui concerne l'échantillon congelé, il n'y a pas eu de développement bactérien mais la flore lactique ressemble à celle des échantillons du test précédent qui nous laisse conclure que la flore initiale a été conservée durant la congélation.

3-2 IDENTIFICATION DES SOUCHES ISOLEES

3-2-1 Caractérisation morphologique

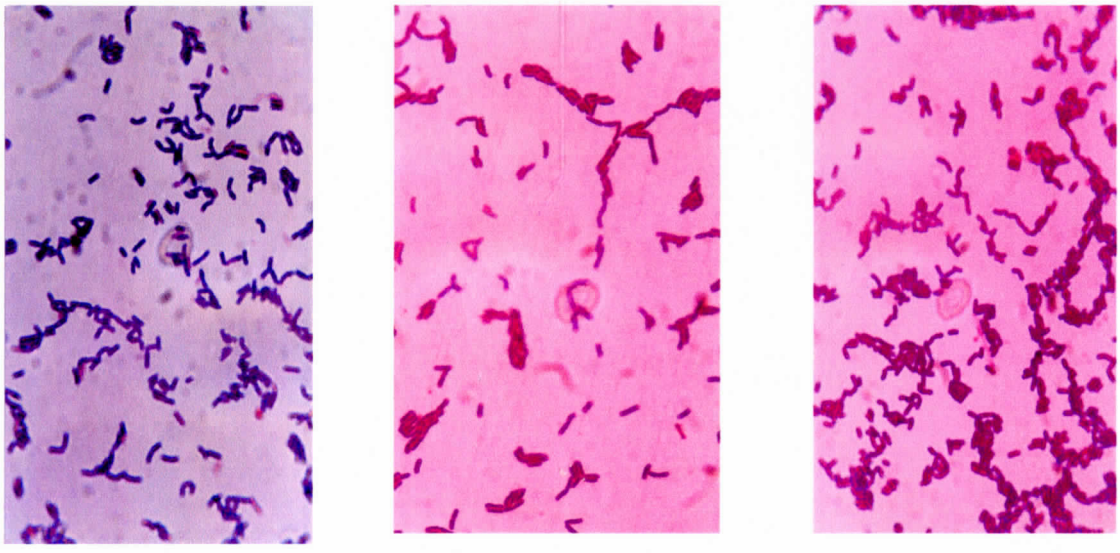
Les cultures pures ayant répondu aux examens macroscopiques ont été retenues pour une observation microscopique après coloration de Gram. Toutes les bactéries présentaient une coloration violette de leur paroi cellulaire. Ce sont donc des bactéries à Gram positif.

Elles ont une forme sphérique, en coque (**Figure 16**) ou allongée en bacille (**Figure 17**). Leur disposition était variée : en amas, en chaîne, en paire ou isolées.



E11 E15 E13

Figure 16 : Aspect microscopique des lactocoques isolés à partir de viande fraîche par la coloration de Gram, G=10x100 (Photo personnelle, 2007)



1T E4 E14

Figure 17 : Aspect microscopique des lactobacilles isolés à partir de viande fraîche par la coloration de Gram, G=10x100 (Photo personnelle, 2007)

3-2-2 Caractérisation biochimique et physiologique

- Toutes les bactéries testées étaient catalase et oxydase négatives
- Les souches retenues sont mésophiles (croissance importante à la température de 30°C) ou thermophiles (croissance importante à la température de 45°C).
- La recherche du type fermentaire a démontré qu'il y a production de gaz pour certaines souches (ex : E4P, E3P, ECT) donc elles sont hétérofermentaires alors que d'autres n'ont pas produit de CO_2 (ex : E11, E1T) elles sont homofermentaires **(Figure 18).**

Témoin E11 E1T E4P E3P ECT

Figure 18: Type fermentaire des bactéries lactiques (Photo personnelle, 2007)

- Parmi les bactéries lactiques isolées, il y a certaines souches dont le test à l'arginine dihydrolase était positif alors que pour la majorité il est négatif **(figure 19).**

E11 E4 E13 E1T E15 Témoin

Figure 19 : Mise en évidence de l'arginine dihydrolase (Photo personnelle, 2007)

Tous les tests réalisés sont résumés dans le **tableau 13**

Tableau 13 : Caractères physiologiques et biochimiques des souches lactiques isolées à partir de la viande bovine.

Souches	Coloration de Gram	Type Fermentaire	Oxydase	ADH	Température de croissance				Thermorésistance 60°C /30min
					4°C	10°C	30°C	45 °C	
E1	+	Homo	-	+	-	-	+	++	+
E2	+	Homo	-	-	-	-	+	++	-
E3	+	Homo	-	+	-	-	+	++	-
E4	+	Homo	-	+	-	-	+	±	±
E5	+	Homo	-	-	-	-	+	-	-
E7	+	Homo	-	-	-	-	+	-	-
E8	+	Homo	-	-	-	-	+	±	-
E9	+	Homo	-	-	-	-	+	-	-
E11	+	Homo	-	+	-	-	+	+	-
E12	+	Homo	-	-	-	-	+	+	++
E13	+	Homo	-	+	-	-	+	+	++
E14	+	Homo	-	+	-	-	+	+	++
E15	+	Homo	-	-	-	-	+	+	++
E1P	+	Homo	-	-	-	-	±	+	±
E2P	+	Homo	-	+	-	-	-	-	±
E3P	+	Hétéro	-	-	-	-	-	-	-
E4P	+	Hétéro	-	-	-	-	+	+	+
E5P	+	Homo	-	-	-	-	++	++	-
E1T	+	Homo	-	-	-	-	+	+	+
E2T	+	Homo	-	+	-	-	+	-	-
E3T	+	Homo	-	+	-	-	+	+	+
E4T	+	Hétéro	-	-	-	-	+	+	+
E5T	+	Homo	-	-	-	-	+	+	+
CP	+	Hétéro	-	-	-	-	-	-	-
CT	+	Hétéro	-	-	-	-	+	+	+
10V	+	Homo	-	-	-	-	+	++	+
20V	+	Homo	-	-	-	-	+	++	-

Aucune souche ne cultive à 4°C et à 10°C. On constate que 21 souches sur les 27 testées poussent à 45°C et sont donc thermophiles. Les souches E2P, E3P et CP (congelé, ensemencement en profondeur) n'ont pas résisté à la conservation en gélose inclinée à 4°C. Les souches E5, E6, E9 et E2T ne se développent qu'à 30°C.Les souches isolées 48heures après abattage et les souches ensemencées en tube sont thermorésistantes. Toutes les souches sont homofermentaires : la production de gaz est trouvée

chez 5 souches seulement. E4T, CP, CT, E3P et E4P. L'utilisation des différents sucres par les bactéries lactiques a été appréciée par la présence de trouble dans le milieu MRS liquide.

Le **tableau 14** rassemble les résultats obtenus.

Tableau 14 : Fermentation de quelques sucres par des bactéries lactiques

Sucres / Souches	Rhamnose	Raffinose	Dulcitol	Arabinose
E1	–	+	+	–
E2	+	+	+	–
E3	–	–	–	–
E4	+	+	–	+
E5	+	+	+	+
E8	+	+	+	+
E11	+	+	+	+
E12	–	–	+	–
E13	–	–	–	–
E14	+	+	+	+
E15	+	+	–	+
E1P	+	+	–	+
E2P	+	+	–	+
E3P	+	+	–	–
E5P	+	–	+	+
E1T	+	–	+	–
E3T	+	–	+	+
E4T	+	++	–	+
E5T	+	–	–	–
CP	+	+	+	–
CT	–	–	–	–

Ces résultats montrent les différences de fermentation des sucres par les bactéries testées, ce qui permet de pressentir leur diversité. Il serait intéressant de poursuivre cette étude à l'aide de galeries biochimiques d'identification (API50CH) afin d'identifier les espèces de lactobacilles ou de coques lactiques rencontrées dans la viande bovine.

3-3 INHIBITION DES GERMES INDESIRABLES PAR LES BACTERIES LACTIQUES

Nous avons voulu rechercher l'effet inhibiteur des bactéries lactiques sur des espèces indésirables. Pour cela nous avons réalisé des co-cultures afin de mettre en présence ces espèces indésirables avec les bactéries lactiques isolées de viande.

La présence d'inhibitions est décelée par absence de croissance autour du puit contenant une bactérie lactique inhibitrice. L'inhibition des bactéries indésirables est arbitrairement appréciée par le diamètre de la zone d'inhibition.

Les **figures 20, 21 et 22** montrent des exemples de résultats obtenus sur différents germes indésirables.

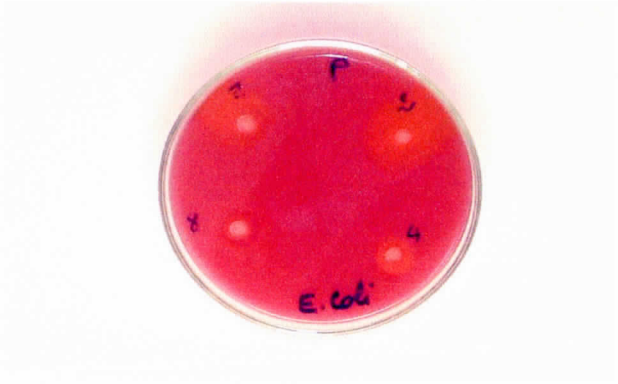


Figure 20 : Activité antibactérienne des souches lactiques sur *E. coli*.

Figure 21 : Activité antibactérienne des souches lactiques sur *Shigella flexnerei* (à gauche) et *Shigella sonei* (à droite).

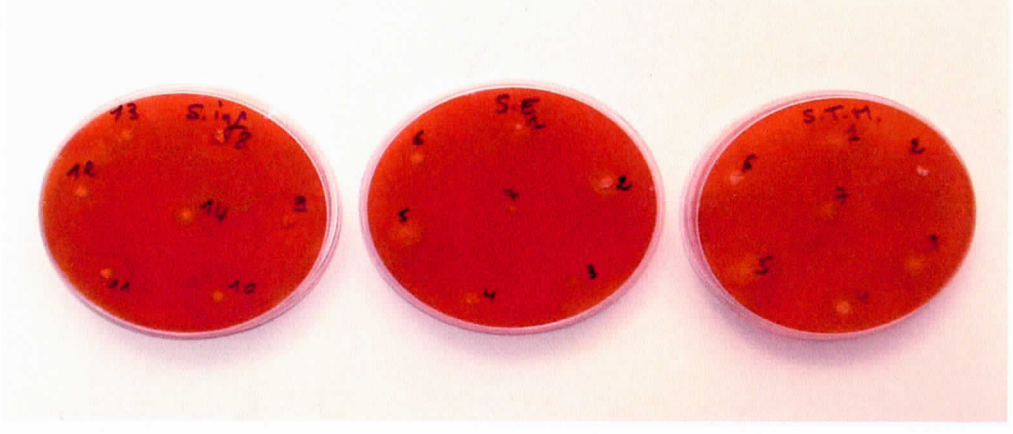


Figure 22: Effet antibactérien des souches lactiques vis-à-vis de *Salmonella infantis* (à droite), *Salmonella enteritidis* (au centre) et *Salmonella thyphimurium* (à gauche).

Le **tableau 15** rassemble les résultats obtenus lors de cette étude.

Les halos d'inhibitions observés ont des tailles variables allant de 0.5 mm à 10 mm, selon le couple « souche inhibitrice/souche indicatrice » considéré. On peut noter aussi l'absence d'inhibitions dans certains cas comme par exemple avec la souche 1T vis-à-vis des shigelles.

Tableau 15 : Inhibitions de certains germes indésirables par les bactéries lactiques isolées à partir de la viande bovine fraîche par la méthode de diffusion.

Souches pathogènes / *Souches Lactiques*	*Salmonella enteritidis*	*Samonella. infantis*	*Salmonella Thyphi*	*Shigella Sonei*	*Shigella flexnerei*	*E.coli (Heck--toen)*	*E.coli (DCLS)*	*Strepto - - coccus D*	*Staphylococcus aureus*
E1	1	3	1	1	3	1	3	2	1
E2	**10**	**5**	**3**	**8**	**2**	**1**	**1**	/	**2**
E4	4	2	0.5	0.5	2	3	4	0.5	3
E8	2	3	1	/	2	2	3	1	/
E11	**3**	**3**	**2**	**2**	**2**	**3**	**0.5**	**2**	**1**
E12	0.5	1	0.5	1	1	/	0.5	/	0.5
E13	1	2	2	0.5	1	2	0.5	/	/
E14	**3**	**4**	**3**	**0.5**	**2**	**1**	**2**	/	/
E15	**3**	**2**	**3**	0.5	0.5	**2**	**2**	/	/
1T	/	0.5	3	/	/	/	/	0.5	0.5
2T	2	1	2	1	1	2	1	0.5	2
3T	**2**	**2**	**2**	**3**	**1**	**2**	**2**	**1**	/
4T	2	1	1	3	1	1	1	/	4
CT	**3**	**4**	**3**	**2**	**2**	**3**	**2**	**1**	**1**
1P	1	10	1	2	2	1	1	/	/
2P	1	1	3	4	6	3	2	0.5	1
3P	**2**	**2**	**2**	**2**	**3**	**2**	**2**	0.5	3
4P	2	0.5	1	1	3	2	/	3	/
5P	1	/	2	2	3	1	/	0.5	1
1OV	2	1	2	1	0.5	1	/	/	2
2OV	2	1	1	1	1	1	/	/	/
4OV	**3**	**1**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**1**	**2**

On constate, qu'effectivement, les bactéries lactiques peuvent inhiber les germes pathogènes pouvant se trouver dans la viande bovine fraîche, surtout les salmonelles et les shigelles ainsi que les *E. Coli*.

Ceci est en parfait accord avec les observations rapportées dans la littérature. Selon les travaux de Smith L et al, 2005. **(http://www.texastech.edu/stories/0604-brashears.php)** ainsi que l'article rapporté par LiliAn en mai 2006 où un mélange de bactéries lactiques a été développé pour éliminer des pathogènes trouvés dans la viande de bœuf et d'autres types de viandes. Des chercheurs de l'Université du Texas ont mis au point un mélange de bactéries lactiques mésophiles qui élimineraient 99,9% des pathogènes des viandes de bœuf et de la volaille. Ce mélange de bactéries lactiques permet de réduire la population de *Salmonella* et de *E.coli* à 99,9% d'après les travaux de cette équipe **(www.blogagroalimentaire.com/dotclear).**

Pour la recherche des bactéries lactiques, la méthode proposée par **Karam N.E** donne de meilleurs résultats par rapport à la méthode de dénombrement préconisé dans la norme NA 1903 (voir § 2.2.1). Cette méthode est identique à celle de la recherche et dénombrement des bactéries lactiques dans le lait et produits laitiers sauf que l'isolement est fait en surface.
Dans les prochains essais, la méthode des tubes ensemencés sera considérée comme première dilution à partir de laquelle seront faites d'autres dilutions.

Il nous semble intéressant d'utiliser des bactéries lactiques douées de pouvoir inhibiteur vis-à-vis de germes indésirables pour assurer une meilleure conservation et préservation des viandes bovines.
Nos modestes résultats indiquent l'importance de cette flore lactique d'origine carnée pour lutter contre les germes responsables d'intoxication, comme les shigelles, les salmonelles, ...

4 – CONCLUSION

4- CONCLUSION

Traditionnellement on associe bactéries lactiques au lait et produits laitiers. Actuellement il faut élargir cette vision, notamment envers la viande fraîche et d'autres produits alimentaires d'origine animale (œufs, poissons, ...).

Notre étude confirme la présence de bactéries lactiques dans la viande bovine fraîche et s'ajoute aux quelques travaux similaires rapportés dans la littérature.

(www.blogagroalimentaire.com/dotclear/?2006/05/22/111-des-bacteries-lactiques-pour-eliminer-les-pathogenes) et **(http://www.texastech.edu/stories/0604-brashears.php).**

Ces bactéries lactiques sont des GRAM+, avec leur forme de bacille ou en coque et dont la majorité sont homofermentaires, mésophiles, et ne tolèrent que peu le milieu salé à 6,5%.

La caractérisation préliminaire des bactéries lactiques nous a permis de les classer en coque et en bacilles puisque nous avons retrouvé les deux espèces. Les données de la littérature indiquent la présence de *Lb. sakei* ainsi que de *Carnobacterium*. A cette étape de notre étude nous ne pouvons conclure si les bâtonnets rencontrés dans la viande fraîche sont de l'un ou de l'autre genre. Il serait important de procéder à leur identification et faire de même pour les coques qui sont décrit habituellement comme des leuconostocs. Ce sont les souches hétéro fermentaires.

Leur identification aurait été plus approfondie afin de retrouver les différentes espèces rencontrées dans la viande bovine mais notre but était de les mettre en évidence pour tester leur effet inhibiteur sur les germes pathogènes. Pour la majorité, cet effet inhibiteur existe dans le cas des salmonelles et shigelles surtout ainsi que pour ainsi que les *E.coli* .Toutes les souches était inhibitrices des salmonelles mais seulement 8 souches lactiques sur 22 étaient les plus performantes car ont inhibé toutes les souches.

On peut conclure que les bactéries lactiques sont efficaces pour l'élimination des germes indésirables, donc pour la conservation ainsi que l'amélioration de la qualité des viandes.

Le rôle inhibiteur de ces bactéries lactiques est important pour et dans la préservation de cet aliment de grande valeur nutritionnelle. En effet, des scientifiques de l'Université du Texas ont mis au point un mélange de bactéries lactiques mésophiles pour créer une couche supplémentaire sur la viande et qui élimineraient 99,99% des pathogènes tels les Salmonelles et *E.coli O157 :H7* des viandes de bœuf et de volaille.

Les ferments n'auraient aucune influence sur la flaveur du produit.

ANNEXES

- ANNEXE -

A1-Petit matériel :

* Sachets stomachers
*Scalpel ou couteau
* Pince
* Tubes à essai
* Cloches de Durham
* Portoirs
* Pipettes graduées de 1ml, 5ml et 10ml
* Pipettes Pasteur
* Boites de Pétri
* Anse de platine
* Bec bunsen
* Stomacher
* Hotte
* Microscope photonique
* Lames et lamelles
* Etuve à 45°C
* Etuve à 30°C
* Etuve à 37°C
* Bain marie à 45°C
* Bain marie à 80°C
* Bain marie à 60°C
* Réfrigérateur avec congélateur

A 2- Milieux spécifiques et réactifs utilisés :

Les milieux spécifiques et réactifs sont commercialisés par l'Institut Pasteur d'Alger (I.P.A) ou préparés au laboratoire. Certains sont préparés par l'Institut Pasteur d'Alger et prêt à l'emploi.

- Gélose PCA ou gélose standard pour dénombrement
- Gélose Baird Parker
- Gélose Désoxycholate Citrate Lactose Saccharose.(DCLS)
- Gélose VRBL
- Gélose Hektoen
- Bouillon Rappappoort Vassilliadis
- Bouillon Sélénite
- Gélose salmonella- shigella (S S)
- Gélose Nutritive
- Gélose M17
- Gélose MRS (Man, Rogosa, Sharpe)
- Gélose de Slanetz
- Gélose Tryptcase -Soja
- Gélose VF (viande –foie)+ additif alun defer et sulfite de sodium

A2-1 Milieux spécifiques pour la culture et l'isolement des bactéries non lactiques

Les quantités sont données pour 1 litre

* **Diluants** :

-Eau peptonnée tamponnée :	- Peptone animale et végétale	10g
	- Chlorure de sodium	5g
-Tryptone sel :	- Bio trypcase	1g
	-Chlorure de sodium	8,5g

*Gélose standard pour dénombrement :

- **Gélose Nutritive**

Extrait de viande	1,0
Extrait de levure	2,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	15,0
pH = 7,4	

Préparation : 28 g par litre, stérilisation à l'autoclave. La gélose peut être additionnée de sang.

- **Gélose PCA ou gélose standard pour dénombrement**

Tryptone	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	1,0 g
Agar	15,0 g
pH = 7,0	

Préparation : 23,5 g par litre. Stérilisation à l'autoclave

Lecture : Dénombrement de toutes les colonies.

*Gélose Sabouraud

Peptone	10,0 g
Glucose massé	20,0 g
Agar	15,0 g
pH = 6,0	

Préparation : 45 g par litre.Autoclavage classique.Conditionnement en boîte ou en tubes.

Lecture : Colonies typiques des moisissures

*Gélose Désoxycholate -Citrate-Lactose-Saccharose (DCLS) :

Peptone (mélange spécial)	10,0 g
Lactose	5,0 g
Saccharose	5,0 g
Citrate de sodium	10,5 g
Désoxycholate de sodium	2,5 g
Rouge neutre	0,03 g
Thiosulfate de sodium	5,0 g
Agar	12,0 g
pH = 7,3	

Préparation : 50 g par litre. NE PAS AUTOCLAVER.

Lecture : Les colonies sont des colonies de bacilles Gram -.

Colonies rouges : lactose + Colonies incolores ou jaunes : lactose –

* Gélose Violet Rouge Bilié Lactose (VRBL) :

Peptone	7,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Lactose	10,0 g
Désoxycholate de sodium	1,5 g
Cristal violet	2,0 mg
Rouge neutre	30,0 mg
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0 g
pH = 6,8	

Préparation : 38,5 g par litre. Ne pas autoclaver.

Lecture : Colonies incolores : lactose - colonies rouges : lactose +

*** Gélose Salmonella-Shigella (S S):**

Peptone	5,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Lactose	10,0 g
Citrate de sodium	10,0 g
Citrate de fer III	1,0 g
Sels biliaires	8,5 g
Vert brillant	3,3 mg
Rouge neutre	25 mg
Thiosulfate de sodium	8,5 g
Agar	12,0 g
pH = 7,3	

Préparation : 63 g de poudre dissous par ébullition. NE PAS AUTOCLAVER

Lecture : lac - : colonies incolores lac + : colonies rouges centre noir : H2S + pas de centre noir : H2S-

*** Gélose Hektoen :**

Protéose-peptone	12,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Lactose	12,0 g
Saccharose	12,0 g
Salicine	2,0 g
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5 g
Sels biliaires	9,0 g
Fuchsine acide	0,1 g
Bleu de bromothymol	0,065 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Thiosulfate de sodium	5,0 g
Agar	13,0 g
pH = 7,5	

Préparation : 75 g par litre. Ne pas autoclaver.

Lecture : Les colonies sont des bacilles Gram négatif. Les colonies à centre noir sont H2S +. Les colonies bleues ou vertes n'utilisent aucun des glucides du milieu. La couleur bleue peut être due à l'utilisation du citrate.

*** Gélose Baird Parker :**

Peptone	10,0 g
Extrait de viande de boeuf	4,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Pyruvate de sodium	10,0 g
Glycocolle	12,0 g
Emulsion de jaune d'oeuf	50,0 cm3
Tellurite de potassium	0,1 g
Chlorure de lithium	5,0 g
Agar	20,0 g

pH = 7,2

Préparation : 63 g par litre. Le milieu de base est autoclavé. Tellurite et jaune d'oeuf sont ajoutés ensuite à raison de 1 cm3 pour 20 cm3 de milieu de base. De la sulfaméthazine peut être ajoutée pour inhiber Proteus.

Lecture : Trois caractères sont lus : - la présence d'une lipoprotéinase par un halo transparent autour des colonies - la présence d'une lécithinase par un halo trouble autour des colonies - la réduction du tellurite en tellure noir par la couleur de la colonie *S. aureus* est lipoprotéinase + (en général), lécithinase + et réduit le tellurite en tellure. (colonies noires de 1 à 2 mm de diamètre).

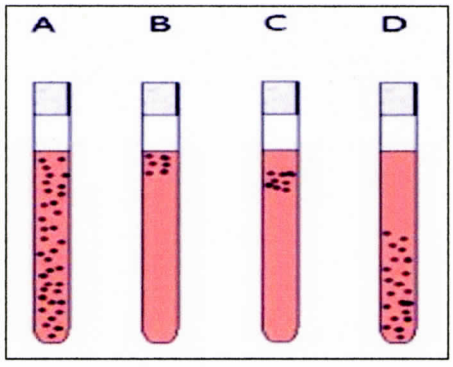
*** Gélose Viande Foie (V F) :**

Base viande foie	30,0 g
Glucose	2,0 g
Agar	6,0 g

pH = 7,4

Préparation : 38 g par litre. Autoclave classique. Conditionnement en tube longs et fins.

Lecture : Colonies noires sur toute la hauteur : aéro-anaérobie (A), aérobie stricte (B), micro-aérophile (C), anaérobies strictes (D). Résultats après incubation 24H a 37°C



*** Gélose de Slanetz :**

Peptone	20,0 g
Glucose	2,0 g
Azide de sodium	0,4 g
Chlorure de triphényltétrazolium (TTC)	0,1 g
Hydrogénophosphate de sodium	4,0 g
Agar	10,0 g
pH = 7,2	

Préparation : 36,5 g par litre. NE PAS AUTOCLAVER

Lecture : Les Enterococcus donnent des colonies moyennes roses ou rouges. Des Bacillus donnent des colonies de même aspect mais généralement plus grandes.

A2-2- Milieux pour enrichissement des salmonelles

*** Sélénite (bouillon)**

Peptone	5,0 g
Lactose	4,0 g
Disélénite de sodium	10,0 g
Hydrogénophosphate de sodium	4,0 g
pH = 7,0	

Préparation : ATTENTION : le sélénite est un poison violent, tératogène voire même cancérigène. Prendre 19 g par litre de milieu de base et ajouter 4 g de disélénite de sodium par litre de milieu. Ne pas autoclaver.

* **Rappaport Vassiliadis (bouillon) :**

Peptone de soja	4,5 g
Vert malachite	36 mg
Chlorure de sodium	7,2 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,5 g
Chlorure de magnésium hexahydraté	37,3 g
pH = 5,2	

Préparation : 51 g par litre.Autoclavage classique.

A2-3 Milieux spécifiques pour la culture et l'isolement des bactéries lactiques

*__Bouillon et gélose MRS (de Man, Rogosa et Sharpe)__

Peptone	10,0 g
Extrait de viande	8,0 g
Extrait de levure	4,0 g
Glucose	20,0 g
Acétate de sodium trihydraté	5,0 g
Citrate d'ammonium	2,0 g
Tween 80	1,0 ml
hydrogénophosphate de potassium	2,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05 g
(Agar	10,0 g)
pH = 6,2	

Préparation : 62 g par litre. Stérilisation à l'autoclave.

* **Bouillon et gélose M 17**

Tryptone	5,0 g
Peptone de soja	5,0 g
Infusion de viande	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Glycérohydrogénophosphate de sodium	19,0 g
Lactose	5,0 g
Acide ascorbique	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Agar	11,0 g
pH = 6,9	

Préparation : 48,25 g de poudre dans 950 ml d'eau distillée. Autoclavage classique. Ajouter extemporanément 50 ml de solution de lactose à 100 g par litre

* **Milieu Moeller (ADH)**

Extrait de levure	3,0 g
L-arginine (monochlorhydrate)	5,0 g
Glucose	1,0 g
Bromocrésol pourpre	0,16 mg
Ethanol	1 ml
Chlorure de sodium	5,0 g
pH = 6,8	

Préparation : Le milieu est acheté prêt à l'emploi ou fabriqué à partir des différents constituants. Il est indispensable de contrôler le pH. Pour utiliser la forme DL de l'acide aminé il est indispensable de doubler la dose. Autoclavage classique.

Lecture : L'alcalinisation avec culture montre la présence d'une ADH. (Violet). Un milieu acide montre la fermentation du glucose et l'absence de l'ADH. Une absence de culture est possible pour une bactérie aérobie stricte ou très exigeante.

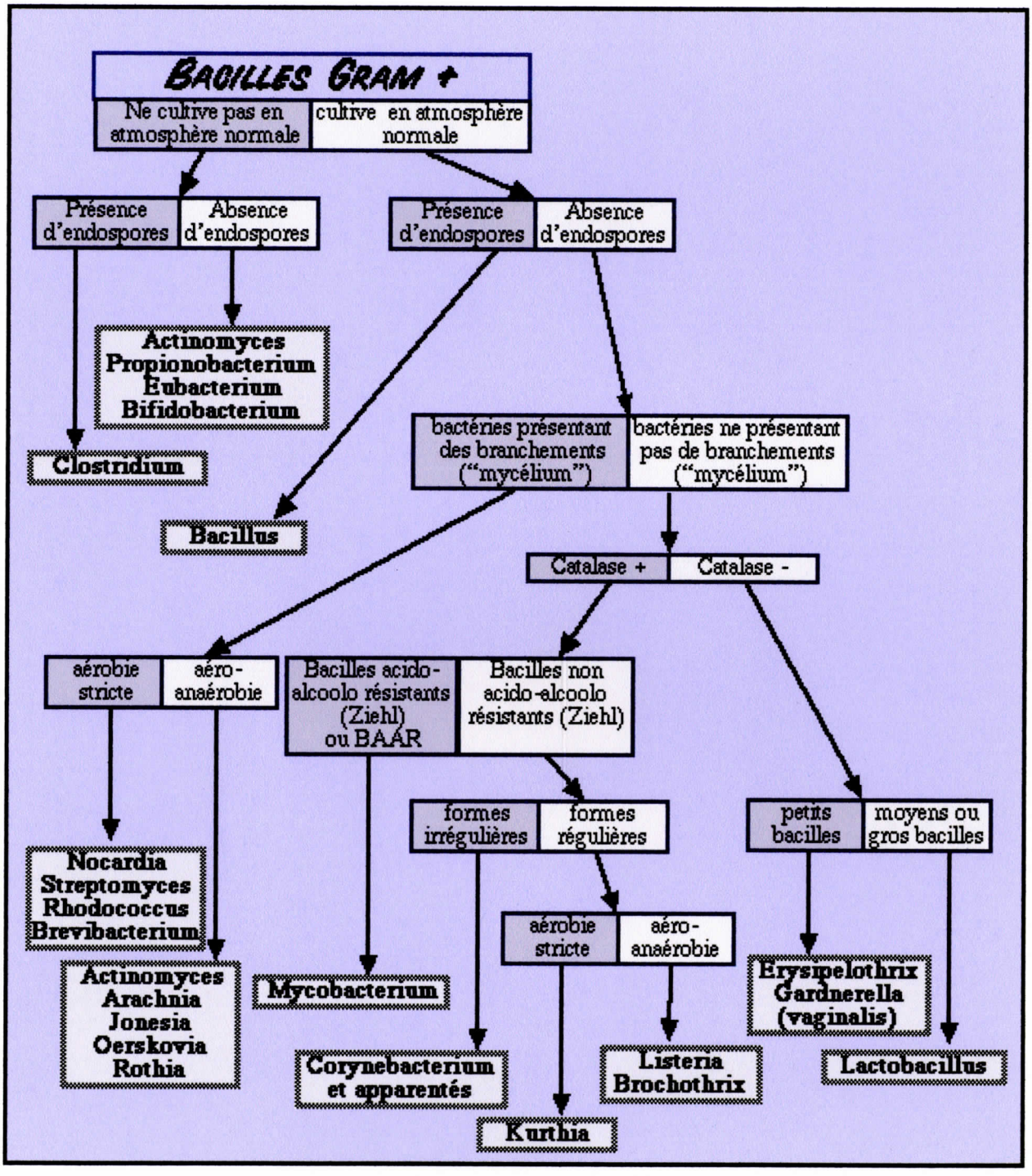
A3 : Normes algériennes

TABLEAU II

CRITERES MICROBIOLOGIQUES DES VIANDES ROUGES ET DE LEUR PRODUITS DERIVES

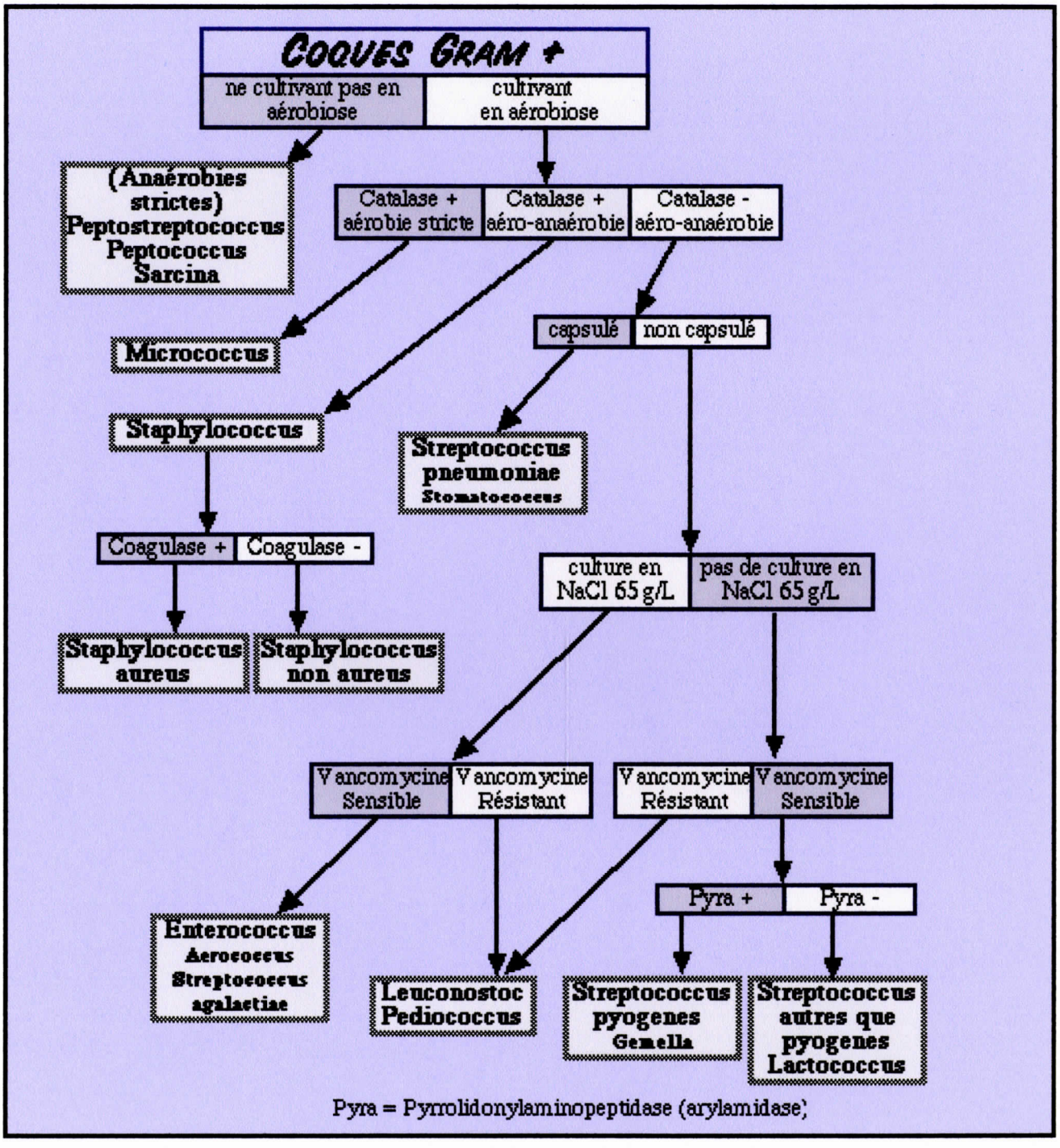
PRODUITS	n	c	m
1. Carcasses ou coupes de demi gros réfrigérés ou congelés :			
- germes aérobies à 30°C	5	2	5.10^2
- ASR	5	0	2
- *Salmonella*	5	0	absence
- antibiotique	1	0	absence
- sulfamides	1	0	absence
2.Pièces conditionnées sous vide ou non,réfrigerées ou congelées :			
- germes aérobies à 30°C	5	2	5.10^2
- coliformes fécaux	5	2	10^2
- ASR	5	0	absence
- *Salmonella*	5	0	absence
- antibiotiques	1	0	absence
- sulfamides	1	0	absence
3.Portions unitaires conditionnées, réfrigérées ou congelées et portions unitaires du commerce de détail réfrigérées ou congelées (2)			
- germes aérobies à 30 c	5	2	10^2
- coliformes fécaux	5	2	3.10^2
- *Staphylococcus aureus*	5	2	10^2
- clostidium sulfito réducteurs à 46°C	5	0	10
- *Salmonella*	1	0	absence
- antibiotiques	1	0	absence
- sulfamides			
4. Viandes hachées :			
- germes aérobies à30°C	5	2	5.10^2
- coliformes totaux	5	2	10^2
- coliformes fécaux	5	2	50
- *Staphyloccus aureus*	5	2	10^2
- clostridium sulfito réducteurs à46 c	5	2	30
- *Salmonella*	5	0	abs/10g

A4 : Présentation globale des BACILLES Gram positif



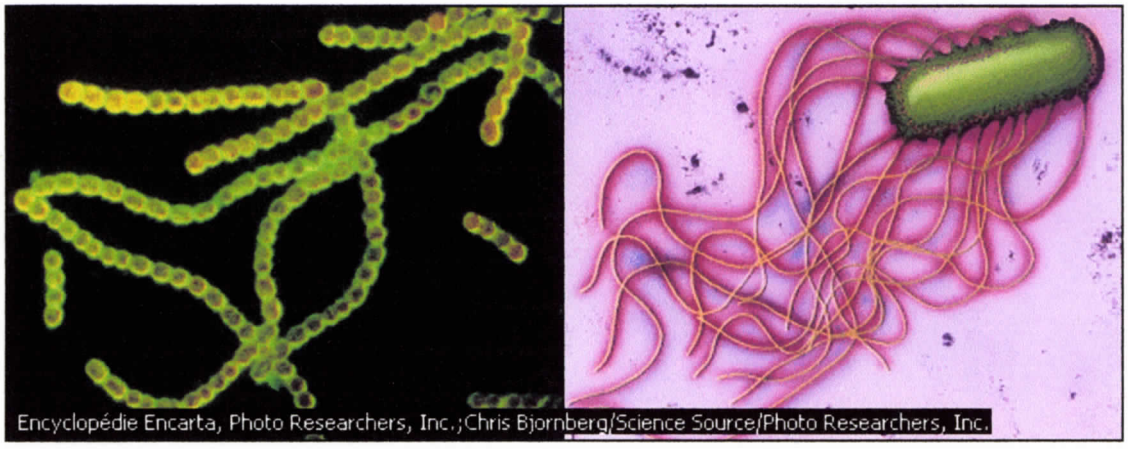
Jean Noël Joffin
http://www.techmicrobio.net/systématique/gram

A5 : Présentation globale des COQUES Gram positif



Jean Noël Joffin
http://www.techmicrobio.net/systématique/gram

A6 : cyanobactéries et eubactéries



Eubactéries (« bactéries vraies »)

Les cyanobactéries (à gauche sur ce montage), anciennement appelées algues bleues, et toutes les autres bactéries (à l'exception des archéobactéries) constituent le groupe des eu bactéries. Celui-ci, le plus important numériquement, forme avec les archéobactéries (dont les caractéristiques biochimiques, primitives, sont différentes) le règne des procaryotes. **Microsoft®Encarta ® 2007.**

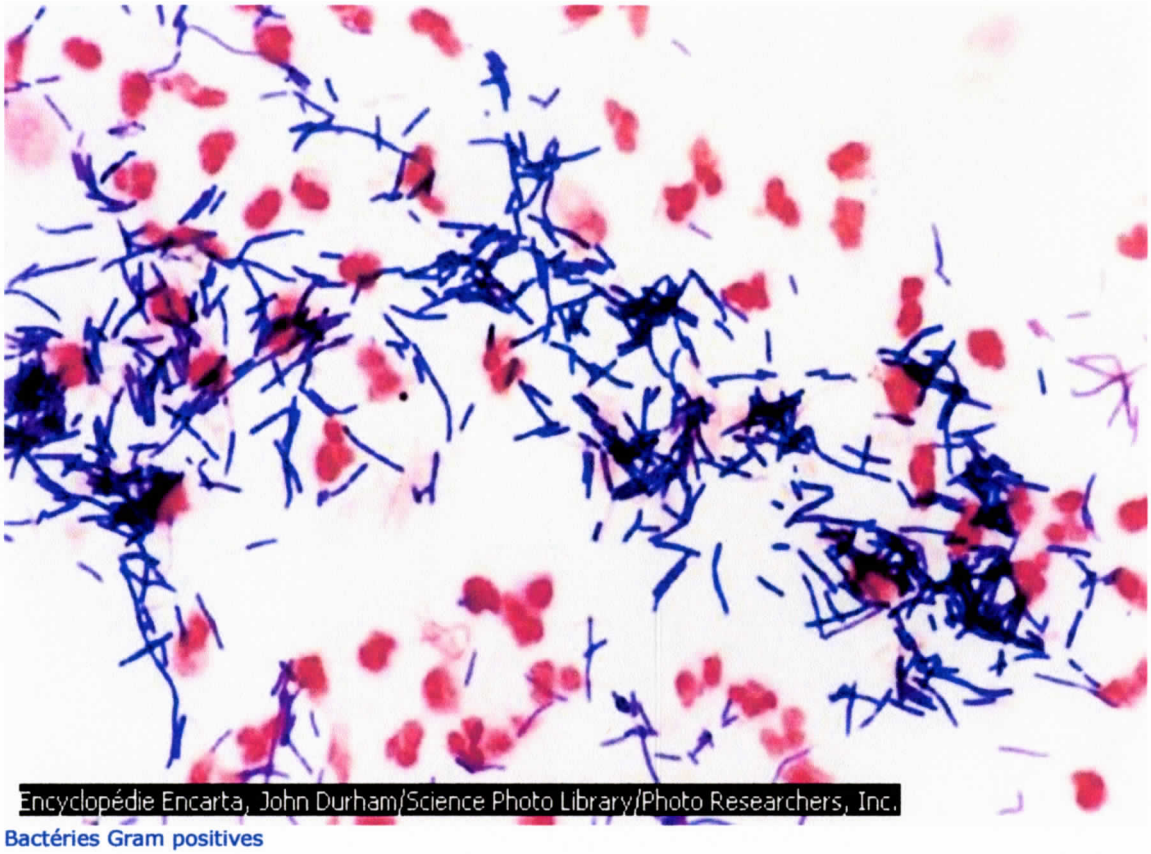
A7: Coloration de Gram

Gram, coloration de, méthode de coloration permettant l'identification des bactéries, découverte par le médecin danois Hans Christian Joachim Gram. Dans la méthode de Gram, les bactéries sont d'abord colorées par du violet de gentiane (teinture contenant un dérivé méthylé de la pararosaniline), puis elles sont traitées par la liqueur de Gram, contenant 1 partie d'iode, 2 parties d'iodure de potassium et 300 parties d'eau. Après lavage à l'éthanol, les bactéries retiennent la coloration bleue foncée du violet de gentiane ou sont complètement décolorées. Parfois, on applique une contre teinture comme la fuchsine ou l'éosine pour donner aux bactéries décolorées une couleur rouge qui les rend plus visibles.

Les bactéries qui retiennent la coloration bleue sont dites *Gram positives,* celles qui ne la retiennent pas sont dites *Gram négatives.* Les organismes qui parfois retiennent la coloration et parfois ne la retiennent pas sont dits *Gram variables.* **Microsoft ® Encarta ® 2007**

Après action de la coloration de Gram et rinçage, les bactéries *Lactobacillus acidophilus* sont de couleur bleue foncée : ce sont des bactérie Gram positives, à paroi épaisse.

Les bactéries à paroi fine, en revanche, ne retiennent pas le colorant, elles sont dites Gram négatives.



Bactéries Gram positives

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

BANWART G.J., 1980. Basic food microbiology, 769, pp51-423.

BIO MERIEUX, 1997. Milieux de culture, 133p, pp 53.

BOURGEOIS C.M. et .LEVEAU J.Y, 1980. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires, Vol 3, Technique et Documentation Lavoisier, Paris cedex 08 pp93-179.

BOURGEOIS C.M. et .LEVEAU J.Y, 1991. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires, Vol 3 - Le contrôle microbiologique, 2ème édition Lavoisier , 454p, pp153-366.

BOURGEOIS C.M. et LARPENT J.P., 1996. Microbiologie alimentaire, T2- Aliments fermentés et fermentations alimentaires, 2ème édition, Technique et Documentation Lavoisier, Paris cedex 08. pp3-30.

BOURGEOIS C.M. et LARPENT J.P., 1989. Microbiologie alimentaire, T2 - les fermentations alimentaires, pp3-16.

BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F et .ZUCCA J, 1990. Microbiologie alimentaire, T1- Aspect micro biologique de la sécurité et de la qualité alimentaire, T.E.C DOC, 416p, pp 9-15.

BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F et ZUCCA J, 1996. Microbiologie alimentaire.T1 Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire, 2ème édition 642p.

CAT SARAS M., 1973. Les intoxications alimentaires par la viande et les produits carnés, Ind aliment agri90

CHRISTIANE et JOFFIN J.N., 1992. Microbiologie alimentaire, 3ème édition, centre régional de documentation pédagogique 208p (pp98-156).

DANIAL, C, 1972. La viande et le froid, Production, transformation, commercialisation. Paris pp10

DELARAS C, 1998. Microbiologie, 90 heures de travaux pratiques 276p,

DE ROISSART H. et LUQUET F. M, 1994. Volume 1 : Bactéries lactiques, 588p, pp53.

FAO, REFAI, M.K. 1981. Manuel sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires, Analyse microbiologique, pp A11- C10.

FOURNAUD J *et col* 1978. Contamination microbienne des carcasses à l'abattoir, Ind Aliment Agri 95, pp 110-131

GUIRAUD J.P, 1998. Microbiologie alimentaire, DUNOD PARIS, 615p, pp144-147.

JOUVE J-L., 1996. Qualité micro biologique des aliments Maîtrise et critères, viandes et produits carnés, CNERNA6 CNRS, 561p, pp247-264.

LARPENT J.P., 1997. Microbiologie alimentaire, Techniques de laboratoire, 1073p, pp 860-871.

LARPENT. J.P. et GOURGAUD 1985. Eléments de Microbiologie, HERMANN 464p, pp44 -311.

LEBRES E. ET MOUFFOK F, 1999. Guide pratique d'analyse microbiologiques des denrées alimentaires, Institut Pasteur d 'Algérie.

MARCHAL N, BOURDON J.L. et RICHARD CL, 1987. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 505p, pp350.

NORME ALGERIENNE NA 645, 1992. Viandes et Produits à base de viande – Echantillonnage et préparation des échantillons pour essai. Première édition.pp05 Edition et Diffusion INAPI

NORME ALGERIENNE NA 1615, 1990. Viandes et Produits à base de viande – Recherche et dénombrement des bactéries présumées coliformes et présumées Escherichia.colis pour le milieu solide (méthode usuelle). Première édition pp07. Edition et Diffusion INAPI

NORME ALGERIENNE NA 1903,NF V04 503, 1994. Viandes et Produits à base de viande. Dénombrement des bactéries lactiques. première édition Edition et Diffusion INAPI

NORME ALGERIENNE NA 1207, ISO 4833,1991. Microbiologie – Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes – Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C. Edition et Diffusion INAPI première édition.

Pilet M.F. et coll cités par SUTRA L. et col, 1998. Manuel de bactériologie alimentaire, F. M, Col Polytechnica , 308p, pp 235-260.

ORVIC,Office régional des viandes du centre **1991.**Brtouta -Blida

VALIN C. cité par MICOL D., 1986. Production de viande bovine, Centre de recherche zootechnique et vétérinaire, édition INRA 499p, pp 85-97.

Canadian Journal of Microbiology, Volume 52, Number 11, 1 November 2006, pp. 1017-1026(10).

www.agrobiosciences.org/8Nov2005/Figaro/Nature biotech

www.jouy-inra.fr

www.univ.brest.fr/esmisab

www..alp.admin.ch/themen/00602/index.html

www.office-élevage.fr/vpc/255/171/TALON

www.enitac.fr

htpp://epe.cirad.fr/fr/doc/marché mondial viande pdf

www.oie-int/fr/normes

htpp://europa.eu.int/smartapi

www.nature.com/nbt/journal/vaop/ncurrent/index html

www.blogagroalimentaire.com/dotclear/?2006/05/22/111-des-bacteries-lactiques-pour-eliminer-les-pathogenes

www.iphc.in2p3.fr/Biopreservation.html

www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/thermotolérans.html

www.bacterio.cict.fr

www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/carnobacterium.html

www.univ-ubs.fr/ecologie/bacteries.html

www.fr.wikipedia.org.wiki/viande

www.fr.wikipedia.org/wiki/Microbiologie

www.fr.wikipedia.org/wiki/lactobacille

www.fr.wikipedia.org/wiki/Microbiologie

www.pasteur.ma/symposium_workshop/GHADA.pdf

www.socpharmbordeaux.asso.fr/pdf/pd

www.oenologie.u-bordeaux2.fr/publications/theses/biotech_microbiologie.php

www.edpsciences.orgo.html

www.techmicrobio.net/systématique/Gram positif/

www.techmicrobio.net/systématique/Gram positif/lactobacillus/acto html

www.inra.fr/presse

www.thèses.ulaval.ca/2003/20742 ch01html

www. cat.inist.fr

www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/pantheris.html

www.adria.trn.fr/home/main.asp

www.oxoid.com/fr/index.asp

www.blogagroalimentaire.com/dotclear

www.eufic.org/article/fr/page/ARCHIVE/expid/review-production-alimentaire

www.cbb-developpement.com/00/.\9\938.htm,

www.univ-brest.fr/esmisab/sitesc/Bacterio/btechno/blactic.html -

www.caducee.net/Fiches-techniques/EUFIC/bacteries-lactiques.asp

www.liste-hygiene.org/arcbiofilm.htm

www.univ-lille1.fr/pfeda/iaal/docs/dess2001/gras/pro_fin_rap.pdf -

Résumé

Pour la conservation des viandes les recherches se dirigent actuellement vers des méthodes biologiques, c'est-à-dire utilisant certaines bactéries lactiques sélectionnées, généralement isolées de leur biotope naturel.

Dans cette optique, nous avons effectué la recherche, le dcnombrement et l'isolement de bactéries lactiques dans des viandes bovines. Nos résultats confirment leur présence en grand nombre dans les premières heures qui suivent l'abattage et leur tendance à la disparition après 48 heures de stockage. Les bactéries lactiques isolées sont des coques et des lactobacilles. Nous les avons testées sur des germes indésirables afin d'apprécier leur effet inhibiteur : les bactéries testées sont des souches de *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus* D. Les résultats montrent la forte inhibition de souches de bactéries indésirables.

Ces bactéries lactiques inhibitrices pourraient être utilisées pour la conservation des viandes.

Mots clés : Viande bovine – bactéries lactiques – inhibition - germes indésirables – conservation.

الخلاصة

حاليا ، جميع البحوث لحفظ اللحوم من التحرك تتجه نحو طرق بيولوجية، اي باستخدام بعض البكتيريا معزولة من وسطها البيئي

في عملنا هذا ، أجري البحث ، والحصر والعزل لبعض بكتريا اللبن ا اللبن في لحوم الأبقار. نتائجنا تؤكد وجودها في عدد كبير في الساعات_

الأولى التي تتبع الذبح ثم تنخفض حتى اختفائها بعد 48 ساعة من التخزين. ثم قممنا باختبارها مع بعض ا نوا ع من السالمونيلا ، نوعي ،

، وبكتيريا المكورات السبحيه د ، الجراثيم غير المرغوب لكي نقدر على منع تأثير *E.coli*

بكتريا اللبن المعزولة هي هياكل وتمنع بقوة البكتيريا غير المرغوبة.

هذه لبكتيريا اللبن يمكن بعد تحديد هويتهم ، ان تستخدم لحفظ اللحوم

لكلمات الأساسية : لحوم الأبقار – بكتيريا اللبن – منع – جراثيم غير مرغوبة – حفظ –

Summary

Research for meat conservation moves towards biological methods, *i.e.* using lactic acid bacteria insulated starters made up from selected strains, generally isolated from their natural biotope.

In our work, we carried out a research, an enumeration and an isolation of lactic acid bacteria from beef and veal meat. Our results show their presence in great number within the first hours following demolition, and their tendency to disappear after 48 hours of storage. The isolated lactic acid bacteria are cocci and lactobacilli. We tested them on undesirable germs, *i.e.* strains of *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* D, in order to appreciate their inhibiting effect. Our results indicate a strong inhibition of the undesirable bacteria.

These lactic bacteria could be used for meat conservation.

Key words: Meat of Beef - lactic bacteria - inhibition - undesirable germs - conservation.