



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah  
Faculté des Sciences et Techniques de Fès  
Département : Sciences de la vie



Licence Sciences et Techniques  
« Bioprocédés, Hygiène et Sécurité alimentaires »

RAPPORT DE STAGE DE FIN D'ETUDE  
EFFECTUE AU SEIN DE LABORATOIRE REGIONALE D'EPIDEMIOLOGIE ET  
D'HYGIENE DU MILIEU DE SIDI KACEM

# Contrôle de qualité microbiologique

---

## de la viande hachée bovine

---

**Présenté par** : Melle. Hajar EL BASET

**Sous l'encadrement de** :

Pr. Nouredine Chadli : Professeur de microbiologie à FET de Fès

Soutenu le : 06/06/2017

Devant le jury composé de :

- Pr. Nouredine Chadli
- Pr. Omar Farricha

**Année universitaire : 2016/2017**

## Résumé

Des échantillons de viande hachée ont été prélevés sur les marchés, dans les boucheries et autres endroits de vente à grande échelle, pour contrôler la qualité microbiologique des produits proposés aux consommateurs. Si l'on se réfère aux normes européennes, 99 p. 100 des échantillons prélevés dans la filière de vente traditionnelle devraient être rejetés pour cause de contamination élevée par la flore aérobie et par les germes anaérobies sulfite-réducteurs.

L'amélioration de cette situation passe obligatoirement par un perfectionnement des conditions d'hygiène d'abattage et de transport des viandes jusqu'au détaillant.

*Mots-clé : Qualité hygiénique, microbiologie, viande hachée*

# Sommaire

Dédicace.....	04
Remerciements.....	05
Préface .....	06
Liste des abréviations.....	07
Listes des tableaux et figures.....	08
Présentation du lieu de stage.....	09
Introduction .....	10
Partie I : Etude bibliographique.....	11
Préambule .....	12
<b>I- Microbiologie des denrées alimentaires.....</b>	<b>13</b>
1- Réception des échantillons.....	13
1-1- Eaux .....	13
- Eau usée.....	13
- Eaux de puits et des sources.....	13
- Eau de boisson .....	13
- Eaux traitées et non traitées.....	13
1-2- Aliments .....	13
2- Traitement des échantillons et préparation des dilutions.....	13
2-1- Aliments liquides et solides hydrosolubles .....	13
2-2- Aliments solides non hydrosolubles .....	13
3- Dénombrement de bactéries de tests d'hygiène générale .....	13
3-1- Les microorganismes témoins de contamination fécale.....	14
- La flore mésophiles aérobies totale .....	14
- Les coliformes totaux .....	14
- Les coliformes fécaux.....	14
3-2- Les microorganismes pathogènes et toxigènes .....	14
- <u>Staphylococcus aureus</u> .....	14
- Anaérobies sulfite-réducteurs.....	14
- <u>Salmonella spp</u> .....	15
- Streptocoques fécaux.....	15
<b>II- Nature et sources de contamination des viandes de boucherie.....</b>	<b>15</b>
1- Nature des germes des viandes de boucherie .....	15
1-1- Les germes saprophytes et germes de tests d'hygiène.....	15
1-2- Les germes pathogènes .....	15
2- Sources de contamination des viandes de boucherie .....	16
2-1- Contamination ante-mortem .....	16
2-2- Contamination lors des opérations de préparation à l'abattoir .....	16
2-3- Contamination au cours du stockage et de la commercialisation .....	16
2-4- Contamination au cours du transport .....	16
2-5- Contamination lors de la décongélation.....	16
2-6- Contamination lors de la découpe .....	16
<b>III- Evolution de la flore bactérienne des viandes hachées.....</b>	<b>16</b>
1- Condition d'évolution des germes .....	16
1-1-Nutriments .....	16
1-2-Contamination initiale .....	16
1-3-Tension d'oxygène.....	17
1-4-pH.....	17

1-5-L'activité de l'eau.....	17
1-6-Température .....	17
<b>Partie II : Etude expérimentale.....</b>	<b>18</b>
<b>Préambule .....</b>	<b>19</b>
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>20</b>
1- Echantillonnage .....	20
2- Analyses microbiologiques .....	20
2-1- Préparation des échantillons.....	20
2-2- Recherche des microorganismes .....	20
- Dénombrement de FMAT.....	20
- Dénombrement des coliformes fécaux.....	21
- Dénombrement de <u>Staphylococcus aureus</u> .....	21
- Dénombrement des ASR.....	21
- Recherche des Salmonelles.....	21
Coloration de Gram.....	22
Test de fermentation du glucose et lactose.....	22
Recherche de bêta-galactosidase.....	22
Recherche de lysine décarboxylase.....	22
Test IMVIC.....	22
<b>Partie III : Résultats et discussion .....</b>	<b>24</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>25</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>28</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>29</b>
<b>Annexes :</b>	
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>30</b>
<b>Figures.....</b>	<b>32</b>

# *Dédicace*

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents pour avoir veillé sur mon éducation, pour leur aide permanente, leur sacrifice infini et leur affection. Ce travail leur est dédié en modeste témoignage de ma gratitude infinie. Je leur souhaite une bonne santé et une longue vie.

Mes frères : Pour leur sacrifice, leur dévouement et leur soutien pour affermir mes études.

Mes amis et mes copains sans oublier mes collègues de FST de Fès : Notre travail en coopération allait bon train et a donné des résultats louables, espérant qu'il se couronnera de succès dans les années à venir.

Tous les gens qui m'ont soutenu et conseillé pendant ma période de stage.

Et sans oublier bien sûr toutes les personnes qui m'ont aidée à forger ma personnalité et d'arriver à ce que je sois maintenant.

## *Remerciements*

Au terme de ce stage, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration et la réussite de ce travail.

Je tiens d'abord à exprimer ma profonde gratitude au Monsieur le Délégué Dr. Ahmed Bitane et Monsieur le chef de service de laboratoire M. Belhaj de l'épidémiologie et hygiène des milieux (LEHM) de SIDI KACEM, qui m'ont accepté dans ledit établissement.

Plus précisément, je tiens mes remerciements les plus chaleureux à :

Mr. Lotfi Aarab, Professeur de l'hygiène alimentaire à FST de Fès et Chef de filière Bioprocédés : Hygiène et Sécurité Alimentaire de m'avoir donné l'opportunité de faire ce stage. Je vous remercie pour toute la confiance que vous m'aviez accordée.

Mr. Nouredine Chadli, Professeur de microbiologie à FST de Fès de m'avoir encadré tout au long de mon stage et m'avoir apporté ses précieux conseils ainsi que sa disponibilité. Je vous remercie pour toute la confiance que vous m'aviez accordée.

Veillez bien trouver dans ces quelques lignes l'expression de toute ma reconnaissance.

Mr. Aziz El Azzabi, Assistant médical au laboratoire d'épidémiologie de la délégation médicale de Sidi Kacem de m'avoir prodigué ses conseils fructueux, durant toute la durée de ce travail.

Mr. Badr Ridali, Assistant médical au laboratoire d'épidémiologie de la délégation médicale de Sidi Kacem de m'avoir encadré. Je le remercie aussi pour leurs conseils avisés au cours de cette période de formation au laboratoire.

Je souhaite présenter ainsi mes plus vifs remerciements à l'ensemble de personnel de ce laboratoire, de m'avoir encadré durant mon stage et simplifié les prestations du laboratoire que j'ai traité et pour avoir facilité mon intégration dans cette équipe jeune, dynamique et sympathique.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres de jury auxquels je confie mon projet de fin d'études.

Enfin, je tiens à remercier énormément mes professeurs de FST de Fès pour leurs efforts d'enseignements et de collaboration et pour leur soutien inconditionnel qu'ils nous ont témoigné pendant cette période d'études.

*Merci infiniment.*

# *Préface*

L'évolution des maladies d'origine alimentaire infectieuse dans le monde et en particulier au Maroc, semble être liée à la présence de microorganismes dans les aliments. Ces maladies constituent pourtant le problème de santé publique le plus répandu dans le monde et génèrent un fardeau social et économique représentant ainsi une source de souffrances humaines.

Le contrôle des infections alimentaires reste un objectif prioritaire en termes de sécurité alimentaire. Pour cela, des stratégies sont élaborées pour assurer la sécurité sanitaire des aliments, et ce, par la maîtrise de l'hygiène au cours de la chaîne de production.

Cependant, malgré la mise en application de ces stratégies et de nouvelles mesures d'hygiène qui tendent à combattre leur origine, notre mode de vie multiplie les facteurs qui provoquent ou favorisent l'expansion de tels accidents.

La contamination microbiologique des aliments due à des matières premières contaminées, des températures de cuisson insuffisantes, une conservation inadaptée, un équipement contaminé et un manque d'hygiène du personnels manipulateurs de ces aliments peuvent être les causes des toxi-infections alimentaires collectives, faisant ainsi apparaître leur importance tant pour la santé publique que du point de vue social.

Au cours de l'année 2011, le centre antipoison du Maroc CAPM a enregistré 178 épisodes de toxi-infections collectives faisant état de 1234 cas. La taille moyenne par épisode était de 7 personnes. Le foyer le plus important comportait 140 cas. La majorité des TIAC a été observée en été (34.2%) suivi du printemps (25.2%) puis de l'automne (21.5%) et enfin de l'hiver (19.1%). La tranche d'âge la plus touchée était celle de l'adulte (44%) suivie des enfants (41.7%) et les adolescents (10.5%) (Zerrour, 2012). En 2013, le même centre a publié son rapport faisant état à une nette augmentation des cas d'intoxications au Maroc, soit un total de 11000 cas (H24info, 2014).

Selon une étude réalisée dans la région du Gharb Chrarda Bni Hssen (région occidentale du Maroc), ce sont les fruits et légumes ainsi que le lait et ses produits dérivés qui étaient les principales causes de toxi-infections collectives. En effet, cette région d'étude est située sur le bassin de Sebou et reconnu par la répercussion de sa pollution en amont sur l'agriculture en aval ce qui explique la prédominance d'une contamination d'origine hydrique chez les fruits et légumes (Belomaria et al., 2007).

## Liste des abréviations

AFNOR	: Association française de normalisation
ASR	: Anaérobies Sulfite Réducteurs
BHI	: Brain Heart Infusion
BP	: Baird Parker
C	: Conforme
DL	: Désoxycholate lactosé
EPT	: Eau peptonée tamponnée
FAO	: Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FMAT	: Flore mésophile aérobie totale
IMVIC	: Indole-Méthyle-Vogues Proskauer-Citrate
ISO	: Organisation internationale de normalisation
LREHM	: Laboratoire régional de l'épidémiologie et hygiène des milieux
M	: Seuil maximal de contamination tolérable
m	: Seuil minimal de contamination souhaité
MO	: Microorganisme
NC	: Non conforme
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ONPG	: Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactosidase
PCA	: Plate Count Agar
PDA	: N-diméthyl paraphénylène diamine
RM	: Rouge de méthyle
SIAAP	: Service d'Infrastructures d'Action Ambulatoires Provincial
SPS	: Sulfite Polymyxine Sulfadiazine
TIA	: Toxi-infection Alimentaire
TIAC	: Toxi-infection Alimentaire Collective
UFC	: Unité formant colonie
X	: Valeur dénombrée

# Liste des tableaux et figures

## **Liste des tableaux :**

<b>Tableau I</b> : Résultats du dénombrement de la FMAT, des CT, des ASR, des S. aureus et la recherche de Salmonella dans les prélèvements recueillis de viande hachée en UFC/g.....	25
<b>Tableau II</b> : Valeurs minimales, maximales et moyennes des microflores dénombrées au niveau de la viande hachée en UFC/g.....	26
<b>Tableau III</b> : Pourcentage de la non-conformité globale.....	26

## **Liste des figures :**

Figure 1 : Aspect des germes totaux sur PCA avant et après l'incubation.....	32
Figure 2 : Aspect des coliformes fécaux sur DL avant et après l'incubation.....	32
Figure 3 : Aspect de Staphylocoque doré sur BP avant et après l'incubation.....	32
Figure 4 : Aspect des Clostridium sur SPS avant et après l'incubation.....	32
Figure 5 : Pré-enrichissement de Salmonelle dans EPT.....	32
Figure 6 : Enrichissement de Salmonelle dans Rappaport-Vassiliadis avant et après l'incubation.....	33
Figure 7 : Isolement de Salmonelle dans Hektoen avant et après l'incubation.....	33
Figure 8 : Coloration de Gram.....	33
Figure 9 : Hajna-Kligler avant et après l'incubation.....	33
Figure 10 : Test ONPG négatif et positif.....	33
Figure 11 : Test LDC positif et négatif.....	33
Figure 12 : Test Oxydase.....	33
Figure 13 : Production d'indole Test négatif et positif.....	34
Figure 14 : Test au Rouge de méthyle positif et négatif .....	34
Figure 15 : Réaction de Voges- Proskauer.....	34
Figure 16 : Utilisation du citrate test positif et négatif.....	34
Figure 17 : Test d'Uréase.....	34
Figure 18 : Répartition des échantillons de viande hachée par classe de conformité.....	27
Figure 19 : Pourcentage de la non-conformité de viande hachée par catégorie des germes.....	27

## *Présentation de lieu de stage*

Etant en fin de cycle de licence Bioprocédés : Hygiène et Sécurité Alimentaire (BPHSA), j'ai été conduite à effectuer un stage de fin d'étude, pour concrétiser ma formation. J'ai passé ce stage dans un laboratoire des analyses microbiologiques des eaux et des denrées alimentaires.

Ce rapport est issu d'un stage de deux mois effectué au sein de laboratoire de l'épidémiologie et hygiène des milieux (LEHM) de la délégation régionale de ministère de la santé de SIDI KACEM.

Le laboratoire régional de l'épidémiologie et d'hygiène des milieux (LREHM) constitue une structure d'appui indispensable pour la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses dans la région. Il assure des programmes sanitaires du ministère de la santé dans le cadre d'hygiène et l'environnement.

Il a aussi pour mission de soutenir les programmes de prévention et de lutte contre les maladies transmissibles et non transmissibles.

Les actions du LREHM ont pour objectifs :

- L'amélioration de la qualité de surveillance épidémiologique et de la santé de l'environnement ;
- Le renforcement des actions d'hygiène et d'assainissement ;
- La détection des sources de contamination et des facteurs de risque ;
- L'augmentation du taux de confirmation des maladies transmissibles ;
- L'amélioration des prestations de contrôle sanitaire ;
- La formation de stagiaires et recyclage des agents de la santé publique ;
- Le développement de la recherche appliquée et opérationnelle.

### **LREHM de SIDI KACEM :**

Le Laboratoire Epidémiologique d'Hygiène de Milieu (LEHM) qui fonctionne sous la direction du SIAAP s'est investi particulièrement dans les études d'impact de la pollution d'eaux, la mesure des expositions aux agents environnementaux de nature microbiologique.

Le laboratoire intervient dans différents domaines d'activités, notamment en :

#### Hygiène du milieu :

Dans ce domaine, le laboratoire procède aux :

- Analyses microbiologiques des eaux ;
- Analyses microbiologiques des denrées alimentaires ;
- Analyses physico-chimiques des eaux.

#### Epidémiologie :

Dans ce domaine d'activité, le laboratoire participe par :

- La recherche de porteurs de germes dans les établissements manipulant les aliments : parasitologie et microbiologie ;
- Le diagnostic et lutte contre le Paludisme : Dépistage et lutte contre les vecteurs ;
- Le diagnostic et lutte contre la Leishmaniose : Dépistage et lutte contre les vecteurs.

Le SIAAP assure au niveau provincial. L'application dans les circonscriptions sanitaires des programmes nationaux de santé publique, en particulier en matière de prévention, d'épidémiologie, d'hygiène du milieu et des soins ambulatoires. La gestion des ressources nécessaires à la réalisation de ces programmes : infrastructure, personnel, matériel, médicaments, véhicules et budget. La coordination des activités sanitaires provinciales ou préfectorales. La réglementation de son organisation et de son fonctionnement n'a pas changé, alors que les besoins de la population ont augmentées et l'infrastructure sanitaire de base a augmenté également.

# Introduction

La viande et les produits carnés ont été incriminés à maintes reprises dans des foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à travers le monde. Aux États-Unis par exemple, le centre de contrôle des maladies (CDC) estime que 3,6 à 7,1 millions d'américains ont été victimes d'une maladie d'origine alimentaire. Parmi ces cas, 2,1 à 5 millions d'incidents sont attribués à la consommation de viandes et de volailles [23].

La présence des microorganismes pathogènes dans la viande résulte de la contamination des carcasses au cours de l'abattage à partir du contenu gastro-intestinal, des peaux et des pieds des animaux, des locaux et du matériel utilisé, des mains et des vêtements du personnel, de l'eau de lavage des carcasses et même de l'air ambiant [26].

Le nombre de mortalités attribuées aux pathogènes transmis par voie alimentaire s'élève de 2695 à 6587 dont 1436 à 4232 sont liées à la consommation de viandes et de volailles [23]. Parmi les germes responsables de TIAC, on cite *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* et *Aeromonas hydrophila* [24,25].

D'après la FAO, la consommation mondiale de viande, toutes productions animales confondues, a atteint 286,2 millions de tonnes en 2010 [1]. Au Maroc, la viande rouge occupe une part importante dans l'alimentation humaine, avec une production annuelle moyenne de 152 000 tonnes de viande bovine, 116 000 tonnes de viande ovine, 51 000 tonnes d'abat, et 47 000 tonnes d'autres types de viandes rouges (caprine, cameline et chevaline) [2].

Sur le plan nutritionnelle, La viande est un aliment composite et complexe. Certains de ses constituants sont des atouts nutritionnels comme les lipides et les protéines, de ce qui fait, la viande est une denrée très périssable. En effet, les maladies infectieuses d'origine alimentaire sont souvent liées à des défauts d'hygiène et peuvent être grave comme le cas des toxi-infections à *Escherichia coli* O157 [3] ou à Salmonelles qui présentent une importance considérable dans les domaines vétérinaires et sur le plan médical, tant par les pertes économiques dues à la maladie animale, que par la forte incidence chez l'homme ; des fièvres typhoïdes et des toxi-infections alimentaires à salmonelles [4].

L'objectif de la présente étude est d'évaluer la qualité microbiologique de la viande hachée bovine commercialisée dans la région de Gharb par le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, des coliformes fécaux, les anaérobies sulfite-réducteurs et des *Staphylococcus aureus* et la recherche des Salmonelles.

Il faut bien noter que j'ai une opportunité d'expérimenter le domaine professionnel et de reconnaître les techniques utilisées pour vérifier la qualité bactériologique de l'eau de boisson et denrées alimentaires, et d'avoir des idées en tout ce qui concerne les méthodes d'ensemencement, quantification, d'identification bactériologique en se basant sur ce que j'ai étudié au cours de mon cursus universitaire surtout en microbiologie alimentaire et la physiologie microbienne.

J'ai proposé dans la première partie une synthèse bibliographique sur les germes pathogènes recherchés dans les différents échantillons traités à ce laboratoire en particulier la microbiologie des denrées alimentaires. Elle traite aussi la nature et les sources de contamination des germes des viandes de boucherie. Dans une seconde partie j'ai décrit la méthodologie adoptée au cours de l'expérimentation pour les germes trouvés dans la viande hachée bovine.

La troisième partie est consacrée aux résultats acquis pour les différents paramètres adoptés pour évaluer la qualité microbiologique de viande hachée bovine.

Enfin, les résultats sont discutés avec une conclusion.

# Partie I : Etude bibliographique

## Préambule

La contamination des produits alimentaires peut avoir de plus au moins grandes conséquences allant de simple altération des qualités organoleptique et commerciale du produit à des intoxications ou des toxi-infections.

On peut classer les maladies acquises suites à l'ingestion d'aliments contaminés en :  
Intoxication : résulte de l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment. Il s'agit essentiellement des intoxications botuliniques, staphylococciques et à *Bacillus cereus*. Les microorganismes synthétisent ces toxines de nature protéique au cours de la phase exponentielle de croissance (*C. botulinum*) ou en fin de cette phase (*S. aureus*) [6].

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) : sont définies par l'apparition d'au moins deux cas d'une symptomatologie en général digestive, dominée principalement par la diarrhée qui peut être rapportée à une même origine alimentaire. Les TIAC font partie du cadre nosologique plus général des diarrhées aiguës infectieuses. Elles répondent à un nombre limité d'étiologies et représentent une cause importante de mortalité dans les pays en voie de développement, de morbidité dans les pays industrialisés, responsables d'absentéisme au travail et à l'école. Les trois agents les plus représentés sont *salmonella*, *Clostridium perfringens* et *staphylococcus*. Leur évolution est le plus souvent rapidement favorable [6].

Il existe 2 sortes de TIAC selon le micro-organisme impliqué :

Les Maladies infectieuses Alimentaires :

L'utilisateur consomme un aliment contaminé par un micro-organisme. Il se multiplie dans l'organisme après consommation de la préparation alimentaire. Le délai d'apparition des symptômes est long (entre 1 à 3 jours pour les bactéries) et la présence de seulement quelques micro-organismes dans un aliment peut provoquer la maladie [6].

Ex : Certaines Salmonelles, *Listeria*, virus (hépatite A), ...

Les Toxi-infections Alimentaires :

Les bactéries responsables de TIA ont la capacité de fabriquer des toxines et de les libérer dans l'aliment si les conditions de conservation de l'aliment permettent le développement microbien (Température entre 10 et 63°C, temps longs...)

Lors de la consommation de l'aliment contaminé, c'est la présence de ces toxines qui est responsable des symptômes. La toxine étant déjà présente lors de la consommation de l'aliment, les symptômes apparaissent très rapidement (quelques heures) après la consommation de l'aliment [6].

Ex : *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*...

## **I- Microbiologie des denrées alimentaires**

### **1- Réception des échantillons :**

#### **1-1- EAUX :**

L'eau doit se recueillir dans un flacon chimiquement propre (portant les infos de prélèvement) dont le volume doit être d'au moins 100 mL. L'analyse bactériologique doit commencer le plus rapidement possible, de préférence dans un délai de une à six heures. Les échantillons analysés dans ce laboratoire sont de différents types :

##### **Eau usée :**

La dépollution des eaux usées est devenue un impératif pour la société moderne. Son assainissement répond à différentes préoccupations essentielles : Préservation de la santé humaine et l'environnement.

Elles peuvent couvrir une assez large gamme d'utilisations, qui ne requiert pas d'eau de qualité potable, comme l'arrosage des parcs et jardins publics, le lavage des rues, la lutte contre les incendies ; l'irrigation après traitement biologique.

**Eau de puits et des sources :** Après avoir fait les analyses sur l'eau de puits, cette eau peut être destinée soit pour la consommation humaine (Potable), soit pour des activités de jardinage, d'arrosage, de lavage de voiture ou de remplissage de piscine.

**Eau potable :** La vérification de la potabilité de l'eau destinée à la consommation humaine est indispensable.

**Eaux traitées et non traitées :** Afin d'utiliser les eaux traitées et non traitées dans l'industrie agro et non agro-alimentaire, l'irrigation et l'élevage des animaux, il faut s'assurer de leur qualité hygiénique à partir des analyses microbiologiques et chimiques.

#### **1-2- ALIMENTS :**

Les échantillons d'aliments ont été prélevés de différentes cuisines des restaurations par des techniciens d'hygiène du milieu en respectant les techniques de prélèvement et ils sont acheminés rapidement au laboratoire dans des glaciaires à 4°C afin d'éviter la prolifération bactérienne, puis analysés immédiatement ou à défaut après 6 heures du prélèvement. Les données relatives aux échantillons ont été recueillies à partir du registre des analyses bactériologiques de l'aliment de l'année en cours. Elles concernaient : le service expéditeur, le code de l'échantillon, l'origine, l'agent préleveur, la nature de l'échantillon, le code de laboratoire, la date de réception. La manipulation des échantillons a été réalisée avec des précautions strictes à savoir le port des gants et de la blouse.

### **2- Traitement des échantillons et préparation des dilutions :**

#### **2-1- Aliments liquides et solides hydrosolubles :**

Les aliments liquides et aliments solides hydrosolubles sont préparés directement dans des flacons à dilution en ajoutant aseptiquement 10 mL ou 10 g de produit à 90 mL de diluant (souvent le diluant est l'eau peptonée tamponnée).

Des dilutions décimales sont ensuite effectuées à partir de la solution mère selon l'état de contamination.

#### **2-2- Aliments solides non hydrosoluble :**

Pour les produits solides on introduit 10 g du produit à analyser dans un flacon taré contenant 90 mL de diluant :

- L'ensemble est homogénéisé à l'aide d'un broyeur (Stomacker) ;
- Le broyat constitue la suspension mère au 1/10 à partir de laquelle des différentes dilutions sont préparées.

### **3- Dénombrement de bactéries de tests d'hygiène générale :**

Les bactéries pathogènes (c'est-à-dire capables de provoquer une maladie chez le consommateur des denrées animales ou d'origine animale) recherchées ou dénombrées à l'heure actuelle sont essentiellement les Salmonelles, les anaérobies sulfite-réducteurs 46°C. Ils existent sous forme sporulée très résistante, et *Staphylococcus aureus* pour l'ensemble des denrées animales ou d'origine animale [5].

Les recherches de bactéries pathogènes étant insuffisantes pour dépister les fautes d'hygiène, un certain nombre de tests indicateurs de l'hygiène générale de l'aliment ont été mis en place [5], ce sont :

- Le dénombrement de l'ensemble des MO aérobies cultivant à 30°C (appelés souvent flore totale) ;
- Le dénombrement de bactéries tests de contamination fécale dites Coliformes fécaux.

En effet, une contamination fécale fera toujours soupçonner la présence de pathogènes, tels que *Salmonella* ou *E.coli* ou des virus intestinaux.

Ce sont des entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 44°C. *E.coli* leur est parfois préféré car plus spécifique de la microflore fécale.

Pour les produits de la mer, on dénombre aussi les Streptocoques fécaux (Entérocoques) qui sont des commensaux de l'intestin de recherche plus difficile que les Coliformes, notamment en milieu salé. Les Coliformes, eux, sont des Entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 37°C. Ils sont significatifs de contamination par l'environnement [5].

### **3-1- Les microorganismes témoins de contamination fécale :**

#### **- La flore mésophile aérobie totale :**

La flore aérobie mésophile (aussi appelée flore totale) représente l'ensemble des microorganismes se développant en présence d'oxygène à une température optimale de 30°C (multiplication active de 10°C à 45°C). Cette appellation peut donc regrouper aussi bien des microorganismes pathogènes que d'altération. Un nombre élevé de flore aérobie mésophile représente un risque de présence de germes pathogènes, à des niveaux pouvant être dangereux.

#### **- Coliformes totaux :**

Bactéries en forme de bâtonnet à l'extrémité arrondie, Gram négatif, présentes dans le sol, l'eau, le lait, certains aliments, et qui vivent normalement dans l'intestin de l'homme et de l'animal mais peuvent devenir pathogènes.

Ces germes possèdent l'enzyme  $\beta$ -galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 37°C afin de produire des colonies rouges sur un milieu bien approprié.

#### **- Coliformes fécaux :**

Les coliformes thermo tolérants sont des microorganismes en bâtonnets, ne formant pas de spores, Gram négatifs, oxydase négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de croître en présence de sels biliaires, ou autres agents de surface ayant des propriétés inhibitrices de croissance analogues et capables de fermenter le lactose avec production d'acide (ou d'aldéhyde) et de gaz en 48 heures à la température de 44°C.

L'espèce caractéristique et principale des coliformes fécaux est *Escherichia coli*, qui vit dans les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud. La souche *E. coli* 0157:H7 peut provoquer de graves maladies transmises par les aliments. Les bovins sont le principal réservoir de cet agent pathogène.

### **3-2- Les microorganismes pathogènes et toxigènes :**

#### **- Staphylococcus aureus :**

*S. aureus* est une coque à coloration de Gram positive. Il mesure de 0,5 à 1  $\mu$ m de diamètre, ne sporule pas, est immobile, aéro-anaérobie facultatif et possède une catalase et une coagulase. *S. aureus*, espèce type du genre *Staphylococcus*, parfois appelée staphylocoque doré. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles.

Les espèces enterotoxinogènes de staphylocoque sont habituellement du genre aureus. *Staphylococcus aureus* est une bactérie catalase+ et coagulase+.

Les denrées incriminées sont les plats qui ont été contaminés, surtout après la cuisson par des manipulateurs humains porteurs de staphylocoques pathogènes (plaies aux mains, angine rhinopharyngite, sinusite) et mis à la température ambiante pendant plusieurs heures (plats froids).

#### **- Anaérobies Sulfite Réducteurs (ASR) :**

Les Clostridiens sulfite-réducteurs et *Clostridium perfringens* réduisent les sulfites en sulfures noirs. Ce sont des bacilles Gram positif, anaérobies stricts.

Les Clostridiiums sulfito-réducteurs sont des bactéries commensales de l'intestin ou saprophytes du sol ; comme test de contamination fécale éventuellement ancienne vu la résistance des spores à l'extérieur [5].

*Clostridium perfringens* est une bactérie qui produit une toxine dans le tractus intestinal des personnes qui ont consommé des aliments contaminés par un grand nombre de ces bactéries.

On retrouve ces microorganismes entre autres dans les langues, les viandes de bouillon, les sauces, dès lors lorsqu'il peut y avoir anaérobiose c'est à dire développement des microorganismes en l'absence d'air [11].

#### - **Salmonella spp :**

Les salmonelles sont des entérobactéries du genre *Salmonella*, nommées ainsi en l'honneur du médecin vétérinaire américain Daniel Elmer Salmon même si l'homme qui a découvert le genre était Theobald Smith, qui travailla sous la direction de Salmon au Bureau of Animal Industry (BAI) dès 1884 [28].

Le germe *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, ce sont des bacilles Gram négatifs, aéro-anaérobies facultatifs, souvent mobiles grâce à leur ciliature péritriche et non sporulés. Elles fermentent le glucose avec production de gaz, réduisent les nitrates en nitrites et possèdent la catalase mais ne possèdent pas le cytochrome oxydase.

Les *salmonella* sont des bactéries mésophiles, ayant une température optimale de croissance de 35/37°C, cependant les Salmonelles peuvent se multiplier de 5°C à 45/47°C avec une croissance nettement retardée par les températures inférieures à 10°C [27].

Actuellement on distingue plus de 2000 sérotypes, *Salmonella Paratyphi* A, B, C, sont strictement adaptés à l'homme.

*Salmonella typhi* est plus redoutée par sa fréquence et par sa gravité.

Cependant un seul germe de *Salmonella Typhi* entraîne la typhoïde, la gastro entérite est plus une maladie qu'un véritable empoisonnement alimentaire.

Parmi les symptômes, on observe des maux de tête, de la nausée, des vomissements, de la fièvre, (39-40 °C). Ces signes sont suivis de douleurs abdominales, de la diarrhée, des frissons et un état de faiblesse et de prostration, la durée des symptômes 03 à 08 jours et la convalescence limitée à une huitaine de jours [7].

#### - **Streptocoques fécaux :**

Ce sont des bactéries de forme sphérique au coccoïde, Gram+, disposées en pair ou en chaînette, dépourvues de catalase, capables de croître à 37 °C en 48h ; elles font partie de la flore intestinale normale humaine ou d'autres animaux à sang chaud. Ces bactéries constituent un indice de contamination fécale ancienne, capables d'hydrolyser l'esculine en présence de bile.

## **II- NATURE ET SOURCES DE CONTAMINATION DES VIANDES DE BOUCHERIE**

### **1- Nature des germes des viandes de boucherie :**

La microflore de contamination des viandes et des produits à base de viande comprend essentiellement les germes saprophytes et test d'hygiène et éventuellement une flore pathogène responsable des maladies [13].

#### **1-1- Les germes saprophytes et Germes tests d'hygiène :**

Les germes saprophytes constituent l'essentiel de la microflore de contamination des viandes et produits à base de viande. Parmi les bactéries saprophytes isolées des viandes, nous pouvons citer par ordre d'importance d'abord *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Micrococcus* ; il y a ensuite : les Entérobactéries et *Flavobacterium* et enfin : *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Lactobacillus*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* et *Clostridium*. Parmi les bactéries saprophytes les hygiénistes font une place à *E.coli*, aux coliformes fécaux et entérocoques en général. Ces bactéries sont considérées comme provenant directement du tube digestif. Cependant *E.coli* demeure actuellement le seul et le plus sûr des germes tests à utiliser en hygiène publique [13].

#### **1-2- Germes pathogènes :**

Les germes pathogènes qui contaminent les viandes et responsables de toxi-infections alimentaires sont en général *Salmonella ssp*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* et récemment *E.coli* entérohemorragique ou *E.coli O157 : H7* [8, 13, 9].

## **2- Sources de contamination des viandes de boucherie :**

Les carcasses des animaux et les viandes découpées sont contaminées par les poils, les fécès des animaux ou les manipulations durant les opérations d'abattage et de traitement des viandes. Les facteurs de contamination de la viande hachée par les germes pathogènes et les bactéries saprophytes sont surtout la mauvaise hygiène du personnel et des manipulations, les contaminations croisées [9].

### **2-1- Contamination ante- mortem :**

Cette contamination se fait soit par septicémie, soit par bactériémie par des germes dont l'habitat naturel est l'organisme [10].

### **2-2- Contamination lors des opérations de préparation à l'abattoir :**

Cette contamination est essentiellement due à la bactériémie d'abattage qui est largement influencée par la fatigue et le stress observés durant le transport. Les cuirs sont également une importante source de contamination microbienne des carcasses. L'éviscération doit être précoce pour empêcher les germes de traverser la paroi intestinale [11, 12].

Un tiers des carcasses est pollué par *Escherichia coli* provenant de l'intestin. Selon FOURNAUD [13], une partie non négligeable des germes peut provenir de l'eau utilisée pour le travail des carcasses. FRAZIER et VESTHOFF cités par SYLLA [10] ont dénombré 10 à 20.000 bactéries dans 01mL d'eau ayant servi de douche des carcasses de bœuf à l'abattoir.

### **2-3- Contamination au cours du stockage et de la commercialisation :**

Selon MESCLE et ZUCCA [14], toute variation dans les conditions de stockage et de commercialisation va entraîner la prolifération des microorganismes contaminants. Lors de la commercialisation, des contaminations par l'air, les surfaces, les vendeurs et le personnel de service sont encore possibles.

### **2-4- Contamination au cours du transport :**

Le transport implique des changements d'ambiance, sources éventuelles de variation dans les températures et dans l'humidité relative [16].

### **2-5- Contamination lors de la décongélation :**

CHRISTOPHERSENS cité par SYLLA [10], montre que la décongélation lente favorise la multiplication de la flore d'altération de surface. Après décongélation, le stockage de la viande de 2 à 5°C favorise la multiplication rapide des germes mésophiles en particulier les germes pathogènes.

### **2-6- Contamination lors de la découpe :**

AZAM cité par SYLLA [10]. Constate que les erreurs d'hygiène graves dans les conditions de travail telles que la température trop élevée dans les salles de découpe, le nettoyage insuffisant du matériel et des tenues vestimentaires des travailleurs favorisent la prolifération des bactéries. D'après FOURNAUD [13], le bois est à proscrire dans les ateliers de découpe, car il sert de réservoir aux bactéries.

## **III- EVOLUTION DE LA FLORE BACTERIENNE DES VIANDE HACHEES**

### **1- Condition d'évolution des germes :**

L'évolution des germes de contamination sur les viandes hachées est fonction d'un certain nombre de paramètres dont les plus importants sont les nutriments, la contamination initiale, le pH, la température et l'activité de l'eau [13, 15, 11].

#### **1-1- Nutriments :**

La viande par sa richesse en eau et en protéines représente toujours un milieu privilégié pour la croissance microbienne [8, 14].

#### **1-2- Contamination initiale :**

Les microorganismes interviennent par leur nombre. En effet lorsque le nombre de germes est élevé, la phase de latence est courte et l'espèce prédominante s'impose par la loi du plus grand nombre [11].

### **1-3- Tension d'oxygène :**

La croissance en anaérobiose est plus lente que la croissance en aérobiose [13]. La viande hachée étant une denrée suffisamment aérée, favorise la multiplication des germes aérobies.

### **1-4- Le pH :**

La valeur du pH de la viande rassis est normalement comprise entre 5,4 et 5,6 dans la plupart des muscles [16]. Selon *SHELEF et al*[17] celui-ci varie entre 5,8 et 5,9. Il augmente durant le stockage. *CRAPLET* lui a donné un intervalle beaucoup plus large de 5,3 à 6. Ils soutiennent qu'une viande ayant un pH de 6 se pollue plus rapidement que celle ayant un pH de 5,3 [18, 13, 17]. Ceci montre que l'acidité a un effet bactériostatique sur l'évolution des germes.

### **1-5- L'activité de l'eau (Aw) :**

C'est un paramètre qui caractérise la teneur en eau des denrées. La plupart des bactéries se développent bien pour des Aw comprises entre 0.995 et 0.980.

Les germes pathogènes sont inhibés pour les valeurs inférieures à 0.94 sauf *Staphylococcus aureus* [11].

### **1-6- La température :**

Lors du stockage réfrigéré, seuls les germes superficiels peuvent évoluer. Les germes psychrophiles se multiplient d'autant plus lentement que la température est basse. Une augmentation de +5°C multiplie leur croissance par deux et de +10°C par quatre.

La réfrigération limite l'activité des germes pathogènes susceptibles de provoquer des intoxications alimentaires. Par exemple les températures d'inhibition de la multiplication et de la toxinogénèse des staphylocoques sont respectivement +6,7 et +10°C. *ROSSET ET ROUSSEL -CIQUARD* [11] notent qu'à partir de +3,3°C, il y a absence du risque dû aux bactéries pathogènes. La congélation réduit la vitesse de multiplication des germes. A -10°C il y a arrêt de toute multiplication microbienne et à -18°C arrêt de toute multiplication microbienne. Cependant les microorganismes pathogènes pourront retrouver tout leur pouvoir à la décongélation. Ainsi donc, la qualité microbiologique finale de la viande décongelée dépend de la qualité microbiologique avant la congélation. Elle dépend aussi du temps et de la température de décongélation ainsi que de la température de stockage après décongélation.

# Partie II : Etude expérimentale

## Préambule

La viande et les produits carnés sont particulièrement sensibles à la prolifération bactérienne, en raison de leur haute teneur en eau et en substances nutritives. La viande est stérile au départ, mais dès qu'elle est coupée, les surfaces exposées à l'air ambiant fournissent des conditions idéales pour le développement des bactéries. La viande hachée est encore plus exposée.

La perte de l'intégrité de la trame conjonctive facilite donc la pénétration des bactéries qui peuvent rapidement se multiplier dans un substrat riche en nutriments comme la viande. Cette contamination peut être à l'origine d'une altération rapide de la viande hachée, limitant sa durée de conservation. Dans notre pays peu de travaux ont été réalisés pour apprécier la durée de conservation des viandes hachées de bœuf.

Le hachage entraîne une modification de structure du produit et favorise la contamination des masses musculaires par les germes de surface [14]. Ainsi les viandes hachées sont plus sensibles aux altérations microbiennes que les viandes entières. Selon *CARTIER* [19], le niveau de contamination de la viande hachée est étroitement lié à la qualité de la matière première. Cette dernière conditionne largement celle des produits finis. Par conséquent les contaminations en cours de fabrication ne jouent qu'un rôle secondaire [11,20]. Les contaminations par la matière première sont estimées à hauteur de 30 % à 40%. Les conditions de fabrication sont variables d'une unité de fabrication à une autre.

Pour cette raison, des contrôles d'hygiène et de température pendant le traitement et le pré conditionnement -consistant à garder les outils et équipements propres- sont d'une importance vitale pour minimiser la contamination du produit par les microorganismes.

Le but de mon travail consiste donc à réaliser le dénombrement des germes témoins de la contamination fécale de la viande hachée ainsi que la recherche des germes pathogènes. Le choix de ce thème est en raison de l'intérêt clinique de ces analyses ainsi que le nombre élevé des échantillons impropres de la viande hachée déclaré par la délégation de la santé, malgré l'importance relative de la demande de cette denrée dans la région du Gharb.

Le principe consiste en premier lieu à faire isoler la population bactérienne qui se trouve dans notre échantillon (viande hachée bovine), puis faire étaler les différentes dilutions préparées à partir de la suspension, sur différents milieux de cultures, pour favoriser la croissance de telle ou telle population qui se trouve dans notre échantillon, et par la suite cela va nous donner une idée sur l'état microbiologique de notre produit alimentaire.

## MATERIELS ET METHODES

### 1- Echantillonnage :

Plusieurs échantillons de la viande hachée ont été recueillis dans le laboratoire de différentes boucheries, ces échantillons sont prélevés par un technicien de l'hygiène selon une technique aseptique afin de ne pas contaminer l'échantillon et le produit échantillonné dont la quantité de la viande hachée prélevée soit égale à 250 g.

### 2- Analyses microbiologiques :

#### 2-1- Préparation des échantillons :

C'est le protocole défini par les méthodes normalisées AFNOR [21].

Dès l'arrivée de l'échantillon au laboratoire, 25 g sont prélevés dans chaque unité et dilués dans un flacon contenant 225 mL d'eau peptonnée. Le mélange est mis dans un sachet stérile et introduit dans le stomacher qui assure le broyage pendant 2 min. Après revivification de la solution mère, on réalise la dilution initiale en prélevant 1 mL de la solution mère qui est prélevé et mis dans 9 mL d'eau peptonnée, la dilution  $10^{-1}$  est réalisée.

Pour réaliser la dilution  $10^{-2}$ , 1 mL de la dilution est ajouté dans 9 mL d'eau peptonnée ainsi de suite pour réaliser les dilutions  $10^{-3}$ .

Le diluant utilisé pour préparer les suspensions mères est généralement le même que celui utilisé pour effectuer les dilutions décimales. Ce diluant ne doit pas introduire de variation quantitative ni qualitatives dans la flore microbienne présente.

#### 2-2- Recherche des microorganismes :

Les germes recherchés sont : la flore mésophile aérobie totale à 30°C, les coliformes thermo tolérants, les staphylocoques présumés pathogènes, les anaérobies sulfito-réducteurs et les salmonelles.

#### - Dénombrement de FMAT :

Ce sont des microorganismes aptes à se multiplier entre +25 et +40°C avec un optimum de +30°C en aérobiose. Leur dénombrement s'effectue selon la norme NF V 08-051 Décembre 1992 [21].

La méthode utilisée est l'ensemencement par incorporation à la gélose PCA qui consiste à dénombrier les microorganismes viables présents dans l'échantillon. Les ensemencements sont effectués avec des dilutions  $10^{-4}$  et  $10^{-7}$ .

- 1 mL de chaque dilution est prélevé puis introduit dans une boîte de Pétri stérile. On y coule ensuite 10 à 15 mL de PCA préalablement préparé et ramené à 45°C.
- L'inoculum et le PCA sont alors homogénéisés par des mouvements de rotation de la boîte de Pétri puis séchés.
- Après solidification, une deuxième couche (couche protectrice) est coulée pour empêcher le développement d'éventuelles flores de contamination superficielle.
- Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve +30°C pendant 48 à 72 heures. Les colonies blanchâtres ayant poussés en profondeur sont dénombrées (**Figure 1**).

On obtient le nombre exact de germes par gramme de viande hachée en appliquant la formule suivante :

$$N = (\sum c * d) / V$$

$\Sigma c$  = somme des colonies sur les boîtes comptées.

$V$  = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte.

$d$  = dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont obtenus.

Cette formule est valable aussi pour le dénombrement des autres germes étudiés. Les résultats sont exprimés en UFC/g.

### - **Dénombrement des coliformes fécaux :**

Cette recherche a été effectuée selon la méthode normalisée NF 08-060 Mars 1996 [21]. La méthode est le dénombrement par incorporation à la gélose DL. Les dilutions utilisées sont  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ . L'ensemencement et le dénombrement se font de la même manière que précédemment. L'incubation se fait à l'étuve  $+44^{\circ}\text{C}$  et seules sont comptées les colonies rouges vives à rosâtres (Figure 2).

### - **Dénombrement de *Staphylococcus aureus* :**

Cette recherche a été effectuée selon la norme NF V 08-057-1 Novembre 1994 [21]. Parmi les Staphylocoques présumés pathogènes, *Staphylococcus aureus* est recherché. Comme milieu de culture on utilise le milieu Baird Parker (BP) auquel on ajoute du jaune d'œuf au tellurite.

Les dilutions utilisées sont  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ . L'ensemencement se fait avec 0,1 mL par dilution sur du BP préalablement coulé dans des boîtes de Pétri et sont incubés à l'étuve  $+37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures. Les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent noir brillant, bombées et entourées d'un liséré blanc opaque et d'un halo d'éclaircissement (Figure 3). La présence de *Staphylococcus aureus* est confirmée par les tests de la catalase et de la coagulase.

**Test coagulase :** Cinq colonies sont repiquées sur des tubes de bouillon cerveau-cœur, après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 18 heures, 0,5 mL de culture sont ajoutés à 0,5 mL de plasma de lapin. L'ensemble est bien agité, puis incubé à  $37^{\circ}\text{C}$ . Les tubes sont examinés après une heure, 04 heures, puis après 24 heures. La formation d'un caillot est considérée comme une réaction de coagulase positive.

**Test catalase :** La catalase est un produit métabolique toxique pour les bactéries. Pour se faire, on ajoute une goutte de peroxyde d'hydrogène 30% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à la colonie placée sur une lame de microscope. On remarque une production de bulle (libération de gaz) lorsque la réaction est positive.

### - **Dénombrement des Anaérobies-sulfito-réductrices (ASR) :**

La recherche et le dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs sont réalisés dans deux buts différents :

- Pour mettre en évidence le *clostridium perfringens* (type A) qui est parfois responsable d'intoxication alimentaire.
- Pour détecter les clostridium sulfito-réducteurs qui sont des bactéries commensales de l'intestin et saprophytes du sol donc à la recherche d'un indice de contamination fécale ancienne.

Le dénombrement des ASR est réalisé par ensemencement de 01mL d'échantillon à analyser dans 20 mL de milieu SPS. On laisse le milieu solidifier puis on incube à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h.

Les colonies caractéristiques des anaérobies sulfito-réducteurs sont noires sur le milieu gélosé sélectif (SPS) (Figure 4).

### - **Recherche de salmonella :**

La recherche de *salmonella* dans les aliments a été effectuée selon la norme NF V 08-052 Mai 1997. L'analyse est effectuée en utilisant 25 grammes d'aliment homogénéisé 02 min dans 225 mL de diluant de pré-enrichissement Eau peptonée tamponnée EPT (c'est un milieu nutritif non inhibiteur) à l'aide d'un homogénéisateur du type Stomacher (Figure 5). Après incubation de 24 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ , cette étape permet la récupération des bactéries *Salmonella sp* ayant subies des contraintes physiques ou chimiques (traitement de chaleur, congélation, déshydratation, agents de conservation). On ensemence 01 mL de la culture obtenu dans un tube à essai stérile contenant 09 mL de bouillon d'enrichissement sélectif contenant des agents inhibiteurs actifs sur les germes qui font concurrence aux *Salmonella sp* :

Rappaport-Vassiliadis, puis incubé pendant 24 heures à  $43^{\circ}\text{C}$  (Figure 6).

L'isolement se fait sur un milieu sélectif : gélose Hektoen, par ensemencement en stries à partir de 02 tubes, les boîtes sont incubées pendant 24 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ . Le changement de couleur initiale de bouillon fraîchement préparé indique une réaction positive. Après incubations, sur milieu Hektoen, les colonies caractéristiques de *salmonella* sont lisses et de couleurs vertes à centre noir (Figure 7).

A partir des colonies caractéristiques présentes sur les milieux d'isolement sélectives, on procède à une vérification de l'appartenance au genre Salmonella par détermination des caractères morphologiques et biochimiques spécifiques.

### Coloration de Gram :

On va effectuer la coloration de gram qui nous permet de savoir la morphologie des bactéries composant les colonies. Les bactéries Gram – seront colorées en rose et celles Gram + resteront violet (**Figure 8**).

### Test de fermentation du glucose et lactose :

Cette fermentation est recherchée sur milieu Hajna-Kligler, qui renseigne également sur la production de gaz de H<sub>2</sub>S, le milieu est préparé en tubes inclinés de manière à voir un culot et une pente sensiblement de même hauteur. L'ensemencement se fait par piqure centrale dans le culot et par une strie médiane sur la pente. Les tubes sont incubés à 36°C pendant 24 heures. Les souches de Salmonelle fermentent le glucose (culot jaune) mais pas le lactose (pente rouge) avec ou sans production de gaz (fissuration ou formation de bulles dans la gélose) et de H<sub>2</sub>S (noircissement) (**Figure 9**).

### Recherche de la bêta galactosidase :

Dans un tube on ajoute 0.5 mL d'eau physiologique stérile. On pose une culture de la souche prélevée sur M. KLIGLER. Ajouter un disque ONPG et incubé à 37°C pendant 30 min à 24h. La réaction positive se traduit par une coloration jaune (**Figure 10**).

### Recherche de la lysine décarboxylase :

Ensemencer la souche dans le BHI et incubé à 37°C pendant 30 min à 24 h si le milieu vire au beau-violet le test est positif (**Figure 11**).

### Test oxydase :

La recherche d'oxydase est un test fondamentale pour orienter l'identification des bacilles Gram -. Le PDA est utilisé comme réactif, généralement imprégnés sur des disques (disques oxydase) (**figure 12**).

### Test IMVIC :

#### La production d'indole :

Sous l'action d'une tryptophanase bactérienne, le tryptophane est transformé en indole qui donne une coloration rouge-rose avec le réactif de Kovacs.

La mise en évidence de l'uréase et de la production d'indole est réalisée sur le milieu urée-indol. A partir d'une culture prélevée sur le milieu de Kligler, le bouillon est ensemencé abondamment et incubé à 37°C pendant 24 h. Une uréase positive se traduit par un virage du milieu au rouge violacé (**Figure 17**). La présence de l'indol est révélée par l'apparition d'une coloration rouge à la partie supérieure du milieu après addition de 04 à 05 gouttes du réactif de Kovacs. (**Figure 13**).

#### Test au rouge de méthyle :

Quelques bactéries fermentent le glucose avec formation d'acides. La réaction au rouge de méthyle consiste à mettre en évidence l'acidification finale du milieu après fermentation du glucose par l'ajout de 02 gouttes de rouge de méthyle. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rouge (**Figure 14**).

#### Réaction de Voges Proskauer :

La fermentation du glucose par la voie butane-diol se traduit par une faible acidification du milieu ainsi que par la formation d'acétoïne qui est oxydée en di-acétyle en milieu alcalin. Ce métabolite forme une coloration rouge avec l'alpha-naphtol.

La même démarche que RM. On ajoute 0.5 mL d'une solution d'alpha-naphtol et 1 mL de soude caustique à 16% dans l'eau. Agiter énergiquement et laisser reposer pendant 10 min à température ambiante.

Une réaction positive se traduit par une coloration rouge ou rose en surface (**Figure 15**).

#### Utilisation du citrate :

Certaines bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone pour leur croissance et leur multiplication.

Ensemencer un tube contenant le bouillon citrate. Incuber à 37 °C pendant 01 à 07 jours. Une réaction positive se traduit par un bleuissement du milieu et une culture abondante (**Figure 16**).

## La gestion des déchets :

Après chaque analyse microbiologique, il est nécessaire de réaliser la gestion des déchets de laboratoire qui permet d'assurer la sécurité des personnels et de la population, de limiter les impacts sur l'environnement et de maîtriser le budget d'élimination des déchets dans une démarche de développement durable. Le tri des déchets doit être effectué pour séparer les types de déchets selon les paramètres de l'évacuation.

Les déchets sont nombreux :

- Les cultures sur boîte de pétrie ;
- Les bouillons des cultures ;
- Les cultures en tube à essai ;
- Les lamelles ;
- Les denrées alimentaires analysés.

Les déchets doivent être inactivés par un procédé approprié et validé avant évacuation, quelle que soit la classe de risque de l'utilisation confinée.

Généralement, l'autoclavage est l'une des meilleures méthodes de stérilisation du matériel de laboratoire, car la température est réglable et adaptable à chaque situation.

# Partie III : Résultats & Discussions

## RESULTATS

Le tableau ci-dessous présente les résultats des analyses de 20 échantillons de viande hachée bovine, prélevés pendant la période de stage au sein du Laboratoire régional de l'épidémiologie et hygiène des milieux de Sidi Kacem.

**Tableau I : Résultats du dénombrement de la FMAT, des CT, des ASR, des S. aureus et la recherche de Salmonella dans les prélèvements recueillis de viande hachée en UFC/g :**

### 1<sup>er</sup> prélèvement :

Echantillons	FMAT	CF	ASR	S. aureus	Salmonella	Interprétation
1	1.2 10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	0	5 10 <sup>2</sup>	Abs*	NC*
2	3 10 <sup>4</sup>	2 10 <sup>4</sup>	50	00	Abs	NC
3	4.2 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>3</sup>	100	4 10 <sup>3</sup>	Abs	NC
4	4 10 <sup>4</sup>	100	3.10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>2</sup>	Abs	NC
5	6 10 <sup>7</sup>	6 10 <sup>5</sup>	300	00	Abs	NC

Abs\* : absence ; NC\* : non conforme

### 2<sup>eme</sup> prélèvement :

Echantillons	FMAT	CF	ASR	S. aureus	Salmonella	Interprétation
1	2.3 10 <sup>5</sup>	2 10 <sup>5</sup>	00	200	Abs	NC
2	3.8 10 <sup>4</sup>	7 10 <sup>3</sup>	100	3 10 <sup>4</sup>	Abs	NC
3	7.8 10 <sup>4</sup>	4 10 <sup>3</sup>	3 10 <sup>3</sup>	8 10 <sup>2</sup>	Abs	NC
4	3.5 10 <sup>2</sup>	3 10 <sup>2</sup>	00	00	Abs	C
5	8.1 10 <sup>4</sup>	5 10 <sup>2</sup>	3 10 <sup>2</sup>	8 10 <sup>4</sup>	Abs	NC
6	4 10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	200	00	Abs	C*

C\* : conforme

### 3<sup>eme</sup> prélèvement :

Echantillons	FMAT	CF	ASR	S. aureus	Salmonella	Interprétation
1	1.2 10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	300	00	Abs	NC
2	1.2 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	150	00	Abs	C
3	2.3 10 <sup>6</sup>	2 10 <sup>6</sup>	450	00	Abs	NC

#### 4<sup>eme</sup> prélèvement :

Echantillons	FMAT	CF	ASR	S. aureus	Salmonella	Interprétation
1	3.4 10 <sup>8</sup>	3 10 <sup>8</sup>	00	00	Abs	NC
2	6.2 10 <sup>7</sup>	5 10 <sup>7</sup>	00	3 10 <sup>4</sup>	Abs	NC
3	3.04 10 <sup>6</sup>	3 10 <sup>6</sup>	200	2 10 <sup>4</sup>	Abs	NC
4	3 10 <sup>2</sup>	250	00	00	Abs	C
5	8 10 <sup>8</sup>	7 10 <sup>8</sup>	00	00	Abs	NC
6	4 10 <sup>2</sup>	3 10 <sup>2</sup>	00	00	Abs	C

#### Méthode d'interprétation :

Les résultats ont été interprétés selon l'arrêté conjoint n°624-04 du 17 SAFAR 1425 (8 Avril 2004) [27]. Le tableau II résume les valeurs minimales, maximales et les moyennes des différentes flores dénombrées dans la viande hachée en UFC/g, ainsi que les critères relatifs à la viande hachée selon la réglementation marocaine.

**Tableau II : Valeurs minimales, maximales et moyennes des microflores dénombrées au niveau de la viande hachée en UFC/g.**

	FMAT	CF	S.aureus	ASR	Salmonella
Critère marocaine	5 10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>	5 10 <sup>3</sup>	5 10 <sup>2</sup>	Abs

En fonction du degré de contamination, trois classes sont établies :

$$\begin{aligned}
 X \leq m & : \text{Aliment satisfaisant} \\
 m \leq X \leq M & : \text{Aliment acceptable} \\
 X \geq M & : \text{Aliment inacceptable}
 \end{aligned}$$

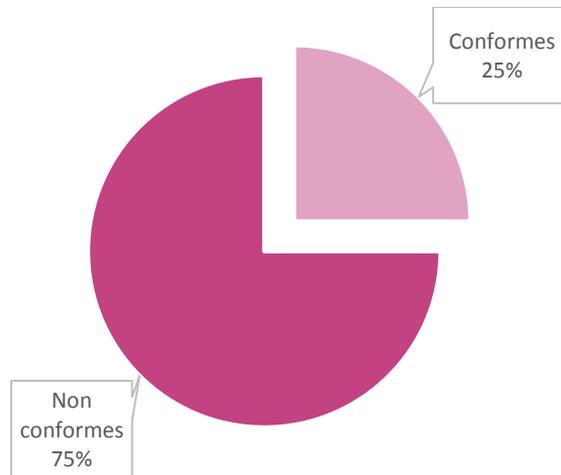
#### Evaluation de la non-conformité globale de la viande hachée :

Parmi les 20 échantillons de viande hachée analysés, seulement 5 échantillons ont été conformes et les autres 15 échantillons ont été non conformes.

**Tableau III : Pourcentage de la non-conformité globale.**

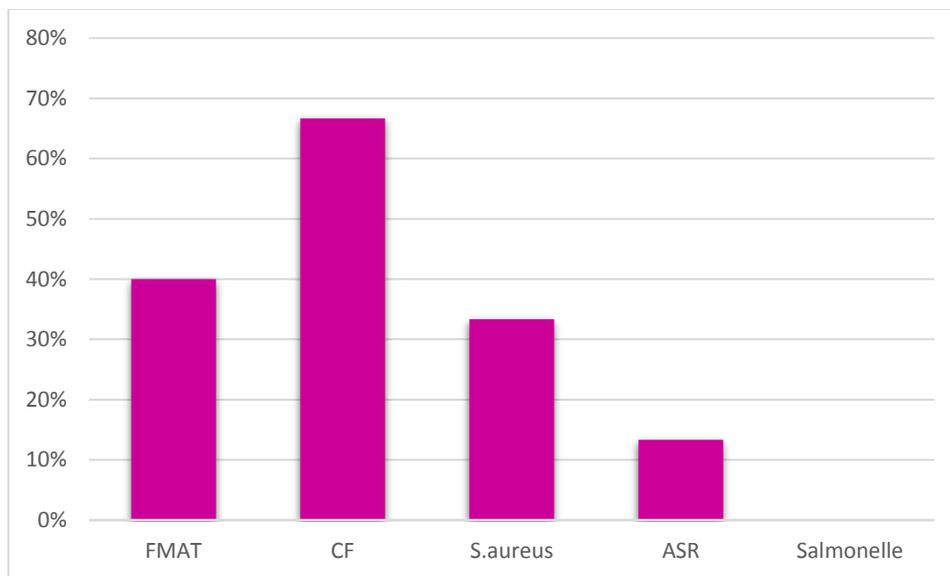
	Nombre total	Conformité	Non-conformité	%Conformité	%Non-conformité
<b>Viande hachée</b>	20	05	15	25 %	75 %

Selon les critères microbiologiques relatifs à la viande hachée, les résultats des analyses microbiologiques ont permis de classer 25 % des échantillons de viande hachée conformes aux critères réglementaires, tandis que 75 % soit 15/20 échantillons, ne répondaient pas aux exigences microbiologiques pour un ou plusieurs paramètres étudiés.



**Figure 18 : Répartition des échantillons de viande hachée par classe de conformité**

En ce qui concerne les germes incriminés dans la non-conformité de la viande hachée bovine, on constate que pour les germes totaux, 40 % des échantillons analysés sont non conformes. La dominance des coliformes fécaux dans les échantillons traités est apparue par un pourcentage de 66.67%. Alors que le pourcentage de la non-conformité pour les Staphylocoques dorés est de 33.33% de non-conformité. Pour les ASR 13.33 % des échantillons sont non conformes. Par ailleurs, il est très important de noter l'absence observée des Salmonelles dans les échantillons traités.



**Figure 19 : Pourcentage de la non-conformité de viande hachée par catégorie des germes**

D'après les résultats de cette série d'analyses et les critères fixés par l'arrêté, nous remarquons que :

- Pour les germes totaux, les 6 échantillons de viande hachée conformes sont de qualité satisfaisante.
- Pour les coliformes fécaux, 6 échantillons analysés sont de qualité satisfaisante et 3 échantillons sont acceptables.

- Pour Staphylocoque doré, les 15 échantillons conformes sont de qualité satisfaisante.
- Pour les ASR, 18 échantillons de viande hachée traités sont de qualité satisfaisante.
- Pour les Salmonelles, tous les échantillons analysés sont de qualité satisfaisante.

## Discussion

Les résultats des analyses microbiologiques ont montré que 75 % des échantillons de viande hachée prélevés dans la région du Gharb ne répondaient pas aux exigences microbiologiques. Ce résultat est similaire à celui de Cohen. N et al [2].

### Contamination par la FMAT :

Des teneurs en FMAT élevées dans la viande hachée témoignent d'une contamination bactérienne initiale élevée dans la viande [33].

La préparation de la viande hachée commence par le désossement de la viande au cours duquel il est difficile d'éviter le contact entre les surfaces carnés fraîchement mises à l'air et celles qui sont préalablement souillées. Cette opération nécessite une hygiène rigoureuse du manipulateur pour minimiser les contaminations. La préparation à l'avance d'une grande quantité de viande hachée et la rupture de la chaîne de froid sont autant d'éléments qui favorisent et accentuent la contamination de la viande.

Les résultats de la recherche des bactéries responsables de la non-conformité de viande hachée montrant que les Coliformes fécaux sont responsables de la non-conformité de la majorité des échantillons analysés.

### Contamination par les Coliformes fécaux :

Dans cette étude de contamination par les CF est similaire à la charge rapportée dans les résultats de Cohen et al [2]. Ces germes peuvent provenir probablement des mauvaises pratiques d'hygiène du personnel et des locaux.

Les locaux, le matériel de travail des boucheries sont mal entretenus, le personnel n'est pas qualifié, ce qui constitue une source de contamination non négligeable. Par ailleurs, le parage qui est une opération déterminante dans la préparation des viandes hachées, a pour effet d'étendre la population microbienne localisée à certains points des carcasses, à toutes les surfaces des pièces de viande [13].

### Contamination par Staphylocoque doré :

Au Maroc, *Staphylococcus aureus* est responsable de 38 % de TIA [6]. Cette bactérie présente un danger réel pour le consommateur quand le nombre est très élevé dans le produit mais aussi un danger potentiel lorsque le produit contaminé est conservé dans des conditions permettant leur prolifération. Dans cette étude, ce MO a été retrouvé dans 33.33 % des échantillons de viande hachée, ce résultat a été supérieur de celui rapporté par Cohen et al sur des échantillons de viande hachée [2].

Ces échantillons ont pu être contaminés par des porteurs de *Staphylococcus aureus* au cours des diverses manipulations. A ceci s'ajoute la contamination par l'animal.

Le muscle souillé superficiellement, se laisse en effet facilement pénétrer en profondeur par ces microorganismes au cours du découpage. Si l'entreposage à la température ambiante est prolongé, la viande peut favoriser la prolifération de la toxogénèse de *S. aureus* provoquant alors des intoxications qui peuvent être parfois graves.

### Contamination par les ASR :

Concernant les bactéries sulfite réductrices, les résultats obtenus montrent une présence faible avec un pourcentage assez important 13.33%.

La contamination par les *Clostridium* se produit généralement au cours de l'abattage. En effet, *C. perfringens* est un hôte normal du tube digestif.

### Contamination par Salmonelle :

Les Salmonelles sont totalement absentes dans tous les échantillons de viande hachée analysés.

Cette étude microbiologique des viandes et des produits carnés a révélé un niveau de conformité dans ces échantillons traités. Les Salmonelles représentent un grand danger de TIAC pour les consommateurs d'où la nécessité de mettre en place un programme de lutte efficace contre cette contamination.

## Conclusion

Les 20 échantillons de viande hachée analysés présentent une charge en bactéries qui dépasse les critères fixés par la réglementation marocaine. Ces niveaux élevés de contamination microbienne et la présence des bactéries pathogènes reflètent la mauvaise qualité hygiénique de la viande hachée qui pourrait être due aux mauvaises conditions de production et de transport des viandes sur les circuits de production et de distribution.

Les résultats des analyses microbiologiques indiquent que 75 % des échantillons analysés sont impropres à la consommation. Ceci témoigne des manipulations non hygiéniques et incorrectes de la viande. Une grande vigilance s'impose pour le consommateur vis-à-vis de la viande hachée notamment lorsqu'elle est consommée insuffisamment cuite.

L'assurance de la qualité de la viande hachée doit s'inscrire dans un cadre général d'hygiène qui commence depuis l'abattoir lors de la préparation des carcasses, ensuite lors du transport et la distribution de la viande.

Dans les boucheries, il faudrait d'abord sensibiliser le personnel à l'hygiène et au problème des toxi-infections alimentaires. Ensuite, il est primordial d'adopter certaines pratiques notamment :

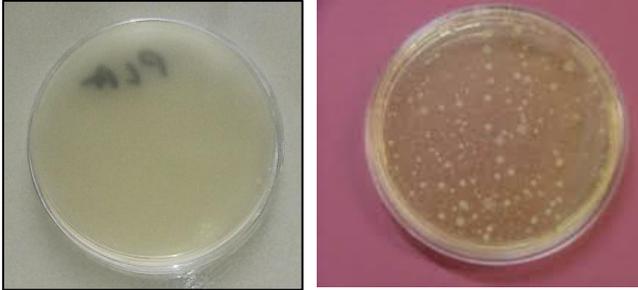
Une hygiène corporelle rigoureuse, le respect de la chaîne du froid, s'assurer de la qualité des ingrédients incorporés dans les préparations à base de viande et éviter de préparer de grande quantité de viande hachée ou d'exposer à température ambiante.

## Références bibliographiques

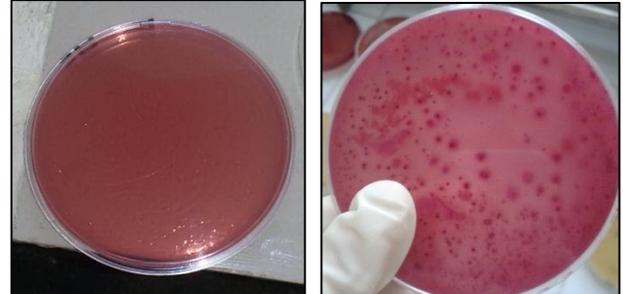
- [1] France Agrimer. Elevage/Viandes, Consommation mondiale de viande : état des lieux, dynamique, défis et perspectives, no 5, 2011.
- [2] N. Cohen et H. Karib, Risque hygiénique lié à la présence d'E. coli dans les viandes et produits carnés consommés en restauration collective. Les technologies des laboratoires-n°1, département H.I.D.A.O.A., Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. L'aliment Vie. 65, 314-27, 2006.
- [3] C. Arvieux, Les toxi-infections alimentaires. Digest, 14 (6), 4-16, 1998.
- [4] G. Bornert, Le poulet sans salmonelles : Mythe ou réalité? Revue MédVét 151(12), 1083-1094, 2000.
- [5] Christiane Joffin, Jean-Noël Joffin (1993), Microbiologie alimentaire : Biologie technique 6 SCEREN-CRDP Aquitaine, 2010
- [6] Cours d'Hygiène et de microbiologie alimentaire. Institut Pasteur. Maroc, 1994
- [7] ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE, 1988  
Lutte contre les salmonelloses : le rôle de l'hygiène appliquée aux animaux et aux produits série de rapports techniques.  
Genève : OMS, 91p
- [8] DENNAI N., KARRATI B. et EL YACHIOUI M., (2000) : Bovins à l'abattoir : Une microbiologie fluctuante.  
VPC, 21 (6) : 191-196.
- [9] HEREDIA N., GARCIA S., ROJAS G. et SALAZAR L., (2001): Microbiological Condition of Ground Meat Retailed in Monterrey, Mexico.  
J. Food Prot., 64 (8): 1249-1251.
- [10] SYLLA P., (1994) : Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et commerciale des merguez vendues sur le marché dakarois.  
Th: Méd. vét; Dakar ; n°13, 81 pages.
- [11] ROSSET R., (1982) : Influence des règles d'hygiène sur la contamination microbiologique.  
In : Hyg. et Tech de la viande fraîche, Paris : éd CNRS, pp 273-287.
- [12] ROZIER J., CARLIER V., BOLNOT F., (1985) : Base microbiologiques de l'hygiène des aliments.  
Paris : éd Sapaic, 230 pages.
- [13] FOURNAUD J., GRAFFINO G., ROSSET R. et JACQUE R., (1978) : Contamination microbienne des carcasses à l'abattoir.  
Industries Alimentaires et Agricoles, 95 (4) : 273-282.
- [14] MESCLE F., ZUCCA J., (1988) : L'origine des microorganismes dans les aliments. Aspects microbiologiques de la sécurité et de la qualité alimentaire.  
Paris, éd Tec et Doc.Lavoisier, pp 9-14.

- [15] BROCARD R., DUMONT B L., FROUIN A. JACQUET J R., LEMAIRE J R. et ROSSET R., (1982) : Rapport de la commission « Viandes et produits carnés » du CNERNA sur les problèmes de l'hygiène et de la technologie des viandes fraîches. Paris : éd CNRS, pp 331-353.
- [16] MONIN G., (1993) : pH et qualités sensorielles de la viande de veau. VPC, 14 (2) : 43-47.
- [17] SHELEF A L., SAMEENA M., WEITAN. et WEBBER M L., (1997): Rapid Optical Measurements of microbial contamination in raw ground beef an effects of citrate and lactate. J. Food Prot., 60 (6) : 673-676.
- [18] CRAPLET C., (1966) : La viande de bovins, de l'étable à l'assiette du consommateur. Tome 8, livre 1, Paris : éd Vigot Frères, 486 pages.
- [19] CARTIER P., (1993) : Relation entre la contamination de la matière première et celle des produits finis dans la filière du haché industriel. VPC, 14 : 127-130.
- [20] BAUCHART D., AUROUSSEAU B., (1993) : Digestion et métabolisme des lipides chez le veau de boucherie : conséquences sur la composition en lipides des tissus. VPC, 14(6): 172-182.
- [21] AFNOR (Association Française de Normalisation), (1999) : Microbiologie alimentaire ; Méthodes horizontales. Paris : AFNOR, 663 pages.
- [22] Arrêté conjoint du Ministre de l'Agriculture et du développement rural, du Ministre de la santé et du Ministre de l'Industrie, du Commerce et Télécommunication n°624-04 du Safar 1425 (08 Avril 2004) relatif aux normes microbiologiques auxquelles doivent répondre les denrées alimentaires ou d'origine animale. Bulletin Officiel N°5214 du 20/05/2004. Maroc.
- [23] Morris G.J.Jr. (1996) Current trends in human diseases associated with foods of animal origin. JAVMA 12:2045-2047
- [24] Jouve J.L. (1990) Microbiologie alimentaire et filière viande. Viandes Prod. Carnés 11:207-213
- [25] Dicksons J.S. & Anderson M.E. (1992) Microbiological decontamination offood animal carcasses by washing and sanitizing systems: A review. J. Food Prat. 55:133-140
- [26] Plusquellec A. (1991) Viande et produits carnés. pp. 360- 378. In Bourgeois C.M., Leveau J.M. (ed.). Techniques d'analyse et de contrôle dans les IAA. Vol 3. Tec et Doc Lavoisier, Paris, France
- [27] Robinson R. K., Batt C. A., Patel P. D.(2000). Encyclopedia of Food Microbiology.
- [28] Brown JH, « Theobald Smith 1859-1934 », dans J Bacteriol, vol. 30, n° 1, 1935, p. 1-3 [texte intégral [archive] texte sur PMID [archive]].

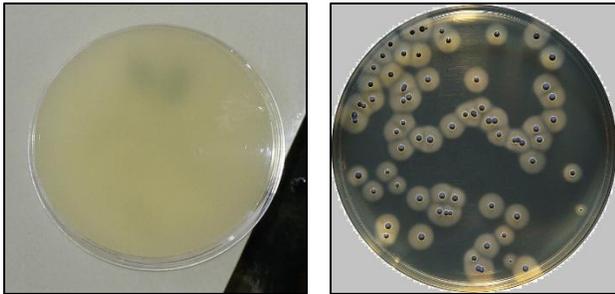
## Figures



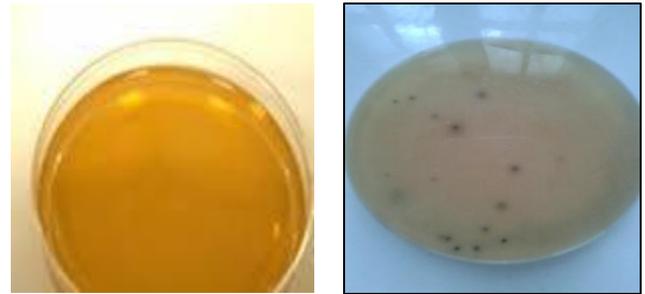
**Figure 1 : Aspect des germes totaux sur PCA avant et après l'incubation**



**Figure 2 : Aspect des coliformes fécaux sur DL avant et après l'incubation**



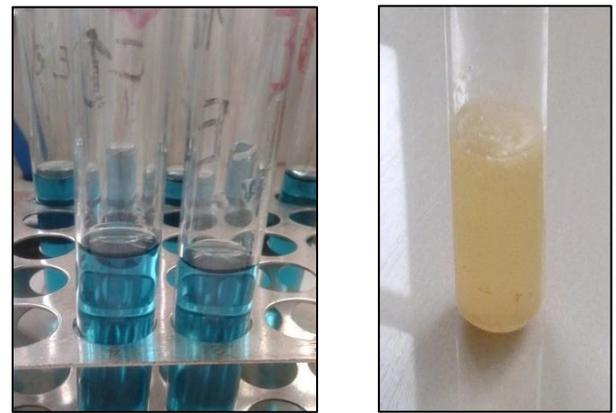
**Figure 3 : Aspect de Staphylocoque doré sur BP avant et après l'incubation**



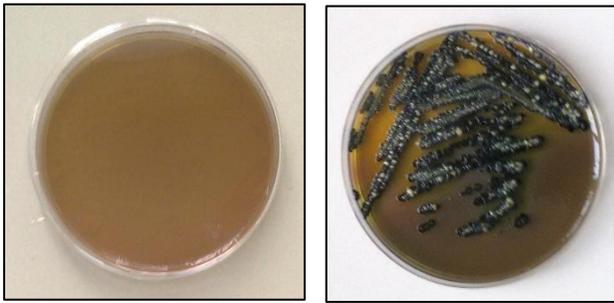
**Figure 4 : Aspect des Clostridiiums sur SPS avant et après l'incubation**



**Figure 5 : Pré-enrichissement de Salmonelle dans EPT**



**Figure 6 : Enrichissement de Salmonelle dans Rappaport-Vassiliadis avant et après l'incubation**



**Figure 7 : Isolement de Salmonelle dans Hektoen avant et après l'incubation**



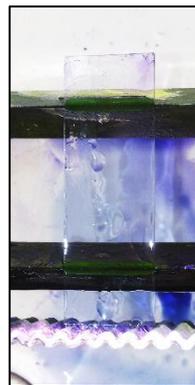
**Figure 9 : Haina-Kligler avant et après l'incubation**



**1- Violet de gentiane**



**2- Lugole**



**3- Décoloran**

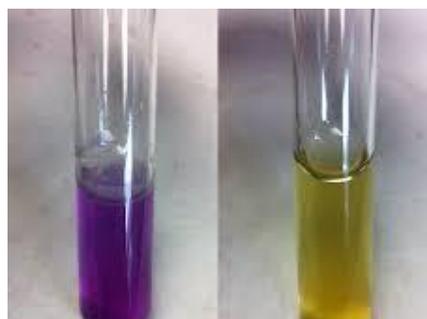


**4- Fushine**

**Figure 8 : Coloration de Gram**



**Figure 10 : Test ONPG négatif et positif**



**Figure 11 : Test LDC positif et négatif**



**Figure 12 : Test Oxydase**



Figure 17 : test d'Uréase



Figure 13 : Production d'indole  
Test négatif et positif



Figure 14 : Test au Rouge de méthyle  
positif et négatif



Figure 15 : Réaction de Voges- Proskauer



Figure 16 : Utilisation du citrate  
test positif et négatif