

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie

Microbiologie Alimentaire

Dr. Choubaila LEKSIR épouse MANSOUR



Polycopié de cours destiné aux étudiants de Licence :
Microbiologie

Année universitaire 2020/2021

Préface

Ce cours est le fruit d'une synthèse de plusieurs années d'études et d'enseignements. Il est conçu de manière simplifiée facile à assimiler par les étudiants, tout en maintenant les données nécessaires de base. Ce cours est destiné principalement aux étudiants de Licence en Tronc Commun en général et de troisième année de Spécialité Microbiologie en particulier. Ce document pourrait également être utile à renforcer les connaissances des étudiants de différentes spécialités (Sciences Médicales, Agro-alimentaire et Nutrition...) dans le domaine de la Microbiologie. Comme tout travail, il est perfectible.

Objectifs de l'enseignement

L'enseignement de la matière « Microbiologie Alimentaire » en tant qu'unité d'enseignement fondamental, permet aux étudiants de connaître et de comprendre les caractéristiques et le comportement des principaux micro-organismes intéressant le domaine agro-alimentaire ; les modes d'évaluation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires ; les capacités des micro-organismes à produire des substances utiles (Bio-industries) ; et enfin l'incidence des microorganismes sur la qualité sanitaire des aliments.

Contenu de la matière :

INTRODUCTION	01
CHAPITRE I. LES GRANDS GROUPES MICROBIENS INTÉRESSANT LA MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE	02
I.1. LES BACTÉRIES	02
I.1.1. Les bactéries lactiques	02
I.1.1.a. Caractères généraux des bactéries lactiques	02
I.1.1.b. Classification taxonomique des bactéries lactiques	04
I.1.1.c. Principaux genres	06
<u>Streptococcus</u>	06
<u>Lactobacillus</u>	06
<u>Lactococcus</u>	06
<u>Leuconostoc</u>	06
<u>Pediococcus</u>	07
I.1.1.d. Action des bactéries lactiques	07
i) Rôle technologique des bactéries lactiques	07
<u>Rôle sur la texture</u>	07
<u>Rôle sur les caractéristiques organoleptiques</u>	07
ii) Rôle d'altération	08
I.1.2. Les entérobactéries	08
I.1.2.a. caractères généraux des entérobactéries	08
I.1.2.b. Techniques d'isolement et d'identification	09
i) Recherche des entérobactéries totales	09
ii) Colimétrie en milieu liquide	09
iii) Colimétrie en milieu solide	09
iv) Recherche d'entérobactéries pathogènes	09
I.1.2.c. Techniques d'identification	09
I.1.3. Les <i>Pseudomonas</i> et les bactéries psychrotrophes	10
I.1.3.a. Principales bactéries psychrotrophes	10
i) Agents responsables de toxi-infections	10
ii) Agents d'altération	10
I.1.3.b. Influence des bactéries psychrotrophes sur la conservation des aliments	10
i) Protéolyse et lipolyse	11
I.1.4. Les bactéries acétiques	11
I.1.4.a. <i>Acetobacter aceti</i>	11
I.1.4.b. Fabrication du vinaigre par les bactéries acétiques	11

I.1.5. Les vibrions	12
I.1.5.a. Caractères généraux	12
I.1.5.b. Identification	12
I.1.6. <i>Brucella</i>	12
I.1.6.a. Populations exposées à la brucellose	13
I.1.6.b. Aliments impliqués	13
I.1.6.c. Conditions conduisant à la contamination des aliments par <i>Brucella</i>	13
I.1.3.d. Mesures de maîtrise et de prévention des brucelloses	13
I.1.7. Les staphylocoques	13
I.1.7.a. isolement, identification et étude du genre <i>Staphylococcus</i>	13
I.1.8. Les bactéries sporulées aérobies	14
I.1.8.a. Sources du danger	14
I.1.8.b. Voies de transmission	15
I.1.9. Les bactéries sporulées anaérobies	15
I.1.9.a. Pouvoir pathogène de <i>Clostridium botulinum</i>	15
I.1.9.b. Les toxines botuliniques	16
I.2. LES CHAMPIGNONS	16
I.2.1. Les moisissures	16
I.2.1.a. Effet nuisible des moisissures	17
I.2.2. Les levures	17
I.2.2.a. Fermentation alcoolique	18
I.2.1.b. Métabolisme respiratoire (Respiration aérobie)	18
I.3. LES VIRUS	18
CHAPITRE II. INFLUENCE DES TECHNIQUES DE LA FABRICATION SUR LES MICROORGANISMES	19
II.1. Destruction des microorganismes	19
II.1.1. Définitions	19
II.1.1.a. La Stérilisation	19
II.1.1.b. La Pasteurisation	19
II.1.1.c. L'Upérisation	20
II.1.2. Facteurs influençant la destruction des microorganismes	20
II.1.2.a. Sensibilité des micro-organismes à la chaleur	20
II.1.2.b. Composition de l'aliment	20
II.2. Effet des facteurs chimiques sur le développement des microorganismes	21
II.3. Stabilisation de la flore microbienne	22
II.3.1. Facteurs physiques (froid, congélation, lyophilisation)	22
II.3.1.1. Effet du froid sur les microorganismes	22
i) Psychrophiles et psychrotrophes	22
ii) Mésophiles	23
iii) Thermophiles	23
II.3.1.2. Effet de la congélation sur les microorganismes	23
II.3.1.3. Effet de la lyophilisation sur les microorganismes	24
II.3.2. Facteurs chimiques (bactériostatiques, fongistatiques)	24
II.3. Recherche des conditions de milieu optimal pour le développement de la flore	24
II.3.1. Effet de la structure des produits alimentaires sur le développement des microorganismes	25
II.3.2. Effet du pH sur le développement des microorganismes	25
II.3.3. Effet de l'activité de l'eau sur le développement des microorganismes	26
II.3.4. Effet du potentiel d'oxydoréduction et l'oxygène sur le développement des microorganismes	26

CHAPITRE III. LES PROBLÈMES MICROBIOLOGIQUES D'UNE USINE ALIMENTAIRE	28
III.1. Contamination initiale de la matière première	28
III.1.1. Contamination des aliments par les microorganismes de l'eau	28
III.1.2. Contamination des aliments par les microorganismes du sol	28
III.1.3. Contamination des aliments par les microorganismes de l'air	29
III.1.4. Contamination par les microorganismes présents sur les produits eux-mêmes	29
i) Microorganismes de surface des aliments	29
ii) Microorganismes du tube digestif des animaux	29
III.2. Contamination des aliments par l'usine et son environnement (Les accidents de fabrication)	30
III.2.1. Contamination par l'eau	30
III.2.2. Contamination par l'air	30
III.2.3. Contamination par les machines et ustensiles	30
III.2.4. Contamination par le personnel	31
	32
CHAPITRE IV. PROCÉDÉS BIOTECHNOLOGIQUES	33
IV.1. Principaux groupes de produits issus de procédés biotechnologiques	34
IV.1.1. Biomasse	34
IV.1.2. Métabolites microbiens	34
IV.1.3. Enzymes microbiennes	35
IV.1.4. Produits recombinants	35
IV.1.5. Produits fermentés	36
IV.2. Différents types de fermentations	36
IV.2.1. Fermentation alcoolique	40
IV.2.2. Fermentation lactique	40
IV.2.3. Notion de bioconversion ou procédé de transformation	41
IV.3. Étapes d'un procédé biotechnologique de fermentation	42
CHAPITRE V. LES INTOXICATIONS ET TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES	45
V.1. Pouvoir pathogène des agents infectieux	45
V.2. Botulisme	46
V.2.1. Pouvoir pathogène et symptomatologie	47
V.2.2. Ecologie de <i>Clostridium botulinum</i>	48
V.2.3. Aliments responsables	48
V.2.4. Mesures de prévention	48
V.3. Salmonellose	48
V.3.1. Pouvoir pathogène et symptomatologie	49
V.3.2. Ecologie des salmonelles	49
V.3.3. Aliments responsables	49
V.3.4. Moyens de prévention	50
V.4. Intoxication staphylococcique	50
V.4.1. Pouvoir pathogène et symptomatologie	50
V.4.2. Ecologie de <i>Staphylococcus aureus</i>	51
V.4.3. Aliments responsables	51
V.4.4. Moyens de prévention	51
V.5. Mycotoxines	52
V.6. Poisons d'aliments marins	52

CHAPITRE VI. Altération des aliments par les microorganismes	53
VI.1. Principaux groupes d'aliments	53
VI.2. Vue d'ensemble du métabolisme microbien	56
VI.2.1. Transfert d'énergie et oxydoréduction	58
VI.2.2. Respiration aérobie	59
VI.2.3. Respiration anaérobie	60
VI.2.4. Fermentation	61
VI.3. Relation : « aliments-microorganismes » et altération microbienne des aliments	62
VI.3.1. Facteurs de développement des microorganismes dans l'aliment	64
VI.3.1.a. Caractères propres à l'aliment	64
VI.3.1.b. Conditions physicochimiques	64
Références bibliographiques	67

Liste des figures

N°	Titre de la figure	Page
01	Micrographies électroniques de quelques bactéries lactiques et espèces apparentées.	03
02	Altération du pain par les champignons.	17
	Barèmes de stérilisation des aliments en fonction de leur pH.	21
03		
04	Répartition des microorganismes selon leur température optimale de multiplication.	23
05	Voies cataboliques chez les microorganismes : la fermentation (anaérobie) et la respiration cellulaire (aérobie).	37
06	Illustration simplifiée de la fermentation	37
07	Comparaison entre la respiration aérobie et la fermentation au sens biochimique	39
08	Fermentation alcoolique	40
09	Fermentation lactique. (a) Principales étapes de la fermentation homolactique ; (b) Principales étapes de la fermentation hétérolactique.	41
10	Réactions de bioconversion de l'éthanol en acide acétique par la bactérie <i>Acetobacter aceti</i>	42
11	Bioréacteurs industriels	43
12	Illustration schématique d'un bioprocédé typique de fermentation	43
13	Couplage énergétique et rôle de l'ATP dans le métabolisme	57
14	Synthèse et utilisation de l'ATP. (a) Formation d'une molécule d'ATP (b) Couplage d'énergie par transfert de phosphate.	58
15	Illustration simplifiée de la respiration aérobie chez les bactéries	60
16	Catabolisme de divers nutriments	63
17	Activité d'eau pour les principales catégories des aliments	65

Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Page
01	Exemples de produits issus de procédés biotechnologiques.	33
02	Comparaison de la respiration aérobie, de la respiration anaérobie et de la fermentation comme voies d'oxydation du glucose.	38
	Quelques exemples de bioconversions ou procédés de transformation industrielle.	42
03		
04	Catégories des denrées alimentaires auxquelles s'appliquent les dispositions du JORA n° 39 du 2 juillet 2017.	54
05	Produits de fermentation chez des espèces appartenant à divers genres microbiens.	61
06	Classes des microorganismes selon leur température optimale de croissance.	64
07	Classes des microorganismes selon leur tolérance aux variations de pH.	65
08	Classes des microorganismes selon leur besoin en oxygène.	66

INTRODUCTION

L'histoire entre l'Homme, les aliments et les microorganismes est longue et intéressante. Sans le savoir, l'Homme utilisait les microorganismes pour la conservation de certains aliments ; et sans le savoir aussi, l'homme était victime de différentes intoxications dues à la consommation d'aliments contaminés.

Durant une longue période, l'existence des organismes invisibles à l'œil nu était à peine soupçonnée. Par la suite, l'histoire de la microbiologie s'est clairement développée. C'est à partir de 1860, c'est à dire depuis les travaux de Pasteur sur la génération spontanée, la fermentation et les maladies que les effets des microorganismes ont commencé à être compris. Avant cela, l'être humain subissait sans comprendre les effets des microorganismes. Mais depuis lors, les connaissances en microbiologie ne cessent de se développer.

La microbiologie alimentaire est la branche de microbiologie qui s'intéresse à l'étude des micro-organismes qui habitent, forment ou contaminent les aliments. La microbiologie alimentaire a pour objet l'étude de l'origine et du rôle de ses microorganismes dans la fabrication, la conservation et l'altération des denrées alimentaires. Si l'étude des micro-organismes à l'origine de la détérioration des aliments est une composante essentielle de cette branche de la science agro-alimentaire, les bactéries utiles prennent désormais une importance croissante. Par ailleurs, les microorganismes sont absolument essentiels pour la production d'une grande variété d'aliments fermentés. La microbiologie alimentaire permet également d'étudier les intoxications alimentaires ainsi que les méthodes d'analyses et de détection des microorganismes dans différents types d'aliments.



CHAPITRE I. LES GRANDS GROUPES MICROBIENS INTÉRESSANT LA MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

I.1. LES BACTÉRIES

La sécurité alimentaire est un axe majeur de la microbiologie alimentaire. Les bactéries pathogènes et leurs toxines sont autant de sources possibles de contamination alimentaire. Toutes les bactéries ne sont pas pathogènes. Plusieurs types de bactéries bénéfiques sont utilisés dans l'alimentation humaine. Les bactéries utiles sont essentiellement des agents de fermentation lactique et acétique.

L'ensemble des bactéries intéressant la microbiologie alimentaire est hétérotrophe, certains sont saprophytes, d'autres sont des commensales de l'Homme et des animaux. Certaines espèces sont des parasites et possèdent un pouvoir pathogène.

Parmi les bactéries pathogènes certains ont un pouvoir infectieux et d'autres ont un pouvoir toxigène ; d'autres bactéries sont à caractère mixte provoquant ainsi des toxi-infections alimentaires.

I.1.1. Les bactéries lactiques

Depuis longtemps les bactéries lactiques sont utilisées pour la fabrication et la conservation des aliments. La plupart des bactéries lactiques participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires fermentés pour lesquelles elles jouent plusieurs rôles relatifs aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnels et sanitaires de l'aliment. C'est un groupe hétérogène non pathogène, définit pour la première fois par Orla-Jensen en 1919.

I.1.1.a. Caractères généraux des bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique.

Les bactéries lactiques ont pour principales caractéristiques d'être Gram positives, généralement immobiles, asporulées, anaérobies, mais aérotoleérantes pouvant ainsi survivre en présence d'oxygène. Elles ne possèdent pas de catalase, citrate réductase, cytochrome réductase. En outre elles ne liquéfiaient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, pas d'H₂S et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine.

Ce sont des bactéries sous forme de coques ou de bâtonnets. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On les distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acide lactique (C3) par glucose (C6) consommé. Chez les hétérofermentaires, seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C2 est produite (en général soit de l'éthanol soit de l'acide acétique) et une molécule d'oxygène. La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO₂.

Douze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*.

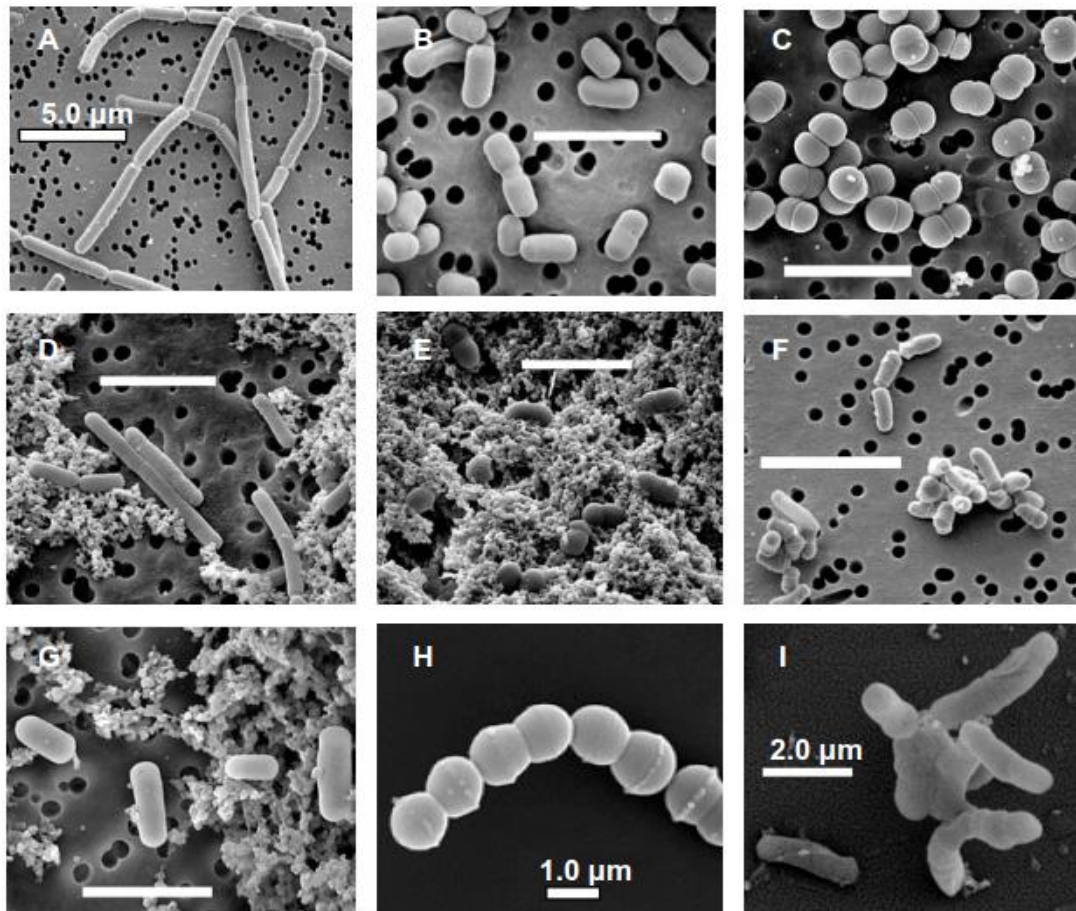


Figure 01 : Micrographies électroniques de quelques bactéries lactiques et espèces apparentées : A, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* ; B, *Lactobacillus brevis* ; C, *Pediococcus pentosaceus* ; D, *Lactobacillus casei* ; E, *Lactococcus lactis* ; F, *Brevibacterium linens* ; G, *Lactobacillus helveticus* ; H, *Streptococcus thermophilus* ; and I, *Bifidobacterium longum*. (Hutkins, 2006)

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, sur la peau, dans le système digestif, la muqueuse vaginale où elles accomplissent de nombreuses fonctions. Elles créent surtout un environnement hostile aux bactéries pathogènes. Elles survivent dans un milieu à faible A_w , et résistent à l'éthanol (10% à 15%) et au CO_2 .

En général, les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes, elles ont besoin de facteurs de croissance tels que les vitamines du groupe B, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Les milieux de culture des bactéries lactiques sont complexes. Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs. Les bactéries lactiques tolèrent les pH acides ($pH \leq 5$). A ces pH, beaucoup de bactéries communes ont leur croissance inhibée. Ces propriétés sont utilisées en agro-alimentaire pour transformer la matière tout en empêchant le développement de la

plupart des bactéries d'altération et des pathogènes. C'est pour cette raison que les produits fermentés sont considérés comme "à faible risque" vis-à-vis des pathogènes courants.

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques conduisant à un abaissement important du pH du milieu est largement utilisée dans l'industrie agroalimentaire (Fromage, yaourt etc...).

I.1.1.b. Classification taxonomique des bactéries lactiques

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles absolument reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'Union Internationale de Sociétés Microbiologiques.

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques.

Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification. Les nouveaux outils pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent souvent en cause ou complètent les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification moderne s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN16S ribosomiques etc.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres. Les révisions récentes de la taxonomie des bactéries lactiques sont présentées dans le manuel de Bergey de la systématique bactérienne (De Vos et *al.* 2009).

Le phylum Firmicutes comprend actuellement trois classes : Bacilli, Clostridia et Erysipelotrichi. Appartenant à la classe Bacilli, les bactéries lactiques sont divisées en plusieurs familles dont les principales sont :

- Famille des Lactobacillaceae comportant les genres *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus* ;
- Famille des Enterococcaceae incluant les genres *Enterococcus* et *Tetragenococcus* ;
- Famille des Leuconostocaceae comprenant *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des Streptococcaceae contenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Les principaux genres de bactéries lactiques associées aux aliments sont les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Historiquement, le genre *Bifidobacterium* était aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Dans le manuel de Bergey publié en 1957, les *Bifidobacterium* étaient répertoriées comme étant des *Lactobacillus bifidum*. Ces microorganismes, considérés souvent comme de

véritables bactéries lactiques, sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement Actinomycètes).

L'ancien genre *Streptococcus* était divisé au début en trois groupes : *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*, mais aujourd'hui, certaines bactéries lactiques qui étaient mobiles, ressemblant aux *Lactococcus*, ont formé un autre genre séparé : les *Vagococcus*. Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont globalement restés inchangés, mais quelques bactéries lactiques, auparavant incluses dans le genre *Lactobacillus*, forment maintenant le genre *Carnobacterium* qui regroupe des lactobacilles atypiques isolés de différents produits carnés. De plus, des souches de l'ancienne espèce *Pediococcus halophilus* ont été incluses dans le genre *Tetragenococcus* du fait de leur insensibilité à la Vancomycine. Un autre groupe de *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* a formé un nouveau genre, les *Weissella*, en raison de leurs différences phylogénétiques avec les autres lactobacilles hétérofermentaires. Les *Leuconostoc oenos*, les « *Leuconostoc* du vin », ont formé le genre *Oenococcus*.

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués. La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques. En outre, la division cellulaire en deux directions perpendiculaires sur un seul plan (autrefois décrite incorrectement comme « divisée en deux plans »), est utilisée comme la caractéristique clé dans la différenciation des coques. Les genres formant les tétrades sont les *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*.

Une autre caractéristique importante utilisée dans la différenciation des genres de bactéries lactiques est le type fermentaire du glucose dans des conditions standardisées, c'est-à-dire avec des concentrations non limitées du glucose et de facteurs de croissance (acides aminés, vitamines et les précurseurs d'acide nucléique), et une disponibilité limitée en oxygène. Sous ces conditions, les bactéries lactiques se divisent en deux groupes : homofermentaire et hétérofermentaire. Dans la pratique, le test de production de gaz à partir du glucose permettra de discriminer les groupes.

Les *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et un sous-groupe de *Lactobacillus* sont hétérofermentaires ; toutes les autres bactéries lactiques sont homofermentaires. La croissance à différentes températures est principalement utilisée pour distinguer les coques entre eux.

Les *Enterococcus* classiques croissent entre 10 °C et 45 °C, les *Lactococcus* et *Vagococcus* à 10 °C mais pas à 45 °C. En général, les *Streptococcus* ne se développent pas à 10 °C. Leur croissance à 45 °C dépend de l'espèce. La tolérance au sel peut également être utilisée pour différencier les *Enterococcus*, *Lactococcus/Vagococcus* et *Streptococcus*. Seul le genre *Tetragenococcus* tolère 18 % en NaCl. La tolérance aux conditions acides et/ou alcalines peut également être utilisée. Les *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* peuvent se développer à des pH plus élevés que les autres bactéries

lactiques. L'analyse de la composition en acides gras peut discriminer le genre *Vagococcus* avec les *Lactococcus*, *Vagococcus* et *Carnobacterium*. Les *Pediococcus* peuvent être confondus avec les *Aerococcus* à cause de leur similarité morphologique.

Toutefois, les *Pediococcus*, plus aérotolérants que les *Aerococcus*, et qui poussent bien en anaérobiose, sont en opposition avec la nature microaérophile des *Aerococcus*. Enfin, il faut noter qu'il existe des recouvrements entre les genres lactiques, le séquençage direct de l'ARNr 16S est considéré comme la méthode de classification la plus précise au niveau du genre.

I.1.1.c. Principaux genres

Streptococcus

Les cellules sont sous forme de Coccies, arrangées en chaînes. La fermentation est homolactique, ce genre comprend des espèces pathogènes pour l'homme (*Streptococcus pyogènes*), ou pour les animaux ou encore saprophyte de la cavité orale (*S. salivarius*). De nombreuses espèces sont utilisées dans l'industrie de fermentation laitière et sont des agents d'acidification et de coagulation de lait en fromagerie (fromages à pâte pressée cuite).

Lactobacillus

Ce sont des bacilles allongées en paires ou en chaînettes, catalase (-) mais certaines souches possèdent une pseudocatalase. Certaines espèces de lactobacilles sont homolactiques alors que d'autres sont hétérolactiques.

Certaines espèces sont responsables de verdissement de viande, d'autres altèrent les jus sucrés ou les produits conservés par les acides.

Les lactobacilles sont largement utilisés dans la fabrication d'aliments fermentés tels que les produits laitiers (fromages, yaourts), les viandes fermentées (saucissons), la fabrication de choucroute, de poissons et céréales fermentés.

Lactococcus

Coccies isolées du lait, des produits laitiers, et des végétaux. La principale espèce est *Lactococcus lactis*. Les lactocoques sont utilisés dans la fabrication du fromage blanc, à pâte molle ou pressée non cuite, et le kéfir.

Leuconostoc

Coccies associés en paires ou en courtes chaînettes, hétérofermentaires productrices de lactate, de l'éthanol et de CO₂.

Ce sont des mésophiles et se caractérisent par la production de citrate, de diacétyle, certaines espèces produisent des dextrans extracellulaires en présence de saccharose.

On distingue les espèces suivantes : *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*.

Ce genre n'est pas pathogène mais peut être responsable d'accidents de fabrication dans les produits alimentaires acides et sucrés. Il est isolé des produits laitiers et de végétaux. Dans les produits alimentaires, il peut être responsable de certaines manifestations comme la production d'ouverture dans les fromages suite à une production de CO₂. En plus de son utilisation dans l'industrie fromagère, le genre

Leuconostoc est très utilisé dans la fermentation des aliments d'origine végétale (choucroute, olives, vin, cidre).

Pediococcus

C'est un genre osmophile et acidophile, il est homolactique et c'est un contaminant des végétaux et agent de dégradation dans la brasserie.

I.1.1.d. Action des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques peuvent avoir : - Un rôle technologique positif.
- Un rôle négatif (altération des aliments).

i) Rôle technologique des bactéries lactiques

La flore lactique participe aux caractères organoleptiques, nutritionnels et sanitaires.

Rôle sur la texture

Dans les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un caillé à texture ferme qui est due à la baisse de pH suite à la fermentation lactique. Ce pH relativement bas agit sur les protéines du lait (caséines) et se traduit par la texture ferme du yaourt par exemple. La production d'exopolysaccharides par certaines bactéries lactiques contribue également à la consistance onctueuse des produits laitiers fermentés.

Rôle sur les caractéristiques organoleptiques

Par production d'acide lactique et autres acides qui donnent un caractère acide aux produits fermentés. Le diacyle et l'acétylaldéhyde sont responsables des saveurs caractéristiques du beurre et de yaourt.

Les composées issues de la protéolyse et des activités lipolytiques sont responsables de la formation d'arômes lors de l'affinage des fromages.

Rôle de conservation

Les bactéries lactiques sont capables d'inhiber les bactéries pathogènes par production d'acide lactique et d'autres acides et donc réduction de pH jusqu'à 4,5 (cas de yaourt), pH=4,85 (choucroute), pH=4,5 à 5,3 (saucissons) et également le développement des bactéries indésirables.

Le rôle de conservation par les bactéries lactiques se présente également par la production de bactériocines qui sont des peptides antimicrobiens synthétisés par de nombreuses souches. Les bactériocines ont un spectre d'action inhibant les espèces pathogènes. Elles ont un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide. Elles sont inactivées par les protéases mais elles sont thermostables.

Rôle sur les caractéristiques nutritionnelles

Les laits fermentés sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé. L'acide lactique produit par ces bactéries rééquilibre la valeur acide-base ainsi que les échanges d'oxygène et de minéraux avec les cellules.

Par ces qualités antiseptiques, l'acide lactique protège la muqueuse intestinale des attaques de bactéries pathogènes, en plus de son effet régulateur de la digestion.

Des études effectuées ont démontré également son effet sur l'activité du système immunitaire. Aussi l'ingestion du mélange de bifidobactéries et de *Lactobacillus acidophilus* provoque une augmentation des lymphocytes β dans le sang (propriétés probiotiques).

ii) Rôle d'altération

La flore lactique peut altérer les aliments par production de métabolites comme :

- L'acide lactique et d'autres acides organiques dans le lait cru à température ambiante ; cette acidification non contrôlée est responsable de son altération ;
- Production de CO_2 par les hétérolactiques et surtout sur les viandes conservées sous vide serait donc responsable du gonflage de l'emballage ;
- Production d' H_2O_2 qui sera responsable de verdissement des produits carnés conditionnés sous vide ;
- Production des produits aromatiques indésirables principalement par formation de peptides amers en production fromagère. Certaines souches possèdent des lipases responsables de l'oxydation des lipides et donnant ainsi naissance aux acides gras volatils, des cétones responsables des goûts indésirables de beurre, des crèmes et des viandes conservés sous vide.

I.1.2. Les entérobactéries

C'est un groupe important du point de vue sanitaire. Il comprend plusieurs genres et de nombreuses espèces qui sont des hôtes normaux de l'Homme et des animaux. Dans l'intestin terminal, ces bactéries représentent 10% de la flore totale (la majorité des bactéries sont des anaérobies strictes). Chez l'Homme *Escherichia Coli* prédomine par rapport aux autres genres. Ce sont des contaminants alimentaires très fréquents d'origine fécale. Certains sont dangereux (sans qu'elles génèrent par leur multiplication des substances toxiques (intoxication), soit des bactéries commensales pouvant devenir accidentellement infectieuses, soit qu'ils s'agit déjà de germes pathogène comme *Salmonella* et *Shigella*.

I.1.2.a. caractères généraux des entérobactéries

Ce sont des bacilles ou cocobacilles à Gram(-) oxydase(-) catalase(+) mobiles par cils péritriches ou immobiles, la capsule est présente chez *Klebsiella*, ils réduisent les nitrates en nitrites et fermentent le glucose, ils sont anaérobies facultatifs.

Les entérobactéries se multiplient facilement sur les milieux ordinaires à pH neutre. Les coliformes sont des entérobactéries qui fermentent le lactose avec production du gaz à 37 C°. Ce groupe n'est pas pathogène, sauf s'ils sont nombreux. Ils provoquent des intoxications alimentaires ; c'est un groupe utilisé comme indicateur de contamination fécale. Les coliformes fécaux thermotolérants sont un groupe qui est cultivé à des températures de l'ordre de 41°C à 44°C.

I.1.2.b. Techniques d'isolement et d'identification

Les techniques permettant l'isolement des entérobactéries d'origine intestinale sont décrites ci-après :

i) Recherche des entérobactéries totales

La gélose la plus utilisée est la gélose BPC, les colonies de diamètre de 0,5 mm environ correspondent aux entérobactéries.

Les entérobactéries lactose (+) sont jaunes sur la gélose BCP et les entérobactéries lactose (-) sont bleues sur BCP.

ii) Colimétrie en milieu liquide

Les milieux utilisés sont : le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) ou le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol (BCPL). L'incubation se fait à 37°C pendant 24h à 48h. Le virage de l'indicateur coloré et la production de gaz est un test positif de la présence des coliformes (Test de présomption) qui nécessite la confirmation.

iii) Colimétrie en milieu solide

Plusieurs milieux sont utilisés à savoir la gélose MAC CONKEY ou VRBG.

iv) Recherche d'entérobactéries pathogènes

Les entérobactéries pathogènes peuvent être recherchés par ensemencement direct sur milieu sélectif tel que SS (*Salmonella*, *Shigella*). Elles se représentent sous forme de colonies incolores transparentes avec parfois un centre noir (H₂S⁺).

Certaines souches de *Salmonella* et de coliformes apparaissent en rouge. Il existe d'autres milieux comme la gélose citratée de désoxycholate (DCL). La recherche se fait de préférence après enrichissement sur bouillon au sélénite de sodium ou sur le milieu de MULLER- KAUFFMANN pour les salmonelles et/ou le milieu de sélénite de sodium doublement concentrée pour *Shigella*.

Les colonies de types recherchés doivent être prélevées pour subir des tests d'identification.

I.1.2.c. Techniques d'identification

L'identification est basée sur les tests suivants :

- La mobilité ;
- Type fermentaire (Fermentation avec ou sans gaz) ;
- L'utilisation de sucres (glucose, saccharose, lactose, etc.) sur milieux KLIGLER et TSI pour l'utilisation des sucres et la production d'H₂S ;
- La dégradation de l'urée et la production d'indole (qui peut être étudiée sur milieu Fergusson) ;
- L'utilisation de citrate (étudié sur milieu Citrate de Simmons).
- Des études complémentaires comme la recherche de la β-galactosidase, lysine décarboxylase permettront une meilleure identification.

Remarque :

Une identification rapide et efficace est actuellement possible à travers l'utilisation de galeries Api 20. C'est un ensemble de cupules prêtes à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés. Les galeries Api utilisent plusieurs types de tests à savoir la recherche de l'utilisation de divers glucides (par fermentation ou respiration), production de métabolites ou par recherche directe d'une enzyme. Chaque tubule contient :

- un milieu de culture traditionnel ou modifié, additionné parfois d'un réactif (indicateur de pH, par exemple) ;
 - un substrat de l'enzyme recherchée (et éventuellement un inducteur de sa synthèse).
- Ils sont remplis d'une suspension bactérienne de densité calibrée.

I.1.3. Les *Pseudomonas* et les bactéries psychrotrophes

L'intérêt de la réfrigération est de ne pas induire des modifications sur les qualités organoleptiques des produits alimentaires, alors que les autres procédés physiques ne conservent pas toujours aux denrées alimentaires leur aspect frais.

Les micro-organismes psychrotrophes sont définis sur la base de leurs caractéristiques spécifiques en matière de thermosensibilité (ils peuvent se développer facilement à des températures $\leq 7\text{C}^\circ$) mais indépendamment de leur température optimale (Température optimale de l'ordre de 25C°).

I.1.3.a. Principales bactéries psychrotrophes

Les bactéries psychrotrophes peuvent être classées en 2 groupes en fonction de leurs effets, les agents responsables de toxi-infections et les agents d'altération :

i) Agents responsables de toxi-infections

Sur la base de la fréquence de contamination des produits alimentaires, la place dominante revient à : *Listeria monocytogenes* en tant que bactérie pathogène pour l'homme. Certaines souches de *salmonella* et d'*E. Coli* sont capables de s'accroître entre 5C° et 7C° .

ii) Agents d'altération

Le genre *Pseudomonas* possède la meilleure capacité de développement et présente une activité significative autour d'une température de 2°C .

Les genres : *Altéromonas*, *Flavobacterium*, *Shewanella* sont aussi fréquemment rencontrés dans les denrées alimentaires.

I.1.3.b. Influence des bactéries psychrotrophes sur la conservation des aliments

De nombreuses altérations des denrées alimentaires dues à l'action des bactéries psychrotrophes ont été décrites. Elles résultent de l'activité d'enzymes microbiennes exocellulaires affectant selon les cas, la consistance, la couleur, l'aspect, l'odeur et la saveur de produit.

i) Protéolyse et lipolyse

La protéolyse conduit à la formation d'acides aminés libres puis des produits de leur décarboxylation ou de leur désamination. Les amines volatiles et l'ammoniac formés sont à l'origine d'odeurs et de saveurs désagréables et rarement d'une toxicité de l'aliment.

Les bactéries psychrotrophes se caractérisent aussi par une grande activité lipolytique. Cette dernière conduit à la libération d'acides gras libres qui modifient les propriétés technologiques et gustatives des graisses avec apparition du goût de rancidité et favorise également le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés. De nombreuses bactéries psychrotrophes sont très facilement détruites par la chaleur, leur lipase et surtout leur protéase sont, par contre, pour la plupart du temps thermorésistantes, certaines résistent quelques dizaines de secondes à des températures de l'ordre de 140°C à 150°C.

ii) Autres types d'altération

Lors du processus hétérofermentaire, la formation du gaz et de cétone sont à l'origine de plusieurs modifications de caractéristiques organoleptiques d'aliments altérés par les psychrotrophes. L'apparition de coloration, d'odeur et de saveur anormale tel que le développement de la couleur bleue suite à une multiplication de *Pseudomonas aeruginosa* ou encore d'amertume par *Pseudomonas fluorescens* peuvent également survenir.

I.1.4. Les bactéries acétiques

Ce sont des bactéries aérobies Gram(-) capables de transformer l'éthanol en acide acétique afin de produire de l'énergie, durant la réaction de respiration cellulaire.

Les bactéries acétiques sont utilisées en œnologie. Elles permettent la « piqûre acétique » des vins, c'est-à-dire de la transformation de l'éthanol en acide acétique, entraînant ainsi une augmentation de l'acidité volatile. Elles sont également utilisées pour la transformation des vins en vinaigres.

Cette famille compte plusieurs genres à savoir : *Acetobacter*, *Gluconobacter* etc. Les *Acetobacter* sont rencontrés dans les fleurs, les fruits, le miel, les boissons alcoolisées (vin, bière, cidre, kéfir), le jus de canne à sucre, le vinaigre, le sol et les eaux.

I.1.4.a. Acetobacter aceti

Ce bacille Gram(-) aérobic transforme l'éthanol du vin ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$) en acide acétique ($\text{CH}_3\text{-COOH}$).

Acetobacter aceti se multiplie à la surface de boissons alcoolisées en formant un biofilm (pellicule ou voile microbien continu) appelé la « mère du vinaigre ».

I.1.4.b. Fabrication du vinaigre par les bactéries acétiques

Il y a plus de 5000 ans, on retrouve des traces de fabrication du vinaigre (ou vin-aigre littéralement) en Égypte et en Mésopotamie. A table, les Grecs et les Romains y trempent leur pain ou s'en servent pour assaisonner leurs plats. Il leur arrive de boire de l'eau vinaigrée, réputée plus digestive que l'eau pure.

Le vinaigre était également apprécié pour ses vertus thérapeutiques au Moyen Age. En France, le vinaigre est très prisé.

En 1865, les travaux de Louis Pasteur sur les fermentations décrivent le rôle des microorganismes dans les processus de la fermentation acétique.

Le vinaigre joue un rôle très important dans l'alimentation humaine depuis des temps immémoriaux car, au-delà de la confection de vinaigrettes et de marinades et l'usage condimentaire, ses qualités antiseptiques étaient très utiles avant l'apparition des réfrigérateurs pour la conservation des aliments et notamment celle de la viande.

I.1.5. Les vibrions

I.1.5.a. Caractères généraux

Le genre vibron comprend des espèces pathogènes qui peuvent contaminer les produits marins. Parmi les espèces communes on retrouve *Vibrio cholerae* responsable chez l'homme du choléra, une maladie épidémique contagieuse.

Les vibrions appartiennent à la famille des vibronacées qui sont des bactéries à Gram(-) incurvées et très mobiles. Ils possèdent une oxydase, une catalase, généralement une nitrate réductase, et un métabolisme fermentaire sans production de gaz. Ils sont aérobies anaérobies facultatifs, les colonies sont lisses, brillantes et leur principales caractéristiques c'est leur capacité de multiplication entre pH=7 et pH=9.

I.1.5.b. Identification

L'identification des vibrions repose sur les caractères biochimiques et sérologiques suivants :

- La production d'indole, l'utilisation de sucres ;
- L'utilisation du citrate sur milieu Citrate de Simmons, la production d'acétoïne ;
- La culture en eau peptonée additionnée de NaCl ;
- Le pouvoir protéolytique ;
- La recherche d'enzyme LDC, ODC ;
- Le pouvoir hémolytique et le pouvoir hémagglutinant.

I.1.6. Brucella

Brucella est un coccobacille à Gram(-) intra-cellulaire facultatif, de 0,5µm à 0,7µm de diamètre et 0,5µm à 1,5µm de longueur. Les cellules sont immobiles et ne forment pas de flagelles, de capsule ni de spores.

Le genre *Brucella* comprend huit espèces classées selon leur pouvoir pathogène et leur hôtes préférentiels (réservoir) dont 6 espèces pouvant être isolées de mammifères terrestres : *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis* et *Brucella neotomae*.

Les bactéries du genre *Brucella* sont aérobies strictes, mais certaines souches nécessitent une atmosphère enrichie en CO₂ (5 à 10%) pour leur croissance. Leur pH optimal de croissance varie entre 6,6 à 7,4. La température optimale de croissance est de 34°C, la plupart des souches se développant entre 20 et 40°C sur milieu adéquat.

I.1.6.a. Populations exposées à la brucellose

Les populations constituées soit des professionnels en contact avec les mammifères réservoirs et leurs produits, soit des populations consommatrices de lait cru ou de produits à base de lait cru, sont des populations exposées.

I.1.6.b. Aliments impliqués

Les principaux aliments incriminés de brucellose humaine sont le lait cru et les produits à base de lait cru (fromages frais et peu affinés, beurre etc.).

La consommation de viscères (très rarement de viandes) contaminés et insuffisamment cuits ou de fruits et légumes cultivés sur des sols traités par du fumier contaminé, peut également être à l'origine d'infections à *Brucella*.

I.1.6.c. Conditions conduisant à la contamination des aliments par *Brucella*

La contamination des produits laitiers frais concerne pour l'essentiel le fromage 'dit' frais (fromage à coagulation lactique) qui est responsable de la plupart des cas de contamination.

Dans le lait cru, la survie de *Brucella* est de 24 h à 25°C à 37°C, et de 48 h à 8°C et, d'au moins 2,5 ans à -40°C. La survie dans les fromages fermentés affinés semble assez courte. On ne connaît pas le temps de fermentation minimal nécessaire à leur destruction totale. La persistance des *Brucella* peut être beaucoup plus longue, la fermentation strictement lactique et de courte durée et la dessiccation favorisant leur survie.

I.1.3.d. Mesures de maîtrise et de prévention des brucelloses

La maîtrise des contaminations d'origine alimentaire dues à *Brucella* passe soit par la pasteurisation ou la stérilisation du lait, ou bien, par l'utilisation de lait cru provenant de troupeaux reconnus officiellement indemnes de brucellose.

Des précautions doivent être prises à titre individuel par tous ceux, qui par leur travail, entrent en contact avec des produits ou des animaux infectés : lavage des mains, port de gants, masques et lunettes et ne pas fumer sur les lieux de travail.

I.1.7. Les staphylocoques

Plusieurs espèces de la famille des staphylocoques sont actuellement bien identifiées, dont *Staphylococcus aureus*, est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires et de nombreuses infections humaines et animales.

C'est des coques à Gram(+), Catalase(+), associés en grappes, immobiles, aérobies-anaérobies facultatifs. Les staphylocoques se développent à pH compris entre 4,8 et 7,6 et supportent aussi des concentrations de sel élevées (10% (p/v) de NaCl) et une A_w de 0.86.

Staphylococcus aureus est mésophile, son intervalle de croissance varie de 7°C à 48°C ; l'optimum est de l'ordre de 20°C à 37°C. Les cellules sont détruites à 66°C en 12 minutes ou à 72°C en 15 secondes.

Les staphylocoques sont présents sur de nombreux sites. Ils sont capables de vivre :

- Comme saprophytes (dans l'environnement extérieur) ;
- Comme commensaux sur les épithéliums de l'homme et des animaux.

I.1.7.a. isolement, identification et étude du genre *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus est une bactérie qui se développe bien sur les milieux minimum (milieux de bases). C'est une bactérie mésophile (Température de croissance optimale 37 °C), neutrophile (pH optimal 7) et halophile (se développe à de fortes concentrations de NaCl). Elle est aussi relativement résistante aux inhibiteurs bactériens comme le cristal violet et le tellurite de potassium. *S. aureus* possède aussi de nombreuses résistances aux antibiotiques qui varient selon les souches.

Les staphylocoques sont recherchés et identifiés sur les milieux sélectifs tels que la gélose Chapman ou encore sur la gélose Baird Parker. Une identification biochimique est nécessaire pour confirmer l'identité des germes repérés.

I.1.8. Les bactéries sporulées aérobies

Ce sont de grands bacilles à Gram(+), groupés en chaînettes. La plupart sont des saprophytes du sol, de l'eau, de l'air et des plantes, comme *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*. *Bacillus cereus* peut se multiplier dans les aliments et y produire une entérotoxine qui provoque des diarrhées par un mécanisme similaire à celui de l'entérotoxine d'*Escherichia coli*.

Bacillus cereus est responsable de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques et d'intoxinations se traduisant par des symptômes émétiques. Les maladies à symptômes émétiques sont causées par l'ingestion d'une toxine, produite dans l'aliment au cours de la croissance de *B. cereus*. Les maladies à symptômes diarrhéiques seraient causées par l'ingestion de cellules et/ou de spores de *B. cereus*, suivie d'une production d'entérotoxines dans l'intestin.

I.1.8.a. Sources du danger

Bacillus cereus est retrouvé sous forme de spores dans le sol, à des concentrations de l'ordre de 10^4 à 10^5 spores par gramme de sol.

Les spores seraient dormantes dans le sol et se développeraient plutôt dans la faune du sol, par exemple dans le tube digestif d'insectes, d'arthropodes et de lombrics.

B. cereus pourrait être un commensal du tube digestif d'insecte et s'y développerait lorsque son hôte est affaibli. Des spores de *B. cereus* sont aussi présentes dans le tube digestif d'animaux à sang chaud. *B. cereus* peut être responsable, bien que rarement, de mammites chez les bovins et d'avortements chez les bovins et ovins. *B. thuringiensis*, qui est un pathogène d'insecte, est souvent présent dans les aliments comme *B. cereus* et peut causer les mêmes maladies que *B. cereus* chez l'Homme.

I.1.8.b. Voies de transmission

La principale voie de transmission de cette bactérie à l'Homme est alimentaire. En effet, de par son abondance dans le sol et la résistance de ses spores, *B. cereus* peut contaminer pratiquement toutes les catégories d'aliments et particulièrement les végétaux.

Des infections à *B. cereus*, différentes de celles transmises par les aliments ont été décrites, les portes d'entrée de l'infection dans ce cas-là sont principalement dues aux contaminations de plaies.

I.1.9. Les bactéries sporulées anaérobies

Les bacilles anaérobies sporulés appartiennent tous au genre *Clostridium*. La plupart d'entre eux décomposent les protéines ou produisent des toxines, et certaines font les deux. Leur habitat naturel est le sol ou le tube digestif des animaux et de l'Homme. La plupart des espèces sont saprophytes. Parmi les principaux pathogènes, on trouve *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens*.

Toutes les bactéries du genre *Clostridium* sont de gros bacilles à Gram(+) qui peuvent donner des spores plus larges que le diamètre des bacilles. La plupart des espèces sont mobiles et possèdent des flagelles péritriches.

Les bactéries du genre *Clostridium* ne poussent qu'en anaérobiose, soit sur boîtes de Petri placées dans des enceintes anaérobiques (jarres d'anaérobiose), soit dans des bouillons contenant des agents réducteurs. Dans ce dernier cas, la culture ne se fait qu'en profondeur. *Clostridium botulinum* est un bacille droit ou légèrement incurvé, sa T° optimale de croissance est de 34°C à 37 °C et les T° de toxinogénèse sont à peu les mêmes.

Les spores de *Clostridium botulinum* ont une thermo-résistance élevée. Elles résistent 3 à 5 heures au chauffage à 100°C et il faut chauffer au moins 15 minutes à 120°C pour les détruire (aspect fondamental dans l'industrie des conserves alimentaires).

Clostridium botulinum est l'agent du botulisme. C'est une bactérie tellurique que l'on peut trouver occasionnellement dans l'intestin des animaux. Ses spores peuvent contaminer les légumes, les fruits et d'autres produits alimentaires. Actuellement, le principal danger réside dans les conserves familiales, notamment des haricots verts, petits pois, les poissons fumés, les poissons frais gardés sous vide et le jambon cru.

I.1.9.a. Pouvoir pathogène de *Clostridium botulinum*

Le *botulisme* est une *intoxication* qui résulte de l'ingestion d'aliments contaminés par des spores de *C. botulinum* qui ont germé et ont produit des toxines. L'ingestion des aliments entraîne l'ingestion d'une quantité plus ou moins importante de toxines. L'incubation de la maladie est courte, 18 à 96 heures, elle est d'autant plus courte que la quantité de toxines absorbée est plus importante. Les troubles digestifs (nausées, vomissements et constipation) sont fréquents mais pas au premier plan. Selon la quantité de toxine ingérée, il y a des formes frustes et des formes mortelles (paralysie respiratoire et arrêt cardiaque) du botulisme.

I.1.9.b. Les toxines botuliniques

Il y a 7 variétés antigéniquement distinctes de toxines botuliniques. Les variétés A, B et E sont les plus couramment associées à la maladie humaine.

On devrait dire les toxines botuliniques et non pas la toxine botulinique. Les toxines botuliniques sont parmi les substances les plus toxiques connues : 1 mg contient plus de 20 millions de doses minima mortelles (DMM) pour la souris. Ce sont des neurotoxines qui agissent en inhibant la synthèse ou la libération d'acétylcholine au niveau des synapses et des plaques neuro-musculaires, d'où la paralysie flasque. Les toxines botuliniques sont de nature protéique. Elles sont antigéniques, peuvent être transformées en anatoxines et être neutralisées par des immunosérums (anti-toxines). Elles sont détruites par un chauffage de 10 minutes à 100°C.

Les toxines botuliniques sont synthétisées par la bactérie au cours de sa croissance sous forme inactive. Lors de la mort bactérienne, elle subit une protéolyse qui la met sous forme active.

I.2. LES CHAMPIGNONS

Les champignons sont des organismes eucaryotes apparentés aux végétaux, mais qui s'en distinguent, en particulier, par leur mode de nutrition non photosynthétique.

Les champignons ont des formes de vie très variées. Les plus simples sont unicellulaires, mais la plupart sont pluricellulaires. Ils se nourrissent des matières organiques de leur environnement en sécrétant des enzymes qui digèrent les divers composés organiques qui les entourent et les réduisent en petites molécules solubles. Les champignons sont présents dans le sol, les plantes, les débris végétaux, ils sont parasites de l'Homme, des animaux et des plantes.

La classification des champignons décrit quatre phylums (embranchements) principaux : les Oomycètes, les Zygomycètes, les Ascomycètes et les Basidiomycètes. Les moisissures et levures qui ont un grand intérêt en microbiologie alimentaire font partie des champignons.

I.2.1. Les moisissures

Ce sont des champignons microscopiques filamenteux contaminants fréquents des produits alimentaires, Ils sont saprophytes et dotés d'un grand pouvoir de dégradation. Certains espèces sont toxigènes alors que d'autres sont utilisées dans l'industrie (production d'enzymes, acides organiques et antibiotiques).

Les moisissures sont utilisées également pour la production d'une large gamme de fromages (fromages à pâtes molles à croûte fleurie, fromages à pâtes molles à croûte lavée, à pâtes persillées, fromages à pâtes pressées). Les espèces les plus couramment utilisés sont *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*.

I.2.1.a. Effet nuisible des moisissures

Le stockage prolongé dans des conditions mal contrôlées favorise le développement de microorganismes en particulier celui des moisissures d'où l'altération de la valeur nutritionnelle du produit ou encore sont responsables de maladies (allergies et mycoses) ou provoquent des intoxications (mycotoxines).

Le développement des moisissures et surtout d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, sur les grains des céréales et le pain s'accompagne de leur altération et de la modification de leur aspect, de leur odeur et de leur goût, libération d'acides gras et modification des protéines.

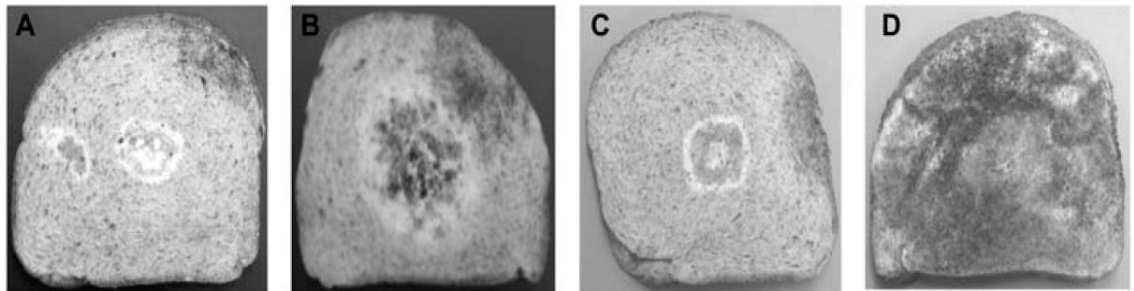


Figure 02 : Altération du pain par les champignons.

Penicillium commune (A) ; *Aspergillus niger* (B) ; *Penicillium roqueforti* (C) and *Rhizopus stolonifer* (D). (Hutkins, 2006)

Les poudres de lait mal stockées sont souvent contaminées par *Neurosporas*, les beurres rancissent sous l'effet d'*Aspergillus*.

Sur la viande et les viandes séchées se développent plusieurs moisissures qui colorent en brun les saucissons.

Les fruits sont souvent altérés par *penicillium italicum* qui est responsable de la pourriture bleue et verte des agrumes. Les jus de fruit insuffisamment stériles sont altérés par *Aspergillus fischeri* et d'autres moisissures thermorésistants.

I.2.2. Les levures

Le mot levure provient de mot latin *Levare* qui se traduit par levain en raison de leur capacité à produire du gaz carbonique (pendant la fermentation). Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires capables d'utiliser une grande variété de composés organiques. Ils sont isolés de l'eau, du sol, des végétaux, etc.

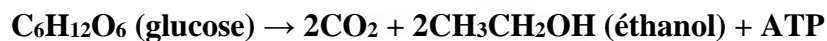
Les levures sont utilisées en alimentation surtout dans la panification et la vinification. Elles sont toujours employées pour produire des boissons alcoolisées, du glycérol, des enzymes, et des protéines de haute qualité. La production de certaines vitamines et solvants est également assurée par des levures. Elles participent à la revalorisation des déchets agricoles et industriels, et jouent parfois un rôle dans la dégradation des aliments.

Les levures sont aussi utilisées dans les procédés de fabrication de produits laitiers notamment les fromages et pour la production de certains laits fermentés (*Candida kéfir*, *Torulopsis kéfir*). Les levures interviennent essentiellement par production d'éthanol.

I.2.2.a. Fermentation alcoolique

Le terme courant de levure désigne généralement le genre *Saccharomyces* (levure de bière ou levure du boulanger). La fermentation alcoolique est le résultat d'une chaîne métabolique qui transforme des sucres fermentescibles par des levures en alcool et en dioxyde de carbone, avec dégagement de chaleur.

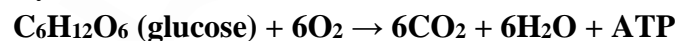
Tout en faisant ceci, elles peuvent créer des gammes de saveurs différentes de celles existant au départ. Durant la fermentation, les levures transforment le sucre en alcool et anhydride carbonique en s'alimentant avec des séries de sucres de plus en plus complexes, juste en brisant les molécules de sucre en d'autres composés qui leur permettent de se développer. D'abord au menu, on va trouver le glucose, avant de passer au maltose, puis au maltotriose. Selon la nature de la levure, ces sucres peuvent être taclés à différents taux, et pas toujours dans un ordre strict. Bien que les sucres expliquent la majorité de saveurs, les levures agissent sur divers autres composés, y compris des acides aminés et des acides gras, qui contribuent également aux saveurs.



I.2.1.b. Métabolisme respiratoire (Respiration aérobie)

Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux cellules de subir une multiplication avec un rendement cellulaire élevé (le rendement étant défini par le quotient de la quantité de cellules fabriquées par le substrat sucré consommé). En plus des sucres simples, certaines levures peuvent utiliser d'autres glucides (mono, di ou trisaccharides, voire des polysaccharides comme l'amidon).

Le métabolisme oxydatif est réalisé selon la réaction suivante :



I.3. LES VIRUS

Les virus ne peuvent se reproduire qu'à l'intérieur d'une cellule vivante. Ils parasitent aussi bien les êtres vivants pluricellulaire (animaux, plantes) que les unicellulaires (bactéries, etc.). Ils sont présents sur de nombreux produits alimentaires. On distingue les virus spécifiques aux bactéries (bactériophages) et les virus infectieux spécifiques des cellules animales.

Les bactériophages s'attaquent à la flore intestinale et provoquent des troubles plus au moins graves. On les retrouve sur les aliments supportant un grand nombre de bactéries-hôtes. Ils se transmettent par voie fécale-orale.

Les virus infectieux spécifiques des cellules animales se retrouvent sur certains produits alimentaires et se transmettent aussi par voie fécale-orale. Comme exemples de ses virus, on peut mentionner le virus de la poliomyélite *et le virus de l'hépatite*.

CHAPITRE II. INFLUENCE DES TECHNIQUES DE LA FABRICATION SUR LES MICROORGANISMES

Les microorganismes ont besoin d'eau, d'une source d'énergie, de l'azote, des sels minéraux, éventuellement de l'oxygène pour leur développement. Les plus exigeants parmi eux, ont également besoin de facteurs de croissance. Ainsi, les aliments se présentent comme un milieu idéal et favorable pour le développement des germes microbiens.

Cependant, malgré la présence de ces nutriments, le développement des microorganismes se trouve parfois contrarié par d'autres paramètres qui sont liés d'une part, aux caractéristiques physico-chimiques de l'aliment lui-même (pH, a_w , potentiel d'oxydo-réduction, etc.) et d'autre part, à l'environnement du produit alimentaire (Température, humidité, radiations électromagnétiques, etc.). Ces paramètres ont un effet sélectif sur la flore microbienne d'un aliment ; ils favorisent ou inhibent le développement de tels ou tels microorganismes.

Afin de maîtriser la qualité microbiologique des aliments, il est nécessaire de connaître l'effet de chaque paramètre sur le développement des microorganismes, mais aussi l'effet des interactions qui peuvent exister entre les différents paramètres.

II.1. Destruction des microorganismes

II.1.1. Définitions

II.1.1.a. La Stérilisation

C'est l'action de la chaleur permettant de détruire les micro-organismes présents sous formes végétatives ou sporulées ainsi que leurs toxines et enzymes à une température supérieure à 100°C (Le plus souvent située entre 100°C et 150°C).

La stérilisation d'un produit conditionné dans un récipient étanche s'appelle l'**appertisation**. Les produits obtenus sont des conserves. L'emballage des conserves porte la mention '*date limite d'utilisation optimale DLUO*' en mois ou années à température ambiante (souvent 3 ans).

II.1.1.b. La Pasteurisation

C'est l'action permettant de détruire les micro-organismes notamment pathogènes par chauffage à une température inférieure à 100°C (Étant moins sévère que la stérilisation, la destruction ici est *sélective*).

Applications : Lait, jus de fruits, bière ...etc.

C'est alors, un procédé de conservation limité. Il faut lui associer :

- Une réfrigération entre 4° et 6°C,
- Un conditionnement hermétiquement clos,
- Une atmosphère modifiée ou sous vide,
- Des conservateurs chimiques (acide, sucre, sel, acide ascorbique, nitrates, etc.)

L'emballage porte la mention '*date limite de consommation DLC*' de durée beaucoup moins longue que pour les aliments stérilisés à une température supérieure à 100°C.

La pasteurisation est utilisée pour :

- Un aliment dont les qualités organoleptiques sont dégradées par un chauffage trop sévère (foie gras, plats cuisinés, etc.) ;
- Lorsque seulement les micro-organismes pathogènes doivent être éliminés (lait) ;
- Un aliment au pH suffisamment bas pour limiter le développement des micro-organismes survivants (thermorésistants) comme par exemple les jus de fruits.

Il est important de signaler qu'il faut toujours prendre en considération le couple temps/température. En fonction des barèmes, plusieurs types de pasteurisation sont envisagés :

Basse pasteurisation : 60-65°C pendant 30 min ;

Haute pasteurisation : 70-75°C pendant 15 s ;

Flash pasteurisation : 90°C pendant quelques secondes.

II.1.1.c. L'Upérisation

C'est une technologie moderne. C'est justement grâce à ce procédé qu'on fabrique du lait UHT (Ultra Haute Température).

L'upérisation consiste à porter le lait instantanément à une température très élevée (140°C). Il est gardé à cette température pendant 2 à 5 secondes puis est refroidi tout aussi rapidement. La forte chaleur tue tous les microorganismes et un certain nombre d'enzymes sont inactivées mais la très courte durée de traitement permet de ne pas altérer le goût ainsi que la valeur nutritive du lait.

Le lait UHT se conserve plusieurs mois (3 mois environ) à température ambiante si l'emballage n'a pas été ouvert. Une fois l'emballage ouvert, le lait ne se conserve toutefois que trois jours au maximum à une température inférieure à 7°C. Comme les enzymes résistantes à la chaleur demeurent actives, la qualité du lait diminue au cours du temps, suite à quoi celui-ci peut prendre un goût amer, tourner ou se gélifier. Par upérisation, la valeur alimentaire demeure élevée, puisque seule une partie limitée des vitamines est détruite.

II.1.2. Facteurs influençant la destruction des microorganismes

II.1.2.a. Sensibilité des micro-organismes à la chaleur

L'expérience montre que la chaleur a une action létale sur les microorganismes. On distingue :

- La **flore thermosensible** qui est détruite à partir de 60°C (la plupart des microorganismes végétatifs, bactéries, levures, moisissures...etc.) ;
- La **flore thermorésistante** qui est détruite à partir de températures plus élevées (microcoques, spores ...etc.).

L'état physiologique conditionne la sensibilité : les microorganismes sont particulièrement plus sensibles en phase exponentielle de croissance.

II.1.2.b. Composition de l'aliment

La résistance des microorganismes est différente selon le milieu environnant :

- Une **A_w** faible diminue leur sensibilité. Pour stériliser les produits secs, on aura recours à d'autres traitements mieux adaptés comme les rayonnements ionisants.

- Le **pH** bas augmente leur sensibilité et la température de stérilisation est fonction du pH. Par exemple, *Clostridium botulinum* est incapable de se développer et de produire ses toxines au-dessous d'un pH de 4,5.

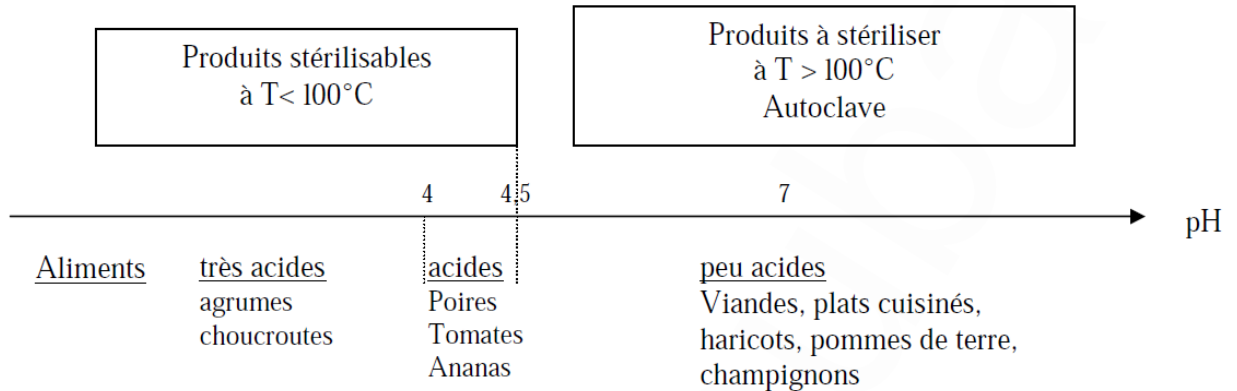


Figure 03 : Barèmes de stérilisation des aliments en fonction de leur pH

II.2. Effet des facteurs chimiques sur le développement des microorganismes

Les inhibiteurs de la croissance des microorganismes (antiseptiques, fongicides, antibiotiques) sont des molécules antimicrobiennes qui se trouvent naturellement dans certains aliments (végétaux, animaux), produites par certains microorganismes ou ajoutées volontairement par l'homme pour conserver les aliments. Dans ce dernier cas, ce sont considérées comme additifs alimentaires.

Certaines substances antimicrobiennes ont une action spécifique sur certains microorganismes (bactéricides, fongicides), alors que d'autres ont un spectre d'action beaucoup plus large.

Le lysozyme, qui se trouve naturellement dans les œufs et le lait, a une activité spécifiquement antibactérienne. Alors que les huiles essentielles ont un spectre plus large ; elles agissent comme antibactériennes et antifongiques.

Parmi les produits de la fermentation microbienne, on trouve l'acide lactique et l'acide acétique qui ont une activité bactérienne assez large. Ces substances sont aussi produites par synthèse chimique et sont utilisées comme additifs.

La gamme des substances utilisées comme additifs est très variée, de compositions chimiques et de modes d'action hétérogènes. Parmi ces additifs on peut citer :

- **L'anhydride sulfureux** (SO_2) et **les sulfites** (Sulfite de sodium Na_2SO_3 ; Bisulfite de sodium NaHSO_3 ; Disulfite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; Disulfite de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) qui sont connues pour leur activité inhibitrice surtout sur les bactéries et les moisissures ;

- **Les nitrates et nitrites de sodium et de potassium** (NaNO_3 , KNO_3 , NaNO_2 , KNO_2) qui sont connues pour leur action contre le *Clostridium* ;

- **L'acide propionique** qui est particulièrement actif contre les moisissures. L'acide propionique est aussi un produit de fermentation qu'on trouve naturellement dans les fromages à pâte cuite ;
- **L'anhydride carbonique** (CO₂) ; **Peroxyde d'oxygène** ou eau oxygénée (H₂O₂) etc.

II.3. Stabilisation de la flore microbienne

II.3.1. Facteurs physiques (froid, congélation, lyophilisation)

II.3.1.1. Effet du froid sur les microorganismes

La réfrigération est l'abaissement de la température à une valeur inférieure à la température ambiante mais supérieure au point de congélation du produit (l'eau reste liquide). La réfrigération :

- Diminue la vitesse de croissance (augmente le temps de doublement) ;
- Diminue la vitesse de démarrage (augmente la phase de latence) ;
- Augmente donc fortement la conservation des aliments (Par exemple : la viande se garde 1 jour à 22°C mais 10 j à 0°C). Les effets de la réfrigération sont plus forts sur mésophiles que sur psychrophiles.

La température est l'un des facteurs les plus importants qui agissent sur la croissance des microorganismes. En effet, chaque microorganisme a un domaine de température optimale favorisant son développement. Des températures situées en dehors de ce domaine gênent sa croissance.

En fonction de leur température optimale de croissance, on classe les microorganismes en plusieurs groupes dont les noms reflètent les divers domaines de tolérance thermique :

i) Psychrophiles et psychrotrophes

Les psychrophiles (tels que *Bacillus psychrophilus*) sont des microorganismes qui se développent à des températures allant de 0°C à 20°C avec un optimum de croissance à 15°C. Ce sont des microorganismes vraiment adaptés au froid ; on les rencontre peu dans le domaine de l'alimentaire mais plutôt dans les régions froides (comme les régions polaires).

Les microorganismes appartenant au groupe des psychrotrophes sont capables de se développer dans la plage de température allant de 0 à 35°C avec un optimum de croissance de 20°C à 35°C. C'est un groupe intermédiaire entre les psychrophiles et les mésophiles, et il est responsable des altérations microbiennes des aliments réfrigérés. Le groupe des psychrotrophes est représenté par de nombreuses bactéries dont les principaux genres sont *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Corynebacterium* et *Flavobacterium*. Notons aussi que les levures et moisissures sont pour la plupart psychrotrophes.

ii) Mésophiles

Les mésophiles se multiplient à des températures allant de 15°C à 45°C avec un optimum à 37°C. On les retrouve sur les aliments conservés à température ambiante ou dans les aliments réfrigérés lorsque la chaîne du froid a été rompue.

Les principaux genres et espèces bactériennes appartiennent au groupe des mésophiles. Ce sont les espèces communes et les espèces pathogènes pour l'homme et l'animal ; ils sont pour la plupart des saprophytes naturels.

Exemples de mésophiles : *Escherichia coli*, *Salmonelles*, *Staphylocoques* etc.

iii) Thermophiles

Les thermophiles sont les microorganismes qui se développent dans des températures allant de 45°C à 70°C avec un optimum à 55°C. On les retrouve dans le sol, l'eau et même dans les sources thermales. En milieux alimentaires, ils sont représentés surtout par les genres bactériens *Bacillus* et *Clostridium* et certaines moisissures (*Aspergillus*).

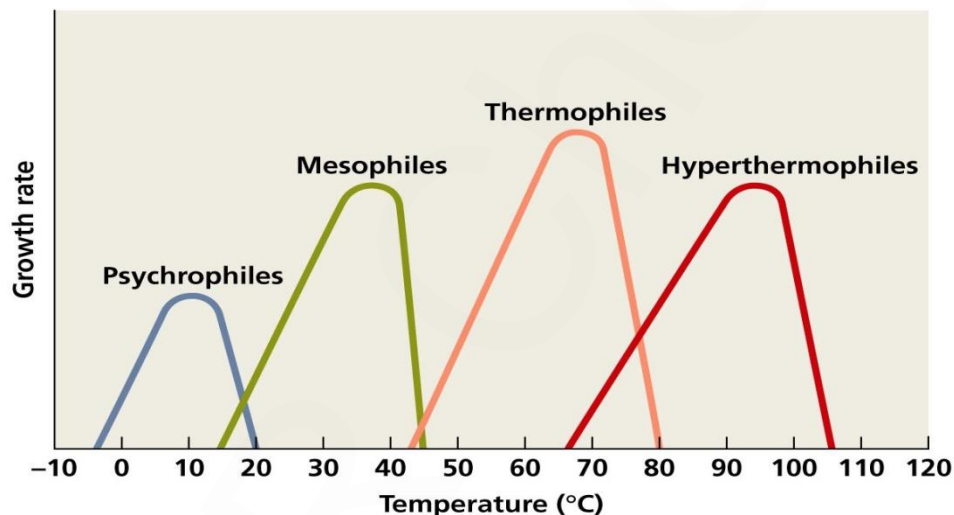


Figure 04 : Répartition des microorganismes selon leur température optimale de multiplication

II.3.1.2. Effet de la congélation sur les microorganismes

La congélation est l'abaissement de la température à une valeur inférieure au point de congélation de l'aliment (La température de congélation de l'eau pure est de zéro degré, mais elle est $-0,51^{\circ}\text{C}$ pour le lait, et $-1,4^{\circ}\text{C}$ pour la viande).

La congélation :

- Arrête la croissance bactérienne (L'eau libre disparaît, et les lipides membranaires se solidifient) ;
- Tue certaines bactéries (9 cellules Gram- sur 10), les coques et Gram positifs (+) résistent mieux. : Cet effet létal partiel et sélectif est dû à la différence de composition de la paroi bactériennes entre les Gram (+) et les Gram (-).

II.3.1.3. Effet de la lyophilisation sur les microorganismes

Ce procédé a été inventé en 1906 par les français Arsène d'Arsonval et F. Bordas au laboratoire de biophysique du Collège de France à Paris.

La lyophilisation, autrefois appelée cryodessiccation, consiste à déshydrater un produit préalablement surgelé, par sublimation. On commence par congeler le produit liquide, pâteux ou solide à des températures de l'ordre de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. On le soumet ensuite à une évaporation sous vide ou dessiccation primaire. Cela permet de faire passer l'eau contenue dans le produit directement de l'état solide à l'état gazeux.

On capture la vapeur d'eau ainsi produite par congélation, à l'aide d'un condenseur. Enfin, la dessiccation secondaire permet d'extraire par désorption les molécules d'eau piégées à la surface des produits séchés.

A la fin de ce cycle, le produit ne contient plus que 1% à 5% d'eau. La lyophilisation est une technique de déshydratation qui permet de stopper le développement des microorganismes pour une conservation à long terme.

La lyophilisation est un procédé permettant une conservation prolongée des bactéries comme les ferments lactiques par exemple. Cette technologie implique des changements de la température du produit assez agressifs pour les micro-organismes surtout lors de la phase de congélation, ce qui n'est pas sans conséquence pour les cellules. L'utilisation de cryoprotecteurs permet d'augmenter la survie des micro-organismes au cours du séchage.

II.3.2. Facteurs chimiques (bactériostatiques, fongistatiques)

Un bactériostatique est une substance qui inhibe la multiplication des bactéries sans les tuer. De hautes concentrations de la plupart des agents bactériostatiques sont également bactéricides, alors que les basses concentrations d'agents bactéricides ne sont pas bactériostatiques.

Ce groupe comprend les cyclines, les tetracyclines, les sulfamides, le triméthopime, le chloramphénicol, les macrolides et les lincosamides. Les fongistatiques sont des agents antifongiques qui inhibent la croissance des champignons et qui sont également utilisés en industrie agro-alimentaire.

II.3. Recherche des conditions de milieu optimal pour le développement de la flore

Dans un milieu complexe comme les aliments, la croissance des microorganismes n'est pas soumise à un seul facteur mais plutôt à plusieurs paramètres endogènes (pH, a_w , présence des inhibiteurs, facteurs de croissance, ...etc.) et exogènes (température, humidité, etc.). Il est donc utile de considérer l'effet combiné de l'ensemble des paramètres sur le développement des microorganismes. L'exploitation de l'effet combiné de plusieurs paramètres permet de mieux maîtriser la qualité microbiologique de l'aliment et l'orientation du métabolisme microbien.

II.3.1. Effet de la structure des produits alimentaires sur le développement des microorganismes

Les produits alimentaires non transformés sont souvent protégés du milieu extérieur par des enveloppes (téguments, peau, coquille, etc.) qui constituent une barrière naturelle à la pénétration des microorganismes. Suite aux opérations de récolte, stockage et transformation des produits alimentaires frais (récolte mécanique, congélation-décongélation, broyage, malaxage etc.), on assiste à la dégradation de ces enveloppes protectrices ce qui favorise la prolifération microbienne.

Certains produits alimentaires, comme le lait, n'ont pas de structure cellulaire et sont donc plus vulnérables que les autres.

II.3.2. Effet du pH sur le développement des microorganismes

Lorsqu'un acide est ajouté à l'eau, la concentration en ions hydrogène $[H^+]$ augmente et est supérieure à la concentration des mêmes ions dans l'eau pure. Ainsi, plus la solution est acide (plus la concentration en ions H^+ est élevée), plus le pH est faible, et réciproquement. La valeur de pH peut varier de 0 à 14 ; la valeur 7 correspond à un pH neutre (pH de l'eau pure).

Les microorganismes peuvent se développer sur une large gamme de pH allant de 2 à 11. Cependant, la résistance microbienne au pH est très variable et diffère d'un groupe microbien à l'autre. En fonction de leur pH optimal de croissance, on classe les microorganismes en trois groupes :

1. *Acidophiles* : Microorganismes ayant un pH optimal de croissance entre 1 et 5,5.
 2. *Neutrophiles* : Microorganismes ayant un pH optimal de croissance entre 5,5 et 8.
 3. *Alcalophiles* : Microorganismes ayant un pH optimal de croissance entre 8 et 11.
- Les bactéries, se développent, d'une manière générale mieux sur des milieux dont le pH est proche de la neutralité (6 à 7,5). Certaines bactéries, comme les bactéries lactiques et les bactéries acétiques, peuvent se développer même à des pH inférieurs à 4.

La diminution du pH affecte aussi la thermorésistance des spores ; on considère qu'en dessous de pH 4,5, la thermorésistance des spores bactériennes est nulle.

Les levures et moisissures sont généralement acido-résistants ; leur pH optimum de croissance se situe entre 4 et 6 avec des valeurs extrêmes de 2 à 9 pour les levures et 2 à 11 pour les moisissures.

En fonction du pH, on divise les produits alimentaires en produits faiblement acides ayant un pH supérieur à 4,5 et les produits acides ayant un pH inférieur à 4,5. Cette classification est basée sur le fait que les germes pathogènes ne peuvent se développer dans les aliments ayant un pH au-dessous de 4,5.

La stabilisation des produits acides ne nécessite qu'un faible traitement thermique pour les débarrasser des germes d'altération (levures, moisissures, bactéries). Par contre, les produits alimentaires faiblement acides nécessitent, pour leur stabilisation, un traitement de stérilisation pour les débarrasser des germes pathogènes et d'altération, y compris les spores bactériennes.

Le pH des aliments dépend des quantités de substances acides ou basiques présentes, mais aussi de l'effet tampon du produit, lequel est surtout lié à la teneur en protéines. Les produits d'origine végétale sont souvent acides (pH de 2 à 5), alors que les produits d'origine animale ont généralement un pH proche de la neutralité (6 à 7). Ce pH joue un rôle déterminant dans la spécificité de la flore microbienne de chaque aliment.

II.3.3. Effet de l'activité de l'eau sur le développement des microorganismes

L'activité de l'eau (a_w) indique la disponibilité de l'eau d'un milieu pour des réactions chimiques, biochimiques, un changement d'état ou un transfert au travers d'une membrane semi perméable.

L'activité de l'eau (a_w) correspond au rapport entre la pression de vapeur d'eau de l'aliment (pression de vapeur d'eau à la surface du produit) et la pression de vapeur de l'eau pure à la même température θ° .

Les bactéries ne peuvent se développer sur les produits alimentaires ayant une a_w inférieure à 0,90. Les moisissures et les levures sont inhibés respectivement vers une a_w de 0,7 et 0,8 sauf certaines moisissures et levures osmophiles qui peuvent se développer jusqu'à des a_w de 0,6. Dans la plupart des cas, l' a_w limite de croissance d'un microorganisme est inférieure à l' a_w limite nécessaire pour la production de sa toxine.

Les produits alimentaires frais (fruits, légumes, viandes, ...etc.) ont généralement une a_w de 0,97 à 0,99. Ils sont donc un milieu favorable pour le développement de tous les microorganismes à moins qu'ils existent d'autres facteurs qui limitent leur croissance. C'est le cas, par exemple, des fruits et légumes qui ont généralement un pH acide favorisant le développement d'une flore fongique (levures et moisissures).

Sur les produits alimentaires ayant une faible a_w , comme le pain et pâtisseries, on constate généralement le développement des moisissures.

II.3.4. Effet du potentiel d'oxydoréduction et l'oxygène sur le développement des microorganismes

Le potentiel d'oxydoréduction (E_h exprimé en volt) mesure la facilité avec laquelle un milieu perd ou gagne des électrons. Un milieu est oxydant quand il capte des électrons (son E_h est positif) ; et il est réducteur quand il perd des électrons (son E_h est négatif). Les produits alimentaires sont généralement des milieux réducteurs. Ceci est dû à la présence, dans les aliments, des substances fortement hydrogénées, des radicaux $-SH$, des sucres réducteurs, ou d'autres composés tels que de l'acide ascorbique (vitamine C) ou des tocophérols (vitamine E). L'effet oxydant d'un aliment est dû essentiellement à la présence de l'oxygène atmosphérique, soit en surface (viandes) ou dans la masse (végétaux : grâce aux parenchymes lacuneux et aux stomates).

En fonction de leurs exigences en oxygène, on classe les microorganismes en quatre principales catégories :

1- *Les aérobies stricts* : Sont les microorganismes qui ne peuvent se développer qu'en présence de l'oxygène (Respiration). C'est des microorganismes qui se multiplient à la surface des aliments et sur les farines. Les exemples les plus courants sont les moisissures, quelques levures, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*...

2- *Les aérobies facultatifs* se multiplient en présence ou absence d'O₂ (Respiration/fermentation). C'est le cas de la plupart des levures, les enterobactéries, *Staphylococcus*... Ceux sont des contaminants fréquents des produits végétaux, surfaces des viandes et fromages, viandes hachées...

3- *Les anaérobies stricts* : Sont les microorganismes qui se multiplient en absence d'oxygène, tels que *Clostridium*, *Bacteroides* et *Propionibacterium*... qui contaminent principalement les conserves.

4- *Les micro-aérophiles (Aéro-tolérants)* (Comme : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, ...) : Sont les microorganismes qui tolèrent l'oxygène et qui ne peuvent se développer qu'en présence de faible quantité d'oxygène. C'est des microorganismes qui fermentent les aliments tels que les fromages, les produits laitiers et les viandes (en profondeur). Le meilleur exemple à citer est celui des bactéries lactiques.

CHAPITRE III. LES PROBLÈMES MICROBIOLOGIQUES D'UNE USINE ALIMENTAIRE

Dans les écosystèmes naturels, les microorganismes sont présents partout, dans l'air, le sol et l'eau. Ils sont également présents sur l'Homme lui-même et sur tous les êtres vivants animaux et végétaux. De ce fait, tout produit alimentaire transformé ou non peut être contaminé par des microorganismes.

La contamination des denrées alimentaires peut avoir un effet plus ou moins grave sur la qualité du produit et sur la santé du consommateur. Elle peut être à l'origine d'une altération du produit, lui faisant perdre ses caractéristiques organoleptiques et/ou commerciales ; et parfois la cause d'intoxications ou toxico-infections graves.

L'origine des microorganismes qu'on retrouve dans les aliments dépend d'une part, de l'environnement de la production de la matière première (sol, air, eau) et d'autre part, des conditions de sa manipulation (récolte ou capture, transport etc.) et sa transformation (machines, personnel, traitements de stabilisation...) en produit fini.

III.1. Contamination initiale de la matière première

La contamination initiale de la matière première alimentaire se fait par le produit lui-même et par l'environnement duquel il provient, à savoir l'eau, le sol, et l'air.

III.1.1. Contamination des aliments par les microorganismes de l'eau

L'eau contient en suspension une charge microbienne diverse. Les germes hydriques sont surtout des bactéries provenant du sol (*Micrococcus*, *Pseudomonas*, ...) ou des matières fécales humaines ou animales (*Entérobactéries*, *Entérocoques*, ...). Ces bactéries sont souvent des germes d'altération et parfois pathogènes pour l'Homme (*Salmonelles*, *Shigelles*...). Les moisissures comme *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, peuvent aussi être présentes dans l'eau, et sont souvent des germes d'altération des aliments. Les levures, par contre, sont rarement rencontrées et interviennent donc peu dans la contamination des aliments par les microorganismes de l'eau.

Les aliments d'origine maritime peuvent être contaminés par les germes de l'eau de mer (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, ...). Généralement ces microorganismes ne sont pas pathogènes. Cependant, ils peuvent être à l'origine des altérations du poisson après capture.

III.1.2. Contamination des aliments par les microorganismes du sol

Vu l'interaction qui existe entre l'eau et le sol, on retrouve dans ce dernier les microorganismes qu'on a cités pour l'eau. Notons toutefois l'importance du *Clostridium* parmi les germes du sol.

Les produits d'origine végétale (fruits, légumes, etc.) sont les plus exposés aux contaminations par les microorganismes du sol. Les contaminants peuvent être véhiculés par l'eau d'irrigation, le vent, les insectes et les oiseaux.

III.1.3. Contamination des aliments par les microorganismes de l'air

L'air contient un très grand nombre de cellules microbiennes. Ce sont surtout des bactéries, parfois des moisissures (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*...) et rarement des levures.

Les bactéries les plus rencontrées dans l'air sont les *Micrococcus* et les bactéries sporulantes ; les germes pathogènes sont généralement absents.

Les produits les plus exposés à la contamination par les microorganismes de l'air sont ceux préparés en contact direct avec l'air comme les fruits, légumes, viandes, etc.

III.1.4. Contamination par les microorganismes présents sur les produits eux-mêmes

On peut distinguer deux types de microorganismes présents naturellement dans un aliment : les microorganismes de surface et les microorganismes du tube digestif des animaux.

i) Microorganismes de surface des aliments

Les animaux et les végétaux vivants contiennent sur leur surface (peau des animaux, enveloppes des végétaux, coquilles d'œufs, etc.) une charge importante de microorganismes. Dans les conditions normales, cette surface joue le rôle d'une barrière qui empêche la pénétration des germes à l'intérieur des produits.

Après la mort des cellules, leur enveloppe ne joue plus son rôle de protection à cause des dégradations qu'elle a subies, que ça soient chimiques, enzymatiques ou mécaniques (découpe, broyage, pressage, etc.). Ainsi, les produits peuvent être contaminés par les microorganismes se trouvant sur leur surface.

Le lait peut être également souillé par les microorganismes se trouvant sur les mamelles. De même, les fruits et légumes endommagés suite aux opérations de cueillette sont contaminés par les germes se trouvant naturellement sur leur surface.

Les microorganismes qu'on retrouve sur la surface des aliments sont ceux habituellement rencontrés dans le sol, l'air et l'eau. Ce sont donc des bactéries (*Micrococcus*, *Enterobacter*,...), des moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, ...) et aussi des levures (*Saccharomyces*, ...).

ii) Microorganismes du tube digestif des animaux

Les microorganismes présents naturellement dans le système digestif sont généralement des bactéries telles que les Entérobactéries (*Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, ...), les Entérocoques (*Streptococcus*, ...) et divers autres (*Staphylococcus*, *Lactobacillus*, ...). Les moisissures sont peu représentées et parmi les levures, le genre *Candida* est le plus fréquent.

Les viscères sont les principales sources de contamination des viandes et poissons.

La contamination des tissus musculaires se fait par migration des microorganismes à travers le système lymphatique et est facilité par les opérations de découpe et lavage des carcasses.

III.2. Contamination des aliments par l'usine et son environnement (Les accidents de fabrication)

Lors des opérations des traitements de transformation des aliments, ces produits sont contaminés par les microorganismes de l'environnement de l'usine. Les produits alimentaires sont donc de nouveau contaminés par les germes de l'eau, du sol et de l'air auxquels s'ajoutent d'autres facteurs de contamination et qui sont propres à l'usine (surfaces, machines, ustensiles, personnel, etc.).

Ces contaminations entraînent la diversité de la flore microbienne rencontrée sur les aliments, mais qui reste toujours spécifique à chaque produit vu les caractéristiques physico-chimiques qu'il possède.

Ces caractéristiques ont un rôle déterminant sur le développement ou l'inhibition d'une telle ou telle flore microbienne.

III.2.1. Contamination par l'eau

Outre son utilisation comme ingrédient dans la préparation des aliments, l'eau est utilisée dans plusieurs procédés agroalimentaires : Lavage, fluide de transport, refroidissement, nettoyage et désinfection, etc.

Lorsque l'eau utilisée est de mauvaise qualité microbiologique, elle est une source importante de contamination des produits alimentaires. L'eau de refroidissement, par exemple, est le responsable majeure de la contamination des boîtes de conserves stérilisées, mais mal serties.

III.2.2. Contamination par l'air

L'air est une source importante de contamination des aliments qui sont manipulés à l'air libre. La filtration de l'air et le travail sous atmosphère contrôlée, réduit considérablement la contamination des aliments par les microorganismes de l'air.

III.2.3. Contamination par les machines et ustensiles

Les machines (broyeurs, malaxeurs, etc.) et ustensiles (couteaux, etc.) sont aussi une source importante de contamination des aliments au cours de leur préparation.

Les germes véhiculés par les équipements et les ustensiles sont généralement les contaminants divers des aliments. Ces germes se multiplient en présence des débris des aliments qui restent adhérents aux machines. C'est pourquoi les plans de nettoyage et désinfection des unités agroindustrielles ne doivent pas se contenter à une désinfection superficielle des équipements, mais ils doivent prévoir aussi le démontage des machines et le nettoyage et désinfection des pièces, et ce avec une fréquence suffisante.

III.2.4. Contamination par le personnel

La contamination des aliments au cours de leur transformation par le personnel est aussi importante que leur contamination par l'eau, l'air et les machines.

Les microorganismes véhiculés par le personnel sont ceux qui existent naturellement sur le corps humain ou qui peuvent provenir des matières premières contaminées que le personnel manipule. Aussi, il est important de noter que le personnel peut être une source importante de contaminants fécaux (*Escherichia*, *Staphylococcus*, ...). Pour la maîtrise de ce genre de contaminations des aliments, il est essentiel que le personnel respecte les bonnes pratiques d'hygiène corporelle.

A retenir !

La flore microbienne présente sur le produit fini est la résultante de son historique. La matière première subit plusieurs contaminations ; une contamination initiale avant qu'elle arrive à l'usine et une autre contamination pendant sa transformation. Le produit subit également plusieurs traitements qui modifient ses caractéristiques physico-chimiques en plus des traitements de stabilisation. Tous ces traitements aboutissent à un produit fini avec une charge microbienne spécifique.

Le rôle de l'industriel agroalimentaire est de choisir les matières premières et les procédés qui conviennent afin que le produit fabriqué soit sûr et conforme aux exigences qui le concernent.

CHAPITRE IV. PROCÉDÉS BIOTECHNOLOGIQUES

Un procédé biotechnologique est la mise en œuvre à grande échelle, par le biais des techniques de fermentation contrôlée, du matériel microbiologique tels que les bactéries, les levures et les moisissures, pour une production d'une large gamme de produits comme les médicaments, les aliments et additifs alimentaires et autres produits d'usage courant. Les procédés biotechnologiques sont donc associés à un procédé industriel permettant, dans des conditions de rentabilité économique, l'obtention de grandes quantités de "produits d'intérêt" nécessaires à la satisfaction de la demande d'un marché préalablement identifié.

Les procédés biotechnologiques jouent un rôle essentiel dans les industries agroalimentaires, chimiques et pharmaceutiques. Les opérations unitaires mises en œuvre dans les bioprocédés utilisent des cellules microbiennes, animales ou végétales et des composants de cellules tels que les enzymes pour fabriquer de nouveaux produits ou détruire les déchets dangereux. L'utilisation de micro-organismes pour la production d'aliments fermentés a ses origines dans l'antiquité. Depuis lors, des bioprocédés ont été développées pour fabriquer une vaste gamme de produits commerciaux tels que l'alcool industriel et les solvants organiques ou bien encore les produits raffinés plus coûteux comme les antibiotiques, les protéines thérapeutiques et les vaccins. Les enzymes et les cellules vivantes qui sont particulièrement utiles d'un point de vue industriel (comme l'amylase et la levure de boulangerie) sont également des produits commerciaux de bioprocédés.

L'homme a toujours cherché à exploiter les capacités des cellules microbiennes à produire des métabolites, ceci est étroitement lié aux progrès scientifiques dans les domaines de la microbiologie, la biochimie, le génie génétique et la physiologie cellulaire. Les découvertes dans ces domaines sont en pleine expansion. Des outils de la biotechnologie moderne, telles que l'ADN recombinant, les sondes géniques, la fusion des cellules et la culture de tissus offrent beaucoup d'opportunités pour le développement de nouveaux produits et l'amélioration du rendement des méthodes de production de métabolites annonçant une révolution dans le rôle de la biologie dans l'industrie.

Tableau 01 : Exemples de produits issus de procédés biotechnologiques

Produits et métabolites synthétisés	Organismes utilisés
Biomasse Levure de bière Ferments lactiques Probiotiques	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>
Enzymes α amylase pectinase protéase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus</i> spp.
Vitamines B2 B12	<i>Eremothecium ashbyi</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i> ; <i>Propionibacterium shermanii</i>
Acides aminés Acide glutamique Lysine ; Arginine	<i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Brevibacterium flavum</i>
Antibiotiques Pénicilline Tétracycline	<i>Penicillium notanum</i> <i>Streptomyces aureofaciens</i>
Protéines d'organismes unicellulaires	<i>Candida utilis</i> <i>Pseudomonas methylotrophus</i>
Acides organiques Acide citrique	<i>Aspergillus niger</i>
Insecticides Spores fongiques Spores bactériennes	<i>Hirsutella thompsonii</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>

IV.1. Principaux groupes de produits issus de procédés biotechnologiques

Il existe cinq principales catégories de produits commerciaux issus de fermentations industrielles :

- Biomasse de cellules microbiennes ;
- Métabolites microbiens ;
- Enzymes microbiennes ;
- Produits recombinants ;
- Produits transformés par le processus de fermentation.

IV.1.1. Biomasse

La production commerciale de la biomasse microbienne peut être divisée en deux processus importants : la production de cellules microbiennes destinées à la sécrétion des protéines monocellulaires qui peuvent être utilisées dans l'alimentation animale par exemple. Et la production de cellules microbiennes telles que les levures utilisées dans la panification ainsi que les moisissures de fromagerie et les ferments lactiques (cultures starters).

IV.1.2. Métabolites microbiens

Différents métabolites sont issus des différentes étapes de la courbe de croissance d'une culture microbienne. Au cours de la phase exponentielle de croissance, les produits élaborés (métabolites primaires) sont essentiels à la croissance des cellules tels que les acides aminés, nucléotides, protéines, acides nucléiques, lipides, glucides etc. Au cours du ralentissement et de la phase stationnaire, certaines cultures microbiennes commencent à synthétiser des composés qui ne semblent avoir aucune fonction évidente dans le métabolisme cellulaire. Ces composés sont appelés les métabolites secondaires. Il est important de se rendre compte que le métabolisme secondaire peut se produire dans les cultures à faible taux de croissance aussi bien qu'après la croissance soit complètement arrêtée.

Tous les micro-organismes ne sont pas concernés par le métabolisme secondaire. Ce dernier est fréquent chez les bactéries filamenteuses, les champignons et les bactéries sporulées mais il n'est pas observé chez les entérobactéries, par exemple. Il est important de comprendre que la classification des produits issus des fermentations microbiennes en métabolites primaires et secondaires est un moyen pratique, mais artificiel et qui a des limites d'applications dans certains cas. Il est parfois difficile de classer un produit comme étant primaire ou secondaire car la cinétique de synthèse de certains composés peut changer en fonction des conditions de fermentation.

Le rôle physiologique du métabolisme secondaire chez les cellules productrices a fait l'objet d'un débat considérable, mais l'importance de ces métabolites dans l'industrie de la fermentation est représentée par leur effet sur les organismes autres que ceux qui les produisent.

Beaucoup de métabolites secondaires ont une activité antimicrobienne, d'autres sont des inhibiteurs spécifiques d'enzymes, certains sont des facteurs de croissance et beaucoup ont des propriétés pharmacologiques.

IV.1.3. Enzymes microbiennes

Les enzymes sont produites commercialement à partir d'origines végétales, animales et microbiennes. Cependant, les enzymes microbiennes ont l'énorme avantage de pouvoir être fabriquées en grandes quantités par des techniques de fermentation industrielle bien élaborées et contrôlées. En outre, il est beaucoup plus facile d'améliorer la productivité d'un système microbien par rapport à celle d'un système végétal ou animal.

La technologie de recombinaison génétique a permis également de synthétiser des enzymes d'origine animale à l'aide de systèmes microbiens et de mieux contrôler et améliorer les rendements de ces procédés.

IV.1.4. Produits recombinants

C'est en 1972 que les premières manipulations génétiques *in vitro* ont commencé. À cette époque, le biochimiste Paul Berg obtient le premier ADN recombinant grâce aux enzymes de restriction. Un an plus tard, S. Cohen et H. Boyer parviennent à introduire des gènes d'amphibien dans la bactérie *Escherichia coli*. Le premier organisme transgénique était né.

Dans les années 1980, le premier produit issu du génie génétique est commercialisé. Il s'agit de l'insuline recombinante humaine produite par des bactéries génétiquement modifiées. Une protéine hétérologue ou recombinante est une protéine produite par une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique. Un gène codant une protéine d'intérêt est introduit dans le génome de l'espèce productrice (bactéries, cellules mammifères en culture, animaux transgéniques etc.). Les protéines recombinantes peuvent être purifiées et utilisées à des fins thérapeutiques, industrielles ou bien encore dans les activités de recherche.

IV.1.5. Produits fermentés

Les micro-organismes sont très spécifiques, et pour cette raison, les procédés microbiens sont plus précis que les produits chimiques et permettent l'ajout, la suppression ou la modification de groupes fonctionnels dans des sites spécifiques sur une molécule complexe.

Les réactions pouvant être catalysées par des microbes sont : la déshydrogénation, l'oxydation, l'hydroxylation, la déshydratation et la condensation, la décarboxylation, l'amination, la désamination et l'isomérisation.

Les processus microbiens ont l'avantage supplémentaire de fonctionner à des températures et des pressions relativement basses sans l'exigence de catalyseurs potentiellement polluants à base de métaux lourds. Bien que la production du vinaigre (conversion de l'éthanol en acide acétique) est le processus le mieux établi dans cette catégorie, il existe aussi des procédés de fermentation qui impliquent la production de composés à haute valeur comme les stéroïdes et les antibiotiques. Il est à noter que les procédés de transformation exigent qu'une quantité importante de biomasse soit générée afin de catalyser une réaction unique. Pour cette raison, de nombreux procédés ont été simplifiés en immobilisant soit les cellules entières, soit les enzymes qui catalysent les réactions de transformation, sur un support inerte afin de permettre leur réutilisation.

IV.2. Différents types de fermentations

Bien qu'il fût loin d'être le seul scientifique à avoir participé à la démonstration du rôle central des microorganismes dans nombre de processus de transformation, Louis Pasteur peut, à juste titre, être considéré comme un pionnier dans l'histoire des fermentations. Chimiste de formation, il s'intéresse, dans les années 1850, aux fermentations alcoolique et lactique. Il commence alors des travaux qui conduiront en 1857 à la démonstration irréfutable du rôle des levures et des bactéries dans chacune de ces deux fermentations : « À chaque fermentation correspond un ferment particulier. » Mieux, il révèle au monde les fondements biochimiques qui sont en cause dans chacune en démontrant que les fermentations permettent aux levures et aux bactéries de vivre en absence d'oxygène. Il définit alors formellement la fermentation comme « la vie sans air » et les microorganismes fermentatifs comme « anaérobies », brisant ainsi une conception universelle et millénaire de la vie fondée sur le seul métabolisme de la respiration, dans lequel l'oxygène est évidemment indispensable.

Devenu microbiologiste, Pasteur s'intéressera toute sa vie à des sujets qui auront des répercussions dans le domaine des fermentations. Il démontrera que la bactérie *Acetobacter aceti* est responsable de la conversion de l'éthanol en acide acétique (une voie catabolique qu'on appelle « fermentation acétique » de façon erronée sur le plan biochimique, puisqu'elle est aérobie) et il enseignera aux vinaigriers à produire un vinaigre de qualité constante. Ses travaux sur la génération spontanée et sur les techniques de stérilisation conduiront à l'usage de cultures pures de levures sélectionnées pour inoculer les moûts de fermentation et à l'introduction d'une variété de techniques de désinfection des équipements. Enfin, ses recherches plus tardives sur les maladies infectieuses ouvriront la voie à l'avènement d'une médecine moderne au sein de laquelle les procédés de fermentation trouveront, des décennies plus tard, une foule d'applications.

Pour l'industrie naissante des fermentations, les découvertes de Pasteur et des biochimistes et microbiologistes qui le suivront ont été capitales. Bien sûr, elles ont permis aux producteurs de vin, de bière et de vinaigre d'améliorer sensiblement leurs méthodes de production. Mais ce n'est là qu'une conséquence bien mineure en regard de la révolution qu'elles allaient entraîner. En effet, l'étude des microorganismes et de leur métabolisme a démontré que le monde microbien est vaste et diversifié. Chaque espèce de bactérie, de levure et de moisissure a un métabolisme unique et on se rend compte qu'il y a là un potentiel énorme pour arriver à produire une foule de nouvelles substances utiles. Ces productions feront appel à toutes sortes de microorganismes, tant aérobies qu'anaérobies, cultivés en très grandes quantités, ce qui mènera à la naissance d'une nouvelle discipline : la microbiologie industrielle. Au sein de cette discipline, le mot « fermentation » prendra alors un sens commun beaucoup plus large que son sens biochimique strict : toute culture de microorganismes permettant de produire une substance utile et commercialisable est une fermentation.

Au cours de la première étape, la glycolyse oxyde le glucose en deux molécules d'acide pyruvique. Les électrons et les protons arrachés du glucose sont captés par le NAD^+ pour se réduire en $\text{NADH} + \text{H}^+$: il y a production de deux moles d'ATP par phosphorylation au niveau du substrat. Par contre, le $\text{NADH} + \text{H}^+$ doit encore être réoxydé en NAD^+ . Si ce dernier n'est pas régénéré, l'oxydation du glucose s'arrêtera et la glycolyse aussi. À la deuxième étape, le $\text{NADH} + \text{H}^+$ s'oxyde pour transférer les électrons et les protons directement à l'acide pyruvique ou à l'un de ses dérivés. La réduction de ces accepteurs d'électrons finaux se traduit par la formation de nombreux composés différents déterminant une grande diversité de types de fermentation. Parallèlement, le NAD^+ est régénéré et peut s'engager dans une autre ronde de glycolyse. C'est d'ailleurs une des fonctions essentielles de cette deuxième étape : fournir un approvisionnement ininterrompu de NAD^+ pour que la glycolyse puisse suivre son cours.

Au cours de la fermentation, toute l'ATP est produite uniquement par la glycolyse, ce qui implique un rendement énergétique beaucoup plus faible : 19 fois moins d'ATP par mole de glucose que la respiration aérobie (2 moles d'ATP contre 38 chez les procaryotes).

Considérant que l'oxydation du glucose est partielle, une grande partie de l'énergie contenue à l'origine dans le glucose reste emprisonnée dans les liaisons chimiques du produit final issu de la fermentation (éthanol, acide lactique, etc.). Les microorganismes fermentaires doivent donc compenser ce manque à gagner par l'oxydation d'une quantité plus importante de substrat. Le tableau suivant résume les principales distinctions entre la respiration aérobie, la respiration anaérobie et la fermentation.

Tableau 02 : Comparaison de la respiration aérobie, de la respiration anaérobie et de la fermentation comme voies d'oxydation du glucose

	Respiration aérobie	Respiration anaérobie	Fermentation
Conditions de croissance	Aérobie	Anaérobie	Anaérobie
Accepteur final des électrons	O_2	Molécules inorganiques (SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , etc.)	Pyruvate ou dérivé
Produit terminal de l'oxydation	CO_2 et H_2O	CO_2 , composés inorganiques (NO_2^- , H_2S , CH_4 , etc.)	Composés organiques et inorganiques variés (acide lactique, éthanol, butanol, etc.)
Synthèse d'ATP	Phosphorylation oxydative et au niveau du substrat	Phosphorylation oxydative et au niveau du substrat	Phosphorylation au niveau du substrat
Molécules d'ATP formées	36 (eucaryotes) ou 38 (procaryotes)	Variable selon les espèces	2

Plusieurs cellules ont la capacité d'oxyder le glucose par fermentation, dont surtout des microorganismes anaérobies stricts et plusieurs anaérobies facultatifs. D'ailleurs, chez ces derniers, la fermentation est une voie de rechange à la respiration aérobie lorsque l'oxygène vient à manquer et l'acide pyruvique est alors au carrefour des deux voies oxydatives.

Un rare exemple de fermentation chez les organismes supérieurs est celui des cellules musculaires, qui ont la capacité de fermenter le glucose lorsqu'un muscle soumis à un travail intense se trouve temporairement privé d'oxygène. Cette fermentation, qui maintient l'activité musculaire pendant quelques instants en absence d'oxygène, produit de l'acide lactique.

La versatilité des microorganismes sur le plan du catabolisme énergétique est particulièrement remarquable chez les entérobactéries, qui peuvent métaboliser les nutriments par la voie respiratoire et la voie fermentaire. Par exemple, la bactérie *Escherichia coli* possède le bagage enzymatique nécessaire pour effectuer la respiration aérobie, la respiration anaérobie et la fermentation. Il n'est donc pas étonnant qu'elle puisse envahir efficacement une diversité de milieux.

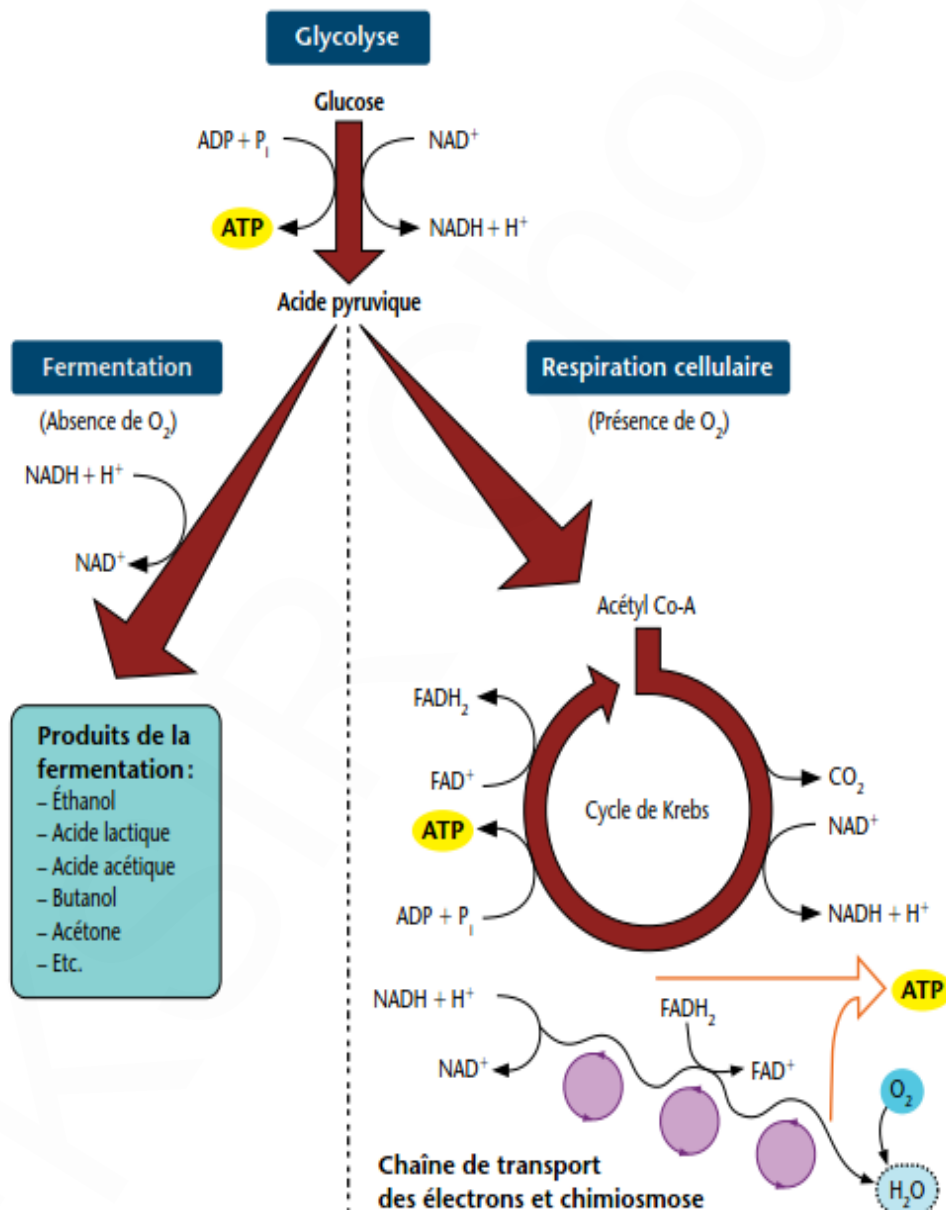


Figure 07 : Comparaison entre la respiration aérobie et la fermentation au sens biochimique

IV.2.1. Fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique est la plus répandue chez les levures, spécialement chez le genre *Saccharomyces*. Après l'oxydation du sucre par glycolyse, les deux molécules d'acide pyruvique produites sont décarboxylées en deux molécules d'acétaldéhyde et deux molécules de CO₂, puis le NADH + H⁺ issu de la glycolyse est réoxydé en NAD⁺, réduisant l'acétaldéhyde en éthanol.

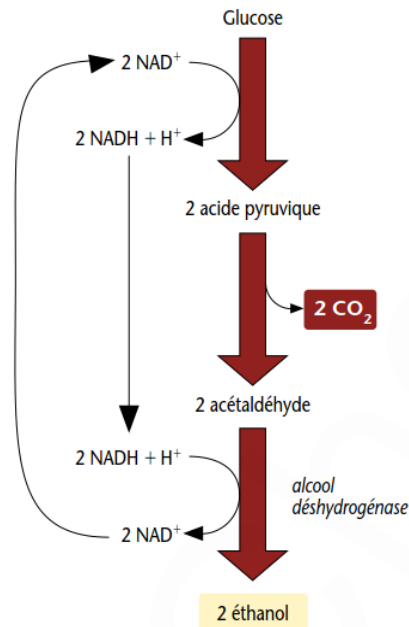


Figure 08 : Fermentation alcoolique

IV.2.2. Fermentation lactique

La fermentation lactique provient de la fermentation anaérobie du glucose ou d'autres glucides par des bactéries lactiques. Elle peut être de nature homolactique ou hétérolactique selon les bactéries impliquées. Dans le cas de la fermentation homolactique, l'acide pyruvique est réduit en acide lactique par l'oxydation du NADH + H⁺, une réaction qui est catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase. La fermentation est notamment réalisée par des espèces bactériennes homofermentaires appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, etc.

Dans la fermentation hétérolactique, les réactions métaboliques sont différentes. En effet, les bactéries hétérolactiques utilisent la voie des pentoses phosphates au lieu de la glycolyse. Cette voie permet de dégrader les sucres à cinq atomes de carbone (pentoses) en plus du glucose. Lorsque la bactérie se retrouve en aérobiose, elle produit de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO₂ et deux moles d'ATP, alors qu'en anaérobiose, elle produit plutôt de l'acide lactique, de l'éthanol, du CO₂ et une mole d'ATP. Les espèces bactériennes hétérofermentaires les plus connues qui ont recours à cette voie sont *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* de même que plusieurs *Lactobacillus*.

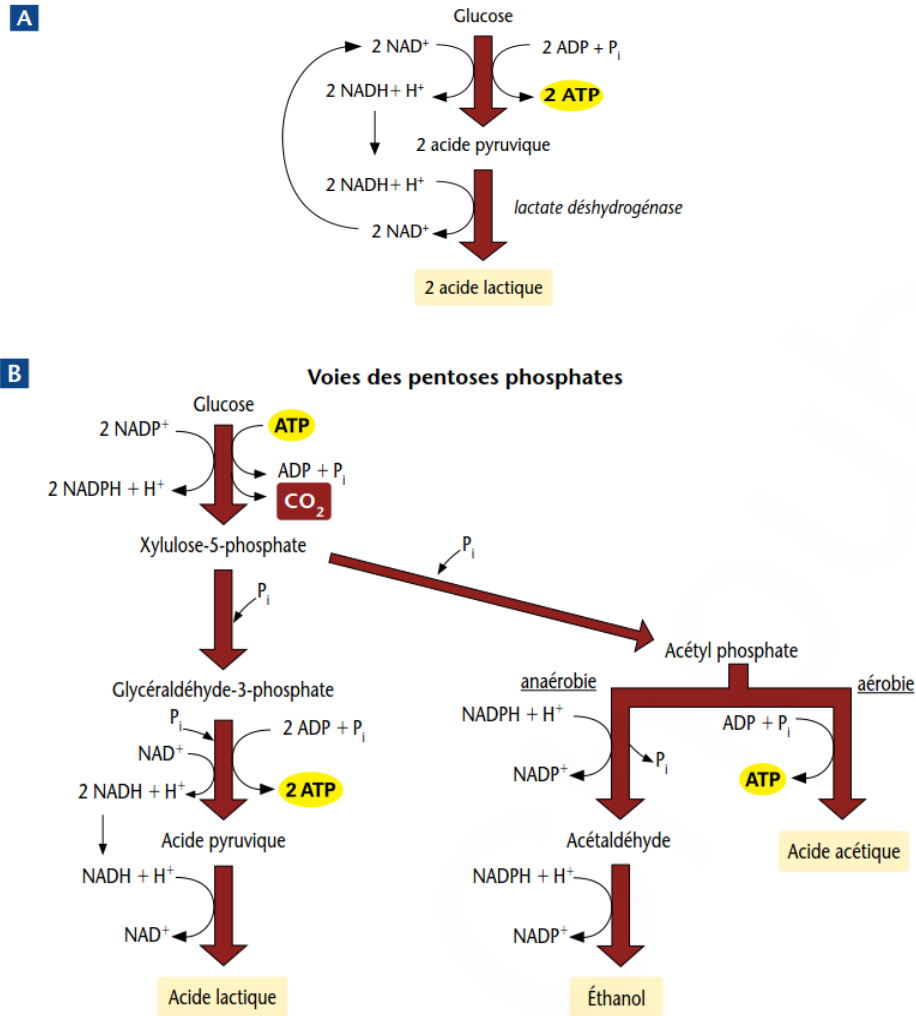


Figure 09 : Fermentation lactique. (a) Principales étapes de la fermentation homolactique ; (b) Principales étapes de la fermentation hétérolactique.

IV.2.3. Notion de bioconversion ou procédé de transformation

Une cellule microbienne peut servir à convertir ou à transformer une substance quelconque en un produit à valeur ajoutée, un peu à l'image des conversions traditionnelles du moût de raisin en vin, du vin en vinaigre ou du lait en yaourt. Ces transformations contribuent à produire des composés de très grande valeur dans l'industrie pharmaceutique, comme des antibiotiques, des vitamines, des stéroïdes et des prostaglandines.

De telles conversions reposent sur les réactions biochimiques des microorganismes utilisés telles que la déshydrogénation (enlèvement d'ions hydrogène), l'oxydation, l'hydroxylation (ajout d'un groupement OH), l'hydrolyse (perte d'une molécule d'eau) ou la condensation (gain d'une molécule d'eau), la décarboxylation (enlèvement d'un groupement carboxyle), la désamination (enlèvement d'un groupement amine) ou l'amination et l'isomérisation. L'un des meilleurs exemples de bioconversion est la transformation de l'alcool en acide acétique (vinaigre), telle qu'illustrée à la figure suivante.



Figure 11 : Bioréacteurs industriels

Peu importe le type de fermentation, tout procédé biotechnologique est structuré selon les étapes fondamentales suivantes :

- La formulation du milieu de culture à utiliser en commençant par le développement de l'inoculum ;
- La stérilisation du milieu, du fermenteur et des équipements auxiliaires ;
- La production d'une culture pure et active en quantité suffisante pour inoculer le fermenteur de production ;
- La culture et la multiplication du microorganisme en question dans le bio-fermenteur tout en respectant les conditions optimales de croissance afin d'obtenir le produit désiré ;
- L'extraction du produit et sa purification si besoin ;
- L'évacuation des effluents produits par le cycle de fermentation.

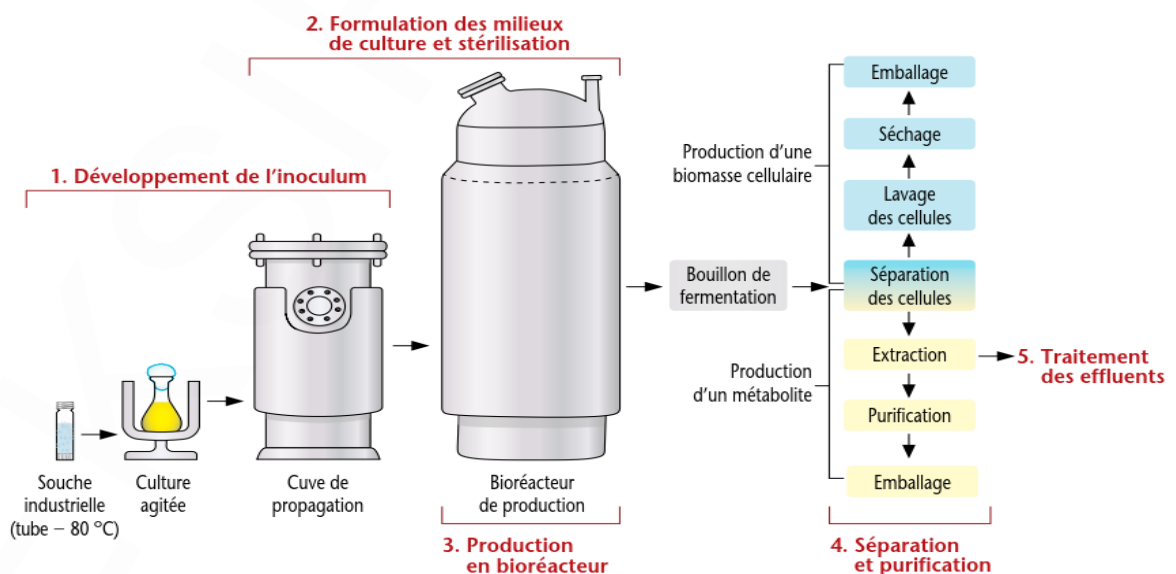


Figure 12 : Illustration schématique d'un bioprocédé typique de fermentation

Toutefois, il convient de noter qu'il est important d'améliorer progressivement l'efficacité globale d'une fermentation. Avant qu'un bioprocédé de fermentation ne puisse être créé, un programme de recherche doit avoir lieu pour permettre l'identification et l'isolement d'un microorganisme producteur. Ce microorganisme peut aussi éventuellement être modifié de façon à ce qu'il puisse synthétiser le produit désiré en grandes quantités à échelle industrielle (figure suivante). Les exigences de production doivent ensuite être déterminées et l'usine conçue en conséquence. En outre, le processus d'extraction du produit doit être bien caractérisé. En parallèle à la recherche qui devrait se faire en continu, un programme de développement devrait assurer l'amélioration continue du procédé, du milieu de culture et des techniques de récupération du produit ainsi que le traitement des déchets.

CHAPITRE V. LES INTOXICATIONS ET TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES

L'infection correspond en pathologie à la pénétration dans l'organisme d'un agent pathogène comme une bactérie, un virus, un protozoaire, un champignon ou éventuellement une toxine, produite par un de ces agents précités. Le degré d'infection et la sévérité des symptômes dépendent de plusieurs facteurs, notamment :

- *Type du microorganisme* : Certaines espèces et souches sont plus vulnérables que d'autres ;
- *Dose ingérée* : Les symptômes sont plus sévères à dose élevée et la période d'incubation est plus courte ;
- *Système immunitaire de l'hôte* : Chez les personnes âgées, les patients hospitalisés, les enfants et les femmes enceintes, le système immunitaire est faible et les sujets sont donc, plus vulnérables aux infections microbiennes.

Les agents infectieux peuvent pénétrer dans l'organisme de différentes façons : par les voies respiratoires, les voies urinaires, le tractus digestif, les plaies de la peau, etc. Les intoxications et toxi-infections alimentaires sont des cas particuliers d'infection où les agents infectieux sont véhiculés par les aliments.

On parle d'intoxication alimentaire lorsqu'une personne ingère un aliment contenant des toxines bactériennes ou des toxines des moisissures (mycotoxines). Le terme est aussi utilisé pour désigner les intoxications dues à l'ingestion d'aliments contenant des métaux lourds ou des molécules chimiques toxiques (pesticides, certains additifs alimentaires, etc.). C'est pourquoi on préfère utiliser le terme « Intoxication alimentaire » pour désigner les intoxications alimentaires d'origine microbienne (toxines des bactéries et les mycotoxines).

Quant à la toxi-infection alimentaire (TIA), elle correspond à l'ingestion d'un aliment contenant des micro-organismes pathogènes qu'il s'agisse de bactéries, virus ou parasites. Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est une Maladie infectieuse à Déclaration Obligatoire (MDO) qui a lieu lorsqu'il existe « au moins deux cas groupés, avec des manifestations similaires dues à une contamination par un micro-organisme (bactéries en général) ou une toxine ». Les plus grandes toxi-infections alimentaires collectives sont appelées « crises alimentaires ».

V.1. Pouvoir pathogène des agents infectieux

Un **agent infectieux** est un agent biologique pathogène responsable d'une maladie infectieuse. Les agents infectieux sont majoritairement des micro-organismes, notamment des bactéries et des virus. On distingue cinq types d'agents infectieux : les bactéries ; les champignons ; les virus ; les parasites et les prions qui sont des agents infectieux non conventionnels (Car ils sont exempts d'acide nucléique).

Le **pouvoir pathogène** d'un agent infectieux mesure sa capacité à provoquer une maladie chez un organisme hôte. La virulence désigne l'intensité du pouvoir pathogène d'un micro-organisme.

La virulence d'un agent infectieux mesure sa capacité à se développer dans un organisme (pouvoir invasif) et à y sécréter des toxines (pouvoir toxique).

Le **pouvoir invasif** d'une bactérie est sa capacité à se multiplier et à se répandre dans un organisme hôte, malgré les défenses immunitaires. Le pouvoir invasif est influencé par plusieurs paramètres. Des facteurs exogènes tels que la température de l'eau, de l'air et du sol, le pH, le taux d'oxygène, la teneur en certains nutriments de l'environnement, l'exposition aux ultraviolets solaires, à certains toxiques ou polluants ou à la radioactivité, la présence d'un vecteur biologique, d'une lésion ou d'une primo-infection etc. peuvent ou non favoriser l'agent infectieux. La constitution et le métabolisme de la bactérie définissent en partie son pouvoir invasif. La présence de pili et/ou de glycocalyx facilite la fixation de la bactérie sur sa cellule cible. La résistance à la phagocytose grâce à la présence d'une capsule, et la résistance aux enzymes lysosomales favorisent le pouvoir invasif d'un agent infectieux.

Le **pouvoir toxique** signifie la capacité d'un microorganisme à produire des toxines qui sont des molécules ayant un effet nocif ou létal pour l'organisme hôte. Les toxines protéiques sont les poisons les plus actifs qui existent.

Le terme pathogène, vient du grec ancien [pathos] qui signifie « souffrance » et [genos] signifiant « naissance ». Le pouvoir pathogène ou la pathogénicité d'un microorganisme mesure sa capacité à provoquer des troubles chez son hôte. Il varie selon la souche et dépend de son pouvoir invasif (capacité à se répandre dans les tissus et à y établir un ou des foyers infectieux), il dépend aussi de son pouvoir toxigène (capacité à produire des toxines) et de sa capacité à se reproduire. On distingue trois catégories de bactéries pathogènes :

- Les bactéries **pathogènes strictes** (ou *spécifiques*), qui provoquent des troubles quel que soit l'état de santé de l'hôte ; par exemple : *Salmonella Typhi* et *Vibrio cholerae* ;
- Les bactéries **pathogènes opportunistes**, qui provoquent des troubles lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies ou que la personne est âgée (sujets immunodéprimés) ; par exemple : *Pseudomonas aeruginosa*.
- Les bactéries **pathogènes occasionnelles**, qui sont le plus souvent inoffensives mais dont certaines souches sont pathogènes. On retrouve dans cette catégorie des bactéries commensales comme *Escherichia coli*.

V.2. Botulisme

Le botulisme alimentaire est une maladie grave et potentiellement fatale, mais néanmoins, rare. C'est une intoxication provoquée par l'ingestion de neurotoxines puissantes, les toxines botuliques, présentes dans les aliments contaminés. Le botulisme ne se transmet pas d'un individu à un autre.

Les spores produites par *Clostridium botulinum* sont résistantes à la chaleur et largement présentes dans l'environnement. En l'absence d'oxygène, ces spores germent, se développent et excrètent des toxines.

Il existe 7 formes de toxines botuliques distinctes, les types A à G. Quatre de ces formes (les types A, B, E et rarement F) peuvent provoquer le botulisme humain. Les types C, D et E sont à l'origine de maladies chez d'autres mammifères les oiseaux et les poissons.

Les toxines botuliques sont ingérées avec des aliments qui n'ont pas été transformés de manière appropriée et dans lesquels les bactéries ou leurs spores survivent et produisent des toxines. S'il se présente principalement sous forme d'intoxication alimentaire, le botulisme peut aussi être contracté par contamination intestinale chez le nourrisson, par l'intermédiaire d'une blessure ou par inhalation.

V.2.1. Pouvoir pathogène et symptomatologie

Le pouvoir pathogène de *Clostridium botulinum* est dû à sa capacité de produire des neurotoxines. Ces dernières sont des molécules protéiques, comprenant jusqu'à 20 acides aminés, libérées par les cellules végétatives à la fin de la croissance logarithmique. La dose toxique est estimée à 1 nanogramme (10^{-9} g) par kg de poids vif.

Le botulisme peut résulter :

- Soit de l'ingestion d'aliments contenant des neurotoxines produites par *Clostridium botulinum*. Il s'agit donc d'une intoxication alimentaire. C'est le mécanisme le plus anciennement connu et le plus classique ;
- Soit de l'ingestion de toxines perforées dans l'aliment et/ou de bactéries ou spores également présentes dans l'aliment. Ces germes vont franchir la barrière gastrique et s'implanter dans l'intestin où elles produisent leurs toxines. Il s'agit alors dans ce cas d'une toxi-infection alimentaire. Ce mécanisme est actuellement évident et fréquent chez l'homme.

Le botulisme humain est une maladie grave à mortalité élevée ; heureusement que c'est une maladie rare (Faible morbidité, forte mortalité).

Les symptômes liés à la maladie apparaissent dans 2 heures à 24 heures après l'intoxication et se manifestent par :

- Des paralysies oculaires et vision double ;
- Troubles sécrétoires (une sécheresse de la bouche par défaut de salivation) ;
- Des troubles de déglutition et d'élocution ;
- Des signes plus rares, tels que la constipation par diminution des sécrétions, des paralysies musculaires et une rétention urinaire peuvent apparaître.

Dans les formes légères, seules les paralysies oculaires sont présentes ; elles apparaissent en général en premier et disparaissent en dernier. Alors que dans les formes les plus graves, on peut observer la paralysie des muscles respiratoires ; la mort survient par asphyxie suite à la paralysie des poumons.

V.2.2. Ecologie de *Clostridium botulinum*

Toutes les souches de *Clostridium botulinum* sont anaérobies strictes. Elles se développent surtout dans les produits à potentiel d'oxydo-réduction faible. Les souches de *Clostridium botulinum* protéolytiques des types A, B et F produisent des spores thermorésistantes, qui survivent facilement à la pasteurisation. Cependant, elles sont incapables de croître et de produire leurs toxines à des températures inférieures à 10°C. Par contre, les *Clostridium botulinum* de type E et les souches non protéolytiques des types B et F sont capables de croître et de produire des toxines à des températures aussi basses que 3,3°C, mais leurs spores sont plus thermosensibles.

En ce qui concerne le pH, des valeurs inférieures à 4,5 inhibent la germination et la toxinogénèse de *Clostridium botulinum*. C'est pourquoi on divise les produits alimentaires en produits faiblement acides ($\text{pH} \geq 4,5$) et les aliments acides ($\text{pH} < 4,5$). Le risque de botulisme est nul pour les produits acides. L'activité d'eau (a_w) minimale de croissance de *Clostridium botulinum* est de 0,94. Sa croissance est également inhibée par la présence de sel (10% ou plus de NaCl).

V.2.3. Aliments responsables

A cause du caractère anaérobie du *Clostridium botulinum* et de la thermorésistance élevée de ses spores, ce sont surtout les conserves alimentaires, les produits emballés sous vide ou en atmosphère modifiée, les produits fumés et salés qui sont à l'origine de la maladie botulique.

Une proportion importante de cas de botulisme est due à la consommation de conserves et semi-conserves préparées à la maison.

V.2.4. Mesures de prévention

Le respect des bonnes pratiques d'hygiène est nécessaire pour réduire au minimum la contamination des produits alimentaires par *Clostridium botulinum*.

La congélation ou la réfrigération des aliments à des températures inférieures à 3,3°C, l'acidification (jusqu'au $\text{pH} < 4,5$), le salage (jusqu'à 10% de sel) et l'utilisation des additifs alimentaires, tels que les nitrates de sodium et de potassium, sont aussi des mesures efficaces pour prévenir la prolifération de *Clostridium botulinum* et la production de ses toxines. Les spores de *Clostridium botulinum* résistent aux traitements de pasteurisation, mais elles sont inhibées par stérilisation. Dans ce dernier cas, le traitement doit être fait selon un barème $>$ à 120°C à cœur pendant 3 minutes minimum. Après stérilisation, il faut éviter toutes recontaminations possibles.

V.3. Salmonellose

La salmonellose est une toxi-infection causée par des espèces de bactéries appartenant au genre *Salmonella*. Les salmonelles sont des bactéries asporulées à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Salmonella est souvent mobile et aéro-anaérobie facultative. Chimioorganotrophe, cette bactérie possède un métabolisme oxydatif et fermentaire.

C'est un germe ubiquiste largement distribué dans la nature. Son habitat écologique est le tractus intestinal de l'Homme, des oiseaux et des mammifères.

Il peut contaminer les aliments par plusieurs moyens : animaux domestiques, insectes, oiseaux, rongeurs, hommes et aussi l'eau.

V.3.1. Pouvoir pathogène et symptomatologie

L'infection par salmonelles est surtout d'origine alimentaire. Cependant, elle peut être transmise par simple contact direct avec un animal infecté ou d'une personne à une autre. Le pouvoir pathogène des salmonelles est dû uniquement à sa capacité entéro-invasive (invasion des cellules intestinales). La libération de l'endotoxine intervient lors de la lyse cellulaire.

Les symptômes de l'infection chez l'Homme se manifestent sous 2 aspects essentiels : les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes et les gastro-entérites.

La fièvre typhoïde représente l'exemple classique des entérites. La période d'incubation est de 7 à 14 jours. La maladie se manifeste souvent au début par un malaise, une anorexie et les maux de tête, suivi par une fièvre qui augmente jusqu'à atteindre une température moyenne de 40 °C. Des bronchites et des toux peuvent aussi se développer avec le temps. Quant à la gastro-entérite, cette forme de salmonellose a une période d'incubation moyenne de 12 à 24 heures. Les principaux symptômes de l'infection gastro-intestinale sont les nausées, les vomissements, les douleurs abdominales et la diarrhée qui apparaissent toujours brutalement. Cette infection peut être accompagnée par des maux de tête et des frissons. Les symptômes commencent à régresser spontanément après 24 heures à 48 heures.

La mort peut survenir, très rarement, chez les sujets immunodéprimés, les enfants et les vieillards (forte morbidité, faible mortalité).

V.3.2. Ecologie des salmonelles

Les bactéries du genre *Salmonella* peuvent se multiplier à des températures allant de 5°C à 47°C, avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C. Au-dessous de 10°C, leur croissance est nettement retardée. La congélation ne permet pas l'inhibition complète des germes *Salmonella*, néanmoins une partie est éliminée et les survivants peuvent facilement se multiplier lorsque la température devient favorable. Par contre, un traitement de pasteurisation (72°C/15 s) assure leur destruction dans le lait. Le pH optimal de croissance de *Salmonella* est situé entre 6,5 et 7,5. La croissance de la bactérie est inhibée en dessous de 4,5 et au-delà de 9.

En dessous d'une activité d'eau (a_w) de 0,93, la croissance de *Salmonella* est arrêtée. Elle est également inhibée par la présence d'une teneur en sel (NaCl) supérieure à 5,8%. Les radiations ionisantes tuent les *Salmonella* qui ne présentent pas de radorésistance particulière. Des doses inférieures à 10 kGy assurent l'assainissement d'aliments comme les viandes de volailles (séparées mécaniquement).

V.3.3. Aliments responsables

Les aliments les plus souvent incriminés sont les viandes et les produits carnés, certains produits de charcuterie, les volailles et produits dérivés, les ovo-produits et produits divers à base d'ovo-produits, le lait liquide ou en poudre. Mais certains produits végétaux peuvent également servir de vecteurs aux *Salmonella*.

V.3.4. Moyens de prévention

La prévention des problèmes de salmonellose repose essentiellement sur l'application des règles d'hygiène et le respect de la chaîne du froid. En matière d'hygiène, les règles relatives à la manipulation, le transport, la transformation et le stockage des produits alimentaires, le nettoyage et désinfection et l'hygiène corporelle doivent être appliquées à tous les niveaux de la chaîne alimentaire. Les légumes ne doivent jamais être irrigués avec des eaux résiduaires domestiques non dépolluées. De même, il faut interdire le ramassage des coquillages dans les zones polluées et leur distribution directe sans un traitement de dépollution.

Quant au respect du froid, les aliments frais doivent être refroidis le plus vite possible et maintenus à une température inférieure à 5 °C jusqu'à leur stabilisation par les procédés appropriés.

V.4. Intoxication staphylococcique

L'intoxication staphylococcique est une intoxication due à l'ingestion d'aliments contenant des toxines produites par *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* est une bactérie mésophile à Gram positif, asporulée, aéro-anaérobie facultative appartenant à la famille des *Micrococcaceae*. Les *Staphylococcus aureus* sont des microorganismes ubiquistes, largement rencontrés dans l'air, l'eau, les eaux usées et tout objet en contact avec ces substances ou exposé à des manipulations humaines. Les surfaces cutanées humaines et animales représentent les principaux réservoirs de *Staphylococcus aureus*.

V.4.1. Pouvoir pathogène et symptomatologie

Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* est dû à la production, par certaines souches de cette bactérie, d'entérotoxines responsables d'intoxications alimentaires. On distingue 7 types de toxines staphylococciques : A, B, C₁, C₂, C₃, D et E. Les entérotoxines A et D sont les plus fréquemment impliquées dans les intoxications alimentaires puis par fréquence décroissante, les entérotoxines C, B et E. Les entérotoxines restent stables dans une large gamme de pH (2 à 11), résistent à l'action d'enzyme protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, rénine, pepsine) et présentent une grande stabilité à la chaleur.

La manifestation des symptômes d'intoxication staphylococcique nécessite une quantité élevée d'entérotoxines qui correspond à une charge élevée en microorganismes (de l'ordre de 10⁵ à 10⁶ germes/g d'aliment). C'est pourquoi la présence de charges faibles de *Staphylococcus aureus* ne constitue pas nécessairement un danger.

L'ingestion de ces entérotoxines provoque, dans un délai court de 2 à 4 heures en moyenne (souvent les malades sont encore sur lieu de repas), des troubles digestifs, parfois violents. Il s'agit surtout de vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, nausées et parfois de céphalées et de troubles neurologiques. Les intoxications staphylococciques ne s'accompagnent pas de fièvre, et sont souvent bénignes pour les adultes qui guérissent après quelques heures à quelques jours.

Par contre, elles peuvent être dangereuses chez les nourrissons ou les personnes âgées en raison de la déshydratation brutale que provoquent les vomissements et les diarrhées.

V.4.2. Ecologie de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie mésophile avec une température minimale de croissance de 6°C et une température maximale de 45°C à 49°C. La température minimale pour la production de toxines est de 8°C à 10°C. Contrairement à ses toxines, *S. aureus* est un germe thermosensible. En effet, des populations de 10⁶ germes/ml peuvent être complètement inactivées en 4min à 24min pendant 54°C à 60°C. Un pH de 4 constitue un minimum pour la croissance de *Staphylococcus aureus*.

L'activité d'eau (a_w) minimale pour la croissance de *Staphylococcus aureus* est de 0,83 alors que son activité d'eau optimale de croissance est de 0,99. Cependant, les aliments les plus fréquemment contaminés par *Staphylococcus aureus* se caractérisent par une activité d'eau au-dessous de 0,95. Ceci s'explique par le fait que dans les aliments où l'activité d'eau est plus élevée, la croissance de *Staphylococcus aureus* se trouve inhibée par la présence d'autres bactéries (*Staphylococcus aureus* est peu compétitive).

Staphylococcus aureus a un comportement halotolérant. C'est une bactérie qui peut être cultivée sur des milieux contenant 5% de chlorure et allant jusqu'à 10% pour certaines souches.

V.4.3. Aliments responsables

Le fait que *Staphylococcus aureus* soit peu compétitive (inhibée en présence d'une flore compétitive importante) n'en fait pas un vrai danger dans les produits crus. Par contre, il représente un danger dans les produits contaminés après un traitement thermique tel que la cuisson ou la pasteurisation.

Cette contamination peut être causée par des manipulations manuelles lors du conditionnement ou par une contamination accidentelle des produits préemballés avant pasteurisation.

Plusieurs produits ont été signalés comme étant des sources d'intoxication staphylococciques : le jambon, viande de dinde et de poulet, les rôtis de bœuf, les salades à base de viande de volaille, etc.

V.4.4. Moyens de prévention

Seul le respect des bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication peuvent prévenir une intoxication staphylococcique. En effet, si les traitements thermiques de stabilisation permettent de détruire les germes de *S. aureus*, ils sont inefficaces quant à l'inactivation de leurs toxines si elles sont déjà présentes sur l'aliment.

La contamination des aliments par *S. aureus* intervient surtout après les traitements d'assainissement comme la cuisson. C'est pourquoi les aliments cuits doivent être conditionnés aussitôt que possible et doivent être manipulés dans des conditions hygiéniques évitant ainsi toute recontamination.

V.5. Mycotoxines

Ce sont des métabolites secondaires ou toxines produites par les moisissures dans l'aliment. Ils sont toxiques pour l'homme, les animaux et les oiseaux. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire.

Les espèces productrices de ces toxines sont principalement *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (produisent aflatoxine) *Penicillium patulum* (patuline). L'ingestion d'un aliment contenant des mycotoxines, surtout à long terme, peut causer une intoxication chronique aux mycotoxines et être ainsi la cause de graves maladies de foie, des reins et de l'appareil circulatoire.

V.6. Poisons d'aliments marins

Les toxines marines sont un problème de santé en émergence. Ainsi, les consommateurs doivent connaître certains faits associés à la consommation de poissons et de fruits de mer (huîtres, moules etc.). Ces animaux sont très sensibles à la qualité de leur milieu marin. Ils se nourrissent en filtrant l'eau pour recueillir les organismes microscopiques qui s'y trouvent, accumulant ainsi dans leurs tissus des biotoxines, des bactéries ou des virus nocifs qui peuvent causer des maladies chez les personnes qui les consomment.

L'ingestion de mollusques et de crustacés fortement contaminés par certaines toxines peut donc entraîner des maladies graves voire la mort. Aujourd'hui, les biotoxines présentes dans l'environnement marin sont multiples dont : L'acide okadaïque ; la brevétoxine ; la saxitoxine ; la tétrodotoxine ; la ciguatoxine. Et à chacune de ses bio-toxines marines son intoxication correspondante :

- Intoxication amnésique par les fruits de mer (IAFM) ;
- Intoxication diarrhéique par les fruits de mer (IDM) ;
- Intoxication neurologique par les fruits de mer (INFM) ;
- Intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM) ;
- Les intoxications à l'histamine ;
- Syndrome associé aux Pfiesteria ;
- Ciguatera.

CHAPITRE VI. Altération des aliments par les microorganismes

VI.1. Principaux groupes d'aliments

Dans l'alimentation humaine, plusieurs familles d'aliments sont représentées. Chaque catégorie contient des nutriments et des apports nutritionnels qui lui sont spécifiques. Pour une bonne alimentation, il suffit de varier les aliments en puisant dans chaque famille alimentaire. Les principales catégories des aliments sont :

- **Les féculents** : qui fournissent de l'énergie grâce notamment aux glucides complexes qu'ils contiennent. Ils fournissent également des protéines végétales ainsi que des fibres ;
- **Les fruits et légumes** : qui apportent des vitamines, des minéraux, des fibres et de l'eau ;
- **Les produits laitiers** : qui sont la source principale de calcium et sont riches en protéines de bonne qualité, le lait et les produits laitiers sont des aliments incontournables dans l'alimentation ;
- **Les viandes, volailles, poissons, œufs, légumineuses** : La viande, les œufs, le poisson, les légumineuses apportent des protéines qui sont indispensables à la construction des tissus musculaires ;
- **Les matières grasses** : qu'elles soient d'origine végétale ou animale sont indispensables pour le fonctionnement de l'organisme ;
- **Les produits sucrés** : qui englobent les viennoiseries, les bonbons et les pâtisseries, ils sont à limiter dans l'alimentation, car très riches en sucre et parfois en graisse, consommés en excès, ils peuvent être néfastes pour la santé ;
- **Les boissons** : dont l'eau, le café, les tisanes et le thé. L'eau est certainement l'élément le plus indispensable de notre organisme. Elle représente selon l'âge entre 65 et 80 % du poids de notre corps.

D'un point de vue microbiologique, on se référant au JORA N° 39 du 2 juillet 2017, les denrées alimentaires sont divisées en 15 catégories. Ces denrées alimentaires, ne doivent pas contenir de micro-organismes ni leurs toxines ou métabolites dans des quantités qui présentent un risque inacceptable pour la santé du consommateur. Le tableau suivant résume les différentes catégories de denrées alimentaires ainsi que les types de produits alimentaires qui les constituent :

Tableau 04 : Catégories des denrées alimentaires auxquelles s'appliquent les dispositions du JORA n° 39 du 2 juillet 2017

Catégories	Denrées alimentaires
1. Laits et produits laitiers	Lait cru ; Lait UHT et lait stérilisé ; Lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés ; Lait en poudre et lactosérum en poudre ; Fromages au lait cru ; Fromages à base de lait ayant subi un traitement thermique moins fort que la pasteurisation et fromages affinés à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation ; Fromages à pâte molle non affinés (fromages frais) à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation ; Crème au lait cru ; Crème pasteurisée ; Crèmes glacées et desserts lactés congelés ; Beurre cru ; Beurre pasteurisé ; Beurre concentré ; Laits fermentés (Lben, Raib...) ; Yaourts ou yoghourts et desserts lactés ; Caséines-caseinates.
2. Viandes rouges et dérivés	Carcasses, demi-carcasses, quartier ou pièces de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés ; Viande hachée ; Portion unitaire de viande rouge, réfrigérée ou congelée ; Abats rouges entiers ; Abats rouges tranchés ; Viandes séparées mécaniquement (VSM) ; Préparations de viande.
3- Viandes de volailles, de lapins et leurs dérivés	Volailles, lapins entiers et découpes de volailles avec peau ; Découpes de volailles sans peau et découpes de lapins ; Produits à base de volaille destinés à être consommés cuits ; Abats crus de volaille ; Viande hachée de volaille ; Viandes séparées mécaniquement (VSM).
4- Produits de charcuterie à base de viande	Charcuteries crues à consommer cuites ; Charcuteries cuites ne contenant pas de féculents ; Charcuteries cuites avec féculents.
5- Produits de la pêche et de l'aquaculture	Produits de la pêche et de l'aquaculture fabriqués à partir d'espèces de poissons associés à une grande quantité d'histidine ; Produits de la pêche et de l'aquaculture ayant subi un traitement de maturation aux enzymes dans la saumure, fabriqués à partir d'espèces de poissons associés à une grande quantité d'histidine à l'exception de sauce de poisson ; Sauce de poisson produite par fermentation de produits de la pêche et de l'aquaculture ;

5- Produits de la pêche et de l'aquaculture	Poissons, céphalopodes et mollusques crus (sauf mollusques bivalves vivants) ; Mollusques bivalves vivants et échinodermes, tuniciers et gastéropodes marins vivants ; Crustacés cuits entiers et échinodermes cuits ; Produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits ; Poissons et autres produits de la pêche et de l'aquaculture fumés, salés, marinés ; Crevettes, poissons et échinodermes séchés ; Préparations de poisson et autres produits de la pêche et de l'aquaculture crus à consommer cuits ; Crustacés crus décortiqués ; Préparations de poisson et autres produits de la pêche et de l'aquaculture crus pouvant être consommés en l'état ; Charcuteries à base de produits de la pêche et de l'aquaculture cuites à consommer en l'état ; Escargots décoquillés surgelés ou congelés.
6- Graisses animales et végétales	Graisses animales non fondues ; Graisses animales fondues ; Matière grasse laitière anhydre (MGLA) ; S'men ; Margarine et autres matières grasses végétales ;
7- Conserves et semi-conserves	Semi-conserves pasteurisées d'origine animale ; Semi-conserves non pasteurisées d'origine animale (anchois au sel ou à l'huile...) ; Semi-conserves d'origine végétale ; Conserves.
8- Aliments pour nourrissons et enfants en bas âge	Préparations destinées aux nourrissons ; Préparations de suites destinées aux nourrissons et enfants en bas âge ; Aliments destinés aux nourrissons de plus de six mois et enfants en bas âge ; Préparations nécessitant une cuisson avant la consommation.
9- Céréales et produits dérivés	Céréales en grains destinées à la consommation en l'état et non à la transformation ; Farines et semoules ; Produits de biscuiterie ; Couscous et pâtes alimentaires ; Pâtes fraîches (nature ou farcies) ; Pâtes précuites séchées (diouls, ktaef, rechta...) ; Autres produits dérivés de céréales cuites (m'semen, baghrir, tout type de pains ...).
10- Plats préparés	Plats préparés dont tous les ingrédients sont cuits ; Plats préparés dont un ingrédient, au moins, n'est pas cuit ; Sandwichs.

11- Eaux, boissons et jus de fruits et de légumes	Eaux minérales naturelles et eaux de source ; Boissons gazeuses ; Boissons non gazeuses traitées thermiquement ; Boissons à base de jus de fruit et de lait ; Jus de fruits et de légumes non pasteurisés ; Jus de fruits et de légumes, nectars et boissons fruitées pasteurisées.
12- Légumes, fruits, végétaux et produits à base de végétaux	Fruits et légumes frais ; Fruits et légumes prêts à l'emploi ; Epices, mélange d'épices et herbes aromatiques séchées ; Herbes séchées (thés, camomilles...) ; Herbes aromatiques fraîches ; Café et dérivés ; Graines germées prêtes à être consommées ; Germes ; Fruits secs (figues, dattes, pruneaux, raisins secs...) ; Graines oléagineuses (noix, amandes, arachides...) ; Préparations de mélange de fruits frais (salade de fruits...).
13- Pâtisseries et ovoproduits	Œufs en coques ; Œufs liquides pasteurisés, poudre d'œufs et d'albumen, autres œufs transformés ; Préparations pour gâteaux contenant des œufs ; Pâtisseries à la crème, crèmes, mousse de fruits, tiramisu... ; Tout autre ovoproduit ayant subi un traitement thermique.
14 - Confiseries	Chocolat, végécao et produits dérivés ; Poudre de cacao ; Autres produits de confiserie (caramels, bonbons, nougats, halkouma...)
15- Autres denrées alimentaires	Arômes et additifs en poudre ; Glaces aromatisées et sorbets ; Potages déshydratés ; Levures (sèche et fraîche) ; Sucres destinés à la consommation humaine et aux industries ; Mayonnaise stabilisée et autres sauces condimentaires ; Mayonnaise non stabilisée ; Miel ; Gélatine ; Vinaigre.

VI.2. Vue d'ensemble du métabolisme microbien

Les cellules sont dites autotrophes ou hétérotrophes selon la source de carbone utilisée. En plus du carbone, tout organisme a besoin d'énergie pour assurer sa croissance. Il y a seulement deux sources d'énergie métabolisable par les cellules : l'énergie lumineuse captée durant la photosynthèse et l'énergie provenant de l'oxydation de molécules organiques et inorganiques. Néanmoins, on peut classer les cellules en catégories nutritionnelles en fonction de la manière dont elles satisfont ces besoins.

Les phototrophes font appel à la lumière comme source d'énergie et au gaz carbonique comme source de carbone. Ce sont donc des autotrophes. Les chimiolithotrophes ont recours aux électrons provenant de composés inorganiques réduits, tels que le fer, l'azote ou le soufre, comme source d'énergie (oxydation de la matière inorganique) et au gaz carbonique comme source de carbone.

Les chimioorganotrophes font appel, comme source d'énergie, aux électrons provenant d'atomes d'hydrogène qui font partie des composés organiques (oxydation de la matière organique), lesquels servent également de source de carbone. La vaste majorité des microorganismes rencontrés en microbiologie alimentaire sont des chimioorganotrophes.

Tous les êtres vivants ont besoin d'énergie pour croître et se reproduire. Chez les chimioorganotrophes, cette énergie est obtenue au cours de la dégradation de composés organiques en substances plus simples. Ils oxydent des composés organiques (glucides, lipides et protéines) grâce à des réactions biochimiques complexes. Celles-ci libèrent l'énergie chimique qu'ils contiennent et la transfèrent à des molécules d'ADP (adénosine diphosphate) et de phosphate inorganique, énergie ensuite emmagasinée sous forme d'ATP (adénosine triphosphate), selon la réaction suivante :



L'ensemble des réactions chimiques du métabolisme qui conduisent à la synthèse d'ATP par transfert de l'énergie libérée par la dégradation d'un composé chimique, qu'il soit organique ou inorganique, constitue une division du métabolisme que l'on nomme catabolisme. Comme tous les êtres vivants, chez les microorganismes, le rôle fondamental du catabolisme est de produire de l'ATP afin d'alimenter en énergie les réactions chimiques qui synthétiseront des molécules organiques complexes à partir de composés plus simples. Ces réactions de synthèse constituent la deuxième division du métabolisme : l'anabolisme.

Les réactions anaboliques permettent d'élaborer les matériaux qui servent à la croissance et au maintien de la viabilité cellulaire. Comme ces réactions requièrent de l'énergie, l'ATP leur en fournit en se scindant pour libérer l'énergie selon la réaction suivante :



Cette association vitale entre les réactions cataboliques et anaboliques est nommée «couplage énergétique». La figure suivante résume ce concept.

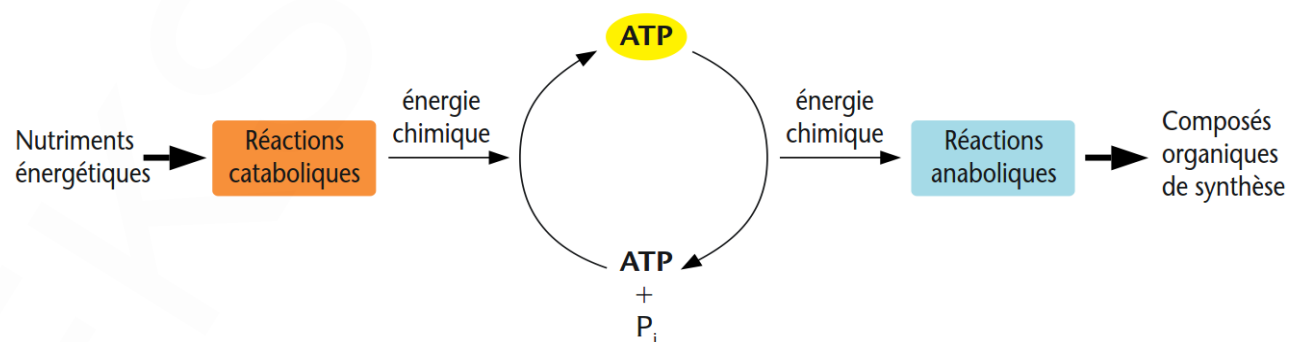


Figure 13 : Couplage énergétique et rôle de l'ATP dans le métabolisme

Pour extraire l'énergie des composés organiques et la transférer dans les molécules d'ATP qui alimenteront l'anabolisme, les chimioorganotrophes ont recours à trois voies cataboliques principales : la respiration aérobie, la respiration anaérobie et la fermentation.

VI.2.1. Transfert d'énergie et oxydoréduction

L'énergie libérée par les réactions cataboliques est associée aux électrons des molécules qui sont dégradées au cours de ces réactions. Elle est transférée à une molécule d'ADP pour former de l'ATP. Plus précisément, un groupement phosphate s'ajoute à la molécule d'ADP, moyennant un investissement d'énergie, pour former de l'ATP. Cette énergie provient donc des réactions cataboliques. D'une certaine façon, la liaison riche en énergie qui attache le troisième groupement phosphate contient l'énergie emmagasinée dans cette réaction.

Lorsque les réactions anaboliques requièrent de l'énergie, la molécule d'ATP se scinde pour libérer le troisième groupement phosphate. Ce dernier est transféré à une autre molécule que l'on dit alors « phosphorylée ». Cette molécule intermédiaire étant très instable, elle libérera le groupement phosphate pour se lier à une autre molécule et se servir de l'énergie transférée pour former une nouvelle molécule. Ainsi, ce couplage rend possibles des réactions métaboliques qui ne pourraient avoir lieu sans apport énergétique.

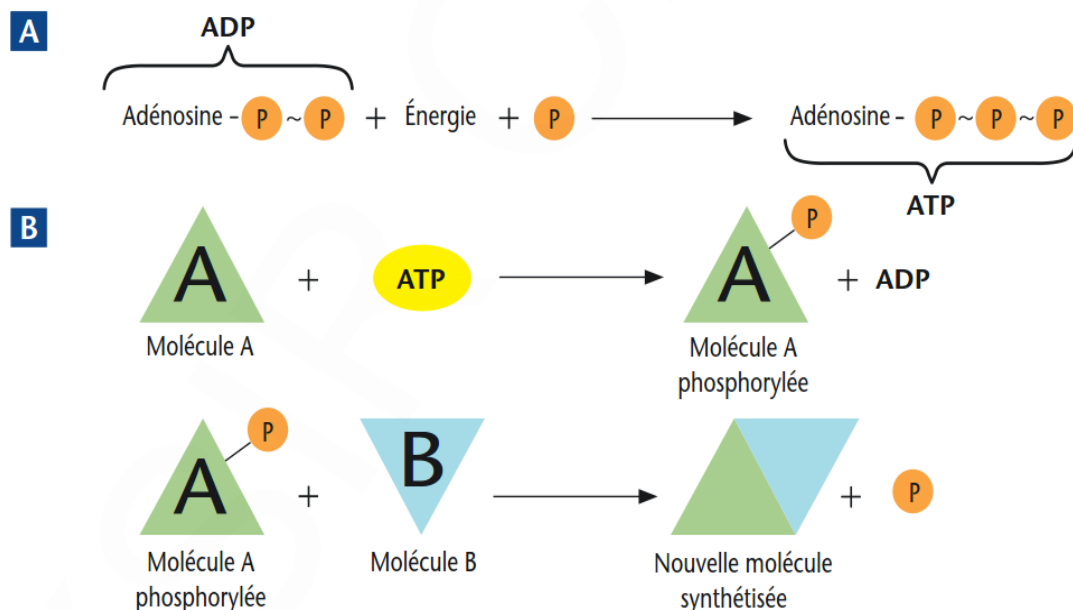


Figure 14 : Synthèse et utilisation de l'ATP. (a) Formation d'une molécule d'ATP (b) Couplage d'énergie par transfert de phosphate.

L'énergie contenue dans les molécules organiques ne peut être libérée d'un seul coup, sinon elle serait pratiquement toute perdue sous forme de chaleur, comme au cours d'une combustion. Il faut donc la transférer graduellement vers les molécules d'ATP par l'intermédiaire des cascades de réactions d'oxydoréduction.

Au départ, les nutriments énergétiques sont oxydés, c'est-à-dire qu'ils se comportent en donneurs d'électrons. Pour ce faire, une coenzyme appelée NAD^+ leur arrache deux électrons et deux protons (les ions H^+ qui leur sont associés) pour être réduite sous forme de $\text{NADH} + \text{H}^+$. Ce faisant, une partie de l'énergie chimique contenue dans les nutriments est transférée par les électrons vers le NAD^+ selon la réaction de réduction suivante :



Globalement, chaque fois qu'une molécule organique est oxydée (perte d'électrons et d'ions H^+), il y a simultanément une réduction du NAD^+ qui s'effectue. C'est pourquoi on parle de « réactions d'oxydoréduction ».

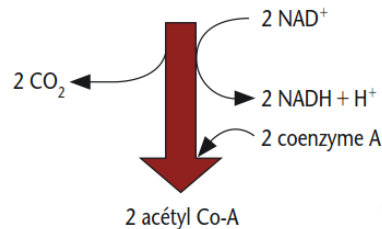
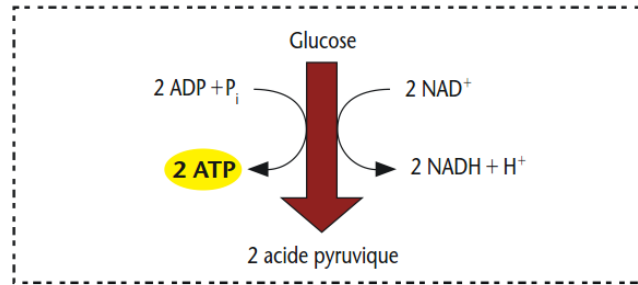
Le NADH nouvellement formé subira par la suite une oxydation à son tour pour libérer l'énergie emmagasinée, laquelle sera éventuellement transférée aux molécules d'ATP par divers processus chimiques. Cette réaction d'oxydation est la suivante :



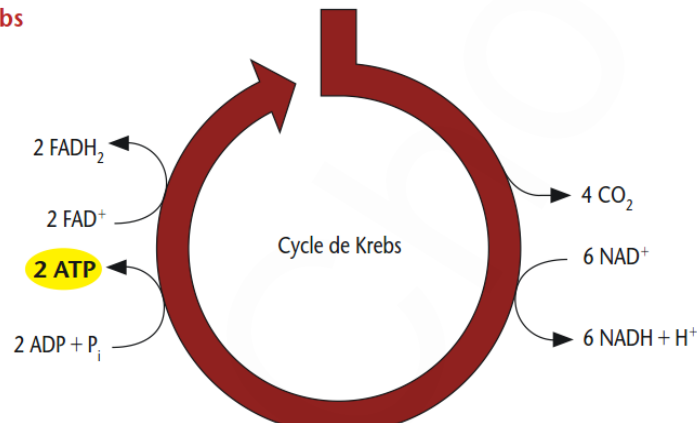
VI.2.2. Respiration aérobie

Dans cette voie catabolique, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire (O_2) et les organismes qui y ont recours sont donc dépendants de l'air pour leur survie, d'où son nom. Elle se fait en trois étapes impliquant chacune une série de réactions chimiques : la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne de transport d'électrons. Le glucose étant le glucide le plus universellement utilisé comme source d'énergie, les étapes sont résumées dans la figure 15 en analysant le catabolisme de ce sucre.

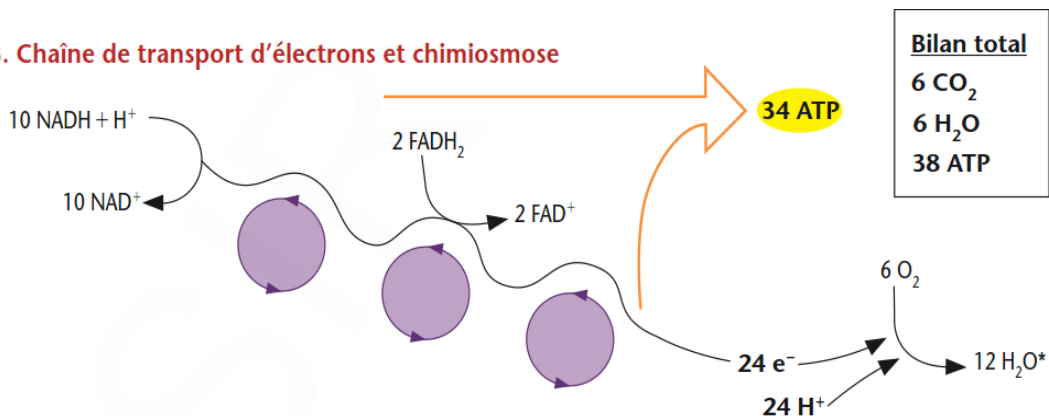
1. Glycolyse



2. Cycle de Krebs

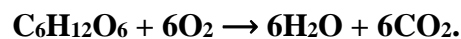


3. Chaîne de transport d'électrons et chimiosmose



Bilan total	
6 CO ₂	
6 H ₂ O	
38 ATP	

Figure 15 : Illustration simplifiée de la respiration aérobie chez les bactéries



VI.2.3. Respiration anaérobie

Contrairement aux cellules animales, certaines espèces bactériennes peuvent pallier momentanément ou de façon permanente un manque d'oxygène. D'autres ne peuvent vivre dans un milieu contenant de l'oxygène, ce dernier se révélant toxique. Elles doivent évoluer dans un environnement où l'oxygène est rare ou absent.

Pour obtenir leur énergie, elles effectueront alors la respiration anaérobie. Durant ce processus, les électrons qui sont retirés des nutriments organiques tels que le glucose suivent le même chemin que dans le cas de la respiration aérobie (glycolyse, cycle de Krebs et chaîne de transport des électrons), sauf que l'accepteur terminal n'est pas l'oxygène, mais une substance inorganique telle que le sulfate, le nitrate ou le carbonate. L'ion sulfate est généralement réduit en sulfure d'hydrogène (H₂S), alors que l'ion nitrate peut être réduit en nitrite, en oxyde d'azote (N₂O) ou en azote moléculaire (N₂). Certaines bactéries réduisent le carbonate en méthane (CH₄). Le nombre de molécules d'ATP produites par la respiration anaérobie varie d'un organisme à un autre et d'une voie métabolique à une autre. Ce nombre étant généralement inférieur aux 38 moles d'ATP générées par la respiration aérobie, le rendement énergétique est moins élevé et les anaérobies croissent habituellement moins vite que les aérobies.

VI.2.4. Fermentation

Les différentes voies fermentaires utilisées par les microorganismes sont illustrées dans le chapitre IV (voire partie IV.2.). Le tableau suivant résume les voies fermentaires utilisées par les microorganismes.

Tableau 05 : Produits de fermentation chez des espèces appartenant à divers genres microbiens

Voie de fermentation	Genre microbien	Produits terminaux
Fermentation homolactique	<i>Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus</i>	Acide lactique
Fermentation hétérolactique	<i>Leuconostoc, Bifidobacterium, Lactobacillus</i>	Acide lactique, éthanol et CO ₂
Fermentation alcoolique	<i>Saccharomyces</i>	Éthanol et CO ₂
Fermentation acétique	<i>Gluconobacter, Acetobacter</i>	Acide acétique et H ₂ O
Fermentation propionique	<i>Propionibacterium</i>	Acide propionique, acide acétique, CO ₂ et H ₂
Fermentation butyrique	<i>Clostridium (butyricum et perfringens)</i>	Acide butyrique, acide acétique, CO ₂ et H ₂
Fermentation acétonobutylique	<i>Clostridium (acetobutylicum)</i>	Butanol, acétone, isopropanol, éthanol, CO ₂ et H ₂
Fermentation acides mixtes	<i>Escherichia, Salmonella, Shigella, Proteus, Yersina, Vibrio, Aeromonas</i>	Éthanol, acide lactique, acide succinique, acide formique, acide acétique, CO ₂ et H ₂
Fermentation butanediolique	<i>Enterobacter, Serratia</i>	Éthanol, acide lactique, acide succinique, acide formique, 2,3-butanediol, acide acétique et CO ₂

VI.3. Relation : « aliments-microorganismes » et altération microbienne des aliments

L'altération microbienne peut toucher à n'importe quel type d'aliments. Elle peut concerner les aliments transformés et survenir à différents stades du processus technologique (Chapitre III). Elle concerne également les aliments bruts non transformés (comme les fruits et les légumes), ou les aliments préparés (Secteur de restauration) d'où les multiples problèmes sanitaires d'intoxications et de toxico-infections alimentaires (Chapitre IV).

Un des effets les mieux connus des microorganismes contaminants des aliments est la dégradation de la qualité. Cette qualité des produits alimentaires peut être définie au plan microbiologique de deux manières :

La qualité marchande qui concerne essentiellement les caractéristiques organoleptiques et se traduit par un attrait ou une répugnance par les consommateurs. Ses incidences économiques sont déterminantes pour l'industrie alimentaire. Les caractéristiques nutritionnelles et technologiques de l'aliment contribuent à cette qualité. Tous les aliments peuvent être le siège de prolifération microbienne, prolifération d'autant plus variée que le produit est "riche" en éléments nutritifs et placé dans des conditions favorables à la croissance microbienne. Ainsi la plupart des aliments (non soumis à des traitements antimicrobiens) ont des charges microbiennes comprises entre 10^4 et 10^6 /g. Au cours de cette prolifération, des modifications d'aspect (couleur, de texture, de flaveur (odeur et saveur) apparaissent. Les microorganismes les plus souvent rencontrés appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Clostridium sporogenes* et *Flavobacterium*. Les modifications qu'ils engendrent sont le plus souvent défavorables (odeur putride, rancissement, liquéfaction etc.).

La qualité hygiénique concerne l'innocuité d'un aliment et correspond à une qualité (seuil ; norme) qui doit être atteinte pour certains systèmes aliment-microorganisme en particulier à partir du moment où la présence du microorganisme dans le produit risque d'avoir une incidence défavorable et parfois très grave sur la santé du consommateur. L'évolution du mode de vie caractérisé par un passage de la cuisine familiale à la restauration collective, un recours à des aliments préparés à l'avance hors du domicile, l'apparition de produits nouveaux ont entraîné une augmentation des risques.

La flore microbienne est normalement associée aux plantes et aux animaux est donc potentiellement présente. De plus, un apport microbien exogène est souvent inévitable (environnement, contact, manipulations, etc...). Les origines des contaminations sont diverses et peuvent être, en plus de la flore originelle des aliments, dues aux contaminations secondaires. Ce sont les contaminations qui surviennent par diffusion des germes du milieu ambiant ou d'agents externes vers l'aliment (Éléments détaillés dans le Chapitre III).

Les aliments bruts ne sont pas stériles : ils portent des microorganismes divers et adaptés appelés germes spécifiques. Les altérations microbiennes des aliments peuvent résulter de contamination “naturelle” suivie soit de la mort, de la survie ou de la prolifération des germes en question.

Les microorganismes meurent, quand ils ne trouvent pas dans l'aliment les conditions nécessaires à leur croissance (composition, conditions d'entreposage, traitements antimicrobiens...). La survie des microorganismes est liée à des conditions n'engendrant pas la mort mais ne permettant pas la multiplication (composition, froid ...). La prolifération des microorganismes dans les aliments peut avoir lieu quand les microorganismes trouvent les conditions nécessaires à leur croissance. Dans ce cas généralement défavorable il y a altération de la qualité marchande si les germes sont saprophytes et altération de la qualité sanitaire (et parfois marchande) si les germes sont pathogènes.

La notion de charge microbienne en relation avec la qualité du produit est fonction de la nature du produit et de la nature du germe présent. Dans la nature, l'altération des aliments résulte de la prolifération microbienne par succession de flores.

La vaste majorité des microorganismes qu'on rencontre dans le domaine alimentaire sont des chimioorganotrophes qui obtiennent leur énergie à partir de la dégradation de composés organiques. Le schéma suivant illustre les grandes voies cataboliques des nutriments.

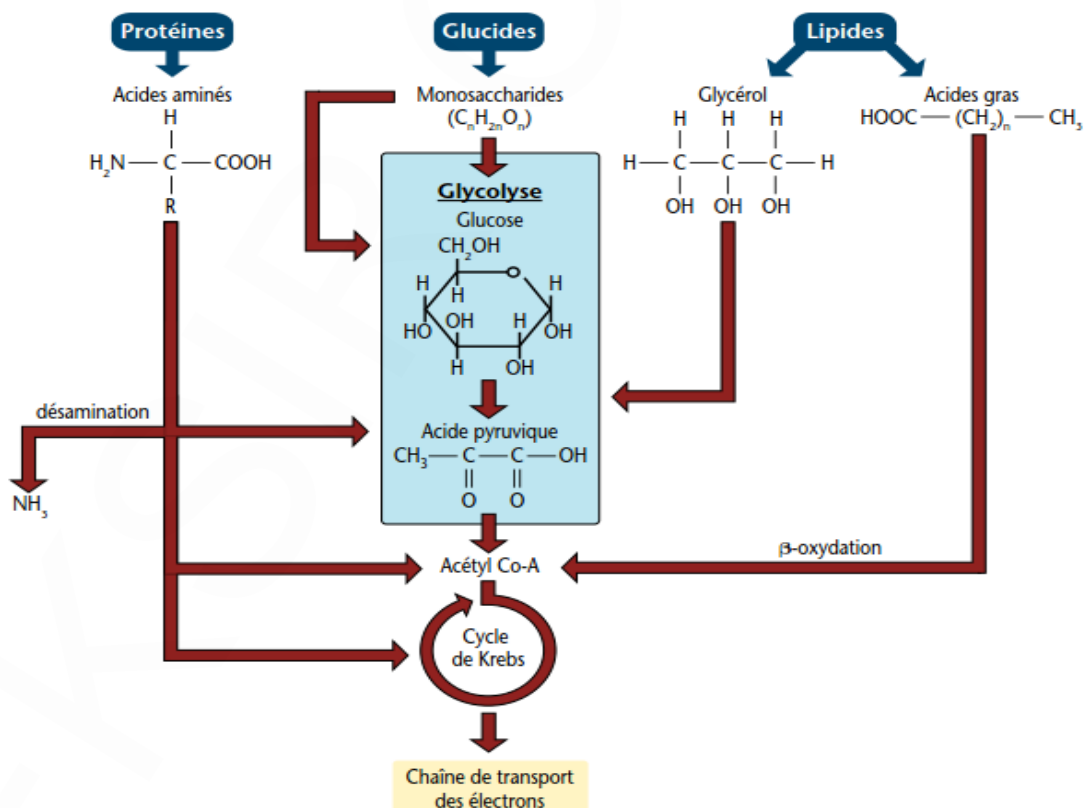


Figure 16 : Catabolisme de divers nutriments

VI.3.1. Facteurs de développement des microorganismes dans l'aliment

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

VI.3.1.a. Caractères propres à l'aliment

Structures biologiques : la présence d'enveloppes, coques, peaux etc. confère à certains aliments une excellente protection contre la prolifération microbienne (enveloppes des fruits, coquilles des noix, des œufs, peau des animaux, etc.). L'altération de ces protections naturelles se traduit souvent par une contamination et une prolifération des microorganismes. Les emballages ont pour but principal de protéger l'aliment stabilisé ou non de la contamination.

Agents antimicrobiens naturellement présents dans les aliments : le lait frais contient des lacténines et des facteurs anti-coliformes à activité limitée dans le temps. L'œuf contient du lysozyme actif sur des germes à Gram positif. Des composés comme le thymol (thym), l'eugénol (clou de girofle) ou l'aldéhyde cinnamique (cannelle) ont des activités antimicrobiennes.

Composition chimique de l'aliment : pour proliférer, les microorganismes doivent trouver dans l'aliment des substances nutritives. Les microorganismes dangereux sont pour la plupart hétérotrophes chimioorganotrophes et doivent donc trouver leur énergie dans les composants de l'aliment. Ils doivent aussi y trouver de l'eau, une source d'azote, des minéraux et pour certains des vitamines et des facteurs de croissance.

Plus la diversité de composition d'un aliment est grande (produits d'origine animale tels que les viandes et dérivés, le lait...) et plus sa susceptibilité à servir de milieu de culture est grande.

VI.3.1.b. Conditions physicochimiques

* Température

La température a une incidence directe sur le métabolisme, et donc sur la croissance microbienne, en modifiant la conformation et l'activité de toutes les protéines, dont les enzymes. Selon la température optimale à laquelle les microorganismes se multiplient, on les classera en trois grands groupes : les mésophiles, les thermophiles et les psychrophiles. Le tableau suivant expose les caractéristiques de chaque groupe.

Tableau 06 : Classes des microorganismes selon leur température optimale de croissance

Classe	Caractéristiques
Mésophiles	Ils se développent à des températures variant entre 15 et 45 °C, mais de façon optimale aux environs de 37 °C. Ce sont les microorganismes les plus utilisés en fermentation.
Thermophiles	La plupart se développent entre 45 et 70 °C avec des valeurs optimales entre 55 et 65 °C. Rarement utilisés en fermentation, on les met à contribution dans certains bioprocédés environnementaux.
Psychrophiles	Ils se développent entre 0 et 20 °C avec des valeurs optimales entre 10 et 15 °C.

* pH

Le pH a un impact majeur sur la croissance des cellules microbiennes. La majorité des bactéries ont une croissance optimale dans un intervalle de pH près de la neutralité (entre 6,5 et 7,5). Toutefois, plusieurs espèces microbiennes peuvent croître à des intervalles de pH différents. Pour cet aspect, on classe les microorganismes en différentes catégories : les acidophiles, les neutrophiles et les alcalophiles (ou alcalinophiles). Le tableau suivant présente leurs caractéristiques respectives.

Tableau 07 : Classes des microorganismes selon leur tolérance aux variations de pH

Classe	Caractéristiques
Acidophiles	Optimum de croissance entre pH 1 et 5,5
Neutrophiles	Optimum de croissance entre pH 5,5 et 8,0
Alcalophiles	Optimum de croissance entre pH 8,0 et 11,5

* Activité d'eau A_w

La disponibilité de l'eau est caractérisée par son activité. Ce paramètre correspond au rapport de pression partielle de l'eau dans l'aliment à celle de l'eau pure. L' a_w varie entre 0 et 1. Les microorganismes capables de se développer dans des produits à faible activité d'eau sont qualifiés de xérophiles, ceux en milieu fortement sucrés ou salés respectivement d'osmophiles et de halophiles. Les moyens d'abaisser l'activité de l'eau sont nombreux : physiques (congélation, déshydratation) ou chimiques par ajout d'additifs (salage, sucrage..). Ils conduisent respectivement à des aliments congelés, séchés, aux salaisons et saumures, confitures et bonbons. Pour une $a_w < 0,65$ aucun microorganisme ne peut se multiplier (mais ils peuvent survivre). Pour des activités d'eau $< 0,85$ aucun microorganisme pathogène ne peut cultiver exception faite de certaines moisissures excrétrices de mycotoxines.

Le très fort pourcentage de mortalité microbienne observé au cours de la déshydratation, du salage, de l'addition de sucres ou de la congélation est dû, en grande partie, à la diminution d'activité de l'eau.

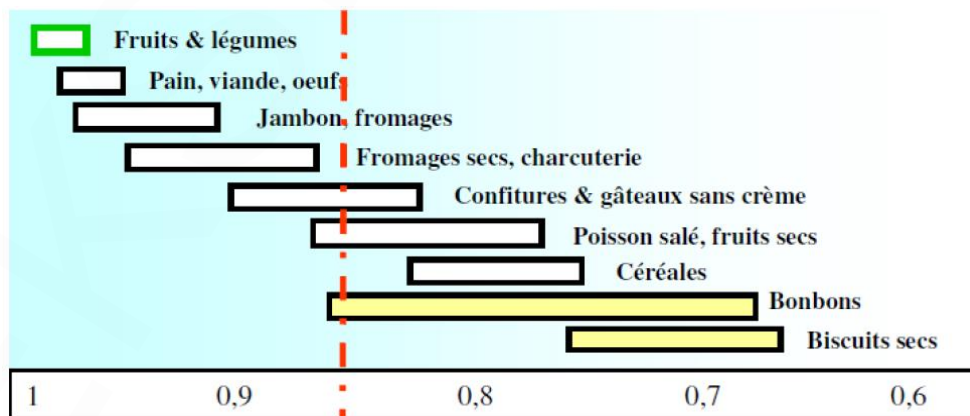







Figure 17 : Activité d'eau pour les principales catégories des aliments

* L'oxygène et le stress oxydatif

Une grande proportion des microorganismes requiert de l'oxygène pour leur croissance cellulaire. Cependant, le pouvoir oxydant de l'oxygène peut être nuisible pour l'ensemble des microorganismes. En effet, plusieurs produits issus de la réduction de l'oxygène sont extrêmement toxiques. Ce sont de puissants agents oxydants qui détruisent rapidement les constituants cellulaires, tels le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. Toutefois, les microorganismes munis d'un catabolisme aérobie possèdent des enzymes les protégeant de ces substances toxiques produites à partir de l'oxygène. Il en est de même pour les espèces microbiennes qui tolèrent la présence d'oxygène en concentrations variables même si elles ne l'utilisent pas. Parmi ces enzymes, on trouve la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase, qui catalysent la destruction des radicaux libres produits à partir de l'oxygène. Les microorganismes anaérobies stricts sont dépourvus de ces enzymes et ne tolèrent donc pas l'oxygène.

À cet égard, on regroupe les microorganismes en cinq classes en fonction de leur besoin en oxygène. Le tableau suivant présente la définition de ces classes.

Tableau 08 : Classes des microorganismes selon leur besoin en oxygène

Classe	Caractéristiques	
Aérobies stricts	Ils exigent de l'oxygène pour se développer et meurent en son absence.	
Anaérobies stricts	Ils ne tolèrent pas la présence d'oxygène et meurent en sa présence.	
Anaérobies facultatifs	Ils se développent de façon optimale en présence d'oxygène, mais ils peuvent aussi croître en son absence.	
Anaérobies aérotolestants	Ils n'ont pas besoin d'oxygène pour se développer, mais ils en tolèrent la présence et se développent autant en sa présence qu'en son absence.	
Microaérophiles	Ils se développent en présence de 2 à 10 % d'oxygène seulement.	

Références :

1. Barredo J-L. (2005). *Microbial Enzymes and Biotransformations*, Humana Press, New Jersey, 320P.
2. Béal C. et Sodini I. (2003). *Fabrication des yaourts et des laits fermentés*, Techniques de l'Ingénieur f6315, Paris-France, 16 p.
3. Branger A. (2004). *Fabrication de produits alimentaires par fermentation : l'ingénierie*, f3501, Paris-France, 17 p.
4. Corrieu G. et Luquet F-M. (2005). *Bactéries lactiques et probiotiques*, édition Tec. et Doc. Lavoisier, Paris France, 307 p.
5. Corrieu G. et Luquet F-M. (2008). *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*, édition Tec. et Doc. Lavoisier, Paris France, 849 p.
6. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K-H. et Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume 3: the Firmicutes*, Springer USA, 1422 p.
7. Foucaud-Scheunemann C. et Helinck S. (2009). *Les micro-organismes au cœur des biotechnologies*, Techniques de l'Ingénieur bio550, Paris-France, 15 p.
8. Gibson G. R. et Williams C. M. (2000). *Functional foods : Concept to product*, CRC Press LLC, USA, 356p.
9. Glazer A. N. and Nikaido H. (2007). *Microbial Biotechnology ; fondamentales of applied microbiology, second édition* , CAMBRIDGE University Press, New York .576P.
10. Guiraud J-P. (2012) *Microbiologie alimentaire*. Dunod. 651p. Paris.
11. Guiraud J-P et Rosec J-P. (2004) *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*, Association Française de Normalisation AFNOR, France.304 p.
12. Hutkins R-W. (2006) *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. IFT Press series, Blackwell Publishing, USA. 473 p.
13. Joffin J-N. et Leyral G. (2006). *Microbiologie technique, 4^{ème}édition : dictionnaire des techniques*, CRDP d'Aquitaine. 368 p.
14. JORA n° 39 du 2 juillet 2017. Arrêté interministériel du 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.
15. JORA n° 32 du 23 mai 2004. Arrêté du 27 mars 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des organismes microbiens pour le lait fermenté.
16. JORA n° 43 du 4 juillet 2004. Arrêté du 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes dans les laits fermentés.
17. Marth E. H. et Steele J. M. (2001). *Applied dairy microbiology, 2nd Edition*, Marcel Dekker, Inc, New York, USA, 744 p.
18. Mozzi F., Raya R. R. et Vignolo G. M. (2010). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, Wiley-Blackwell Publishing, USA. 393 p.
19. Nollet L. M. L. et Toldrá F. (2010). *Handbook of Dairy Foods Analysis*, CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 900 p.

20. Ray B. et Bhljnia A. (2008). Fundamental food microbiology, fourth edition Taylor & Frands Group CRC Press, 492 p.
21. Robinson R. K. (2002). Dairy Microbiology Handbook, third Edition, John Wiley and Sons, Inc., New York USA, 764 p.
22. Shetty K., Paliyath G., Pometto A. et Levin R. E. (2006). Food biotechnology, Second Edition, CRC Press Taylor & Francis Group, 1982 p.
23. Scriban R (1999). Biotechnologie, 5ème édition Tec et Doc LAVOISIER, Paris. 1042P.
24. Solieri L. et Giudici P. (2009). Vinegars of the World Springer-Verlag Italia, 297 p.
25. Taylor L-H, Latham S-M and Woolhouse M-E (2001). Risk factors for human disease emergence. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, vol. 356, 29 juillet 2001, pp 983–989.
26. Tessier L. (2018). Technologies des bioprocédés industriels, 2^{ème} édition. CCDMD Canada, 491P.