

EVOLUTION OF BACTERIAL CONTAMINATION WITHIN MUSCLES DURING STORAGE UNDER AIR OR VACUUM PACKAGED CONDITIONS.

MICHELE AYROULET-MARTIN, JEANNE FOURNAUD and ROBERTE LAURET

Laboratoire de recherches sur la viande de l'INRA  
Centre National de recherches zootechniques,  
78350 Jouy-en-Josas (FRANCE)

Bacterial contamination within the muscles increases during storage with or without air. It can reach  $5 \times 10^4$  bacteria/g in vacuum-packaged meat, stocked at  $0-2^\circ\text{C}$ .

This bacterial contamination appears to vary according to surface pollution but is very variable from one muscle to another. The cut called "Tende de Tranche" always seems to be the less contaminated one.

Microbial populations within the muscle are similar to those observed on the surface; mainly Pseudomonas and Microbacterium for storage under air, Lactobacillus and Microbacterium for storage under vacuum packaged conditions.

ei kummattu NO-myglob → metmyoglob / hanku  
ilma ei valo  
kummattu NO-M → metmyoglobin  
ilma j. valo

EVOLUTION DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE A COEUR DES MUSCLES AU COURS DE CONSERVATION A L'AIR OU SOUS VIDE.

MICHELE AYROULET-MARTIN, JEANNE FOURNAUD et ROBERTE LAURET .

Laboratoire de recherches sur la viande de l'I.N.R.A.  
Centre National de recherches zootechniques ,  
78350 Jouy-en-Josas (FRANCE)

La contamination bacterienne à coeur du muscle augmente au cours de conservation, que ce soit en présence ou en absence d'air. Elle peut atteindre  $5 \times 10^4$  bactéries par gramme dans une viande conditionnée sous vide et stockée à  $0-2^\circ\text{C}$ .

Elle apparaît être fonction de la pollution de surface mais très variable d'une pièce de viande à l'autre; le tende tranche se montre toujours le moins contaminé.

Les populations microbiennes dans le muscle sont à l'image de celles observées en surface : essentiellement Pseudomonas et Microbacterium pour un stockage à l'air, Lactobacillus et Microbacterium pour une conservation sous vide .

Pseudomonas kummu DFD lihava nappati → kummu /  
kummu /  
→ lihava p H > 6.0 ei vakuumipakattu

ENTWICKLUNG DER BAKTERIELLEN BESIEDELUNG INNERHALB DER MUSKELN WAHREND LUFT-ODER VAKUUM AUFBEWAHRUNG.

MICHELE AYROULET-MARTIN, JEANNE FOURNAUD und ROBERTE LAURET .

Laboratoire de recherches sur la viande de l'I.N.R.A.  
Centre National de recherches zootechniques,  
78350 Jouy-en-Josas (FRANCE).

Die bakterielle Besiedelung innerhalb der Muskeln steigt während der Aufbewahrung mit oder ohne Luft an. Bei im Vakuum (0-2°C) aufbewahrtem Fleisch, kann sie  $5 \times 10^4$  Bakterien/g erreichen.

Diese Besiedelung scheint von der Oberflächenverunreinigung abhängig zu sein, aber sie ist bei jedem Muskel verschieden. Die "Tende de Tranche" Muskel ist anscheinend immer am wenigsten besiedelt.

Die Bakterien-Wachstumsdichte in den Muskeln ist der der Oberfläche ähnlich: hauptsächlich Pseudomonas und Microbacterium bei der Luftaufbewahrung und Lactobacillus und Microbacterium bei der Vakuumaufbewahrung .

РАЗВИТИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ СЕРЕДИНЫ МЫШЦ В ТЕЧЕНИИ ИХ СОХРАНЕНИЯ В ВОЗДУХЕ ИЛИ В ВАКУУМЕ.

МИШЕЛЬ ЭРУЛЕ - МАТИН, ЖАННА ФУРНО и РОБЕРТА ЛОРЕ.

Лаборатория изучения качества мяса (I.N.R.A.)  
Научно-исследовательский зоотехнический центр,  
78350 Жуи -ан - Жозас /ФРАНЦИЯ/.

Микробиологическое загрязнение середины мышц повышается с продолжительностью их сохранения, как в присутствии так и в отсутствии воздуха. Оно может достичь  $5 \times 10^4$  бактерий в граммe мяса, обработанного в вакууме и сохраняемого при температуре 0 - 2 С.

Оно зависит от поверхностного загрязнения мяса, но вариации между различными частями мяса существенные; кусок называемый "tende de tranche" является всегда наименее загрязненным.

Виды микробиологического населения внутри мышц те же что на поверхности: главным образом Pseudomonas и Microbacterium при сохранении на воздухе, Lactobacillus и Microbacterium при сохранении в вакууме.

## EVOLUTION DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE A COEUR DES MUSCLES AU COURS DE CONSERVATION A L'AIR OU SOUS VIDE

MICHELE AYROULET-MARTIN , JEANNE FOURNAUD et ROBERTE LAURET

Laboratoire de recherches sur la viande de l'I.N.R.A.  
Centre National de Recherches Zootechniques  
78350 JOUY-en-JOSAS (FRANCE)

## INTRODUCTION

De nombreux auteurs ont étudié les problèmes microbiologiques posés par la conservation des viandes en fonction, par exemple, de la température, de l'humidité relative, du taux de pollution microbien ou de la composition de la flore de contamination. Les travaux les plus récents se sont attachés à déterminer l'allongement de la durée de conservation par l'utilisation du "sous vide" ou par l'emploi d'atmosphère contrôlée (KITCHELL 1971, FOURNAUD et al, 1973, HEINZ, 1974). Toutes ces études concernent essentiellement les pollutions de surface.

Cependant divers auteurs: LANGRAND (1923), SACQUEPÉE (1913), CHRETIEN cité par MONVOISIN (1923) et ELMOS-SALAMI et WASSEF (1971) ont montré que les bactéries de surface pénètrent dans les muscles et peuvent y demeurer viables. Toutefois leurs essais effectués avec des viandes stériles ensemencées en général par des bactéries pathogènes ont été réalisés dans une zone de températures comprises entre 7 et 37°C, températures qui sont loin d'être celles utilisées pour la conservation des viandes.

Il paraît indispensable de savoir si la pénétration des bactéries à coeur des muscles se produit au cours de stockage à basse température (0 + 2°C) car, dans ce cas, se posent des problèmes de technologie et de santé publique : dans notre pays, en effet, la viande est consommée très peu cuite (moins de 60°C) à coeur avec les bactéries qu'elle renferme et qui sont demeurées viables.

Le but de ce travail est de suivre la pollution microbienne dans la viande de boeuf au cours de divers modes de conservation pour connaître à la fois son importance et la nature des bactéries rencontrées.

## MATERIEL ET METHODES

Nature et traitement des viandes . L'expérimentation est réalisée en deux séries A et B.

Série A : les six demi-carcasses de vaches de réforme sont préparées dans un atelier de coupe attenant à l'abattoir où les animaux ont été abattus. A trois jours post mortem on prélève cinq muscles par demi-carcasses : Semimembranosus (Tende de Tranche), Semitendinosus, Tensor fasciae latae, Biceps femoris et Tripicpitus brachii caput longum . Ces muscles sont ensuite parés superficiellement .

Quatre groupes de cinq muscles sont alors conditionnés dans des sacs en PVDC (perméabilité à l'oxygène, 63ml/m<sup>2</sup>/ 24 h/atm.). Après mise sous vide à l'aide d'une machine à cloche KRAMER et GREBBE (vide résiduel 12 mm Hg) , le film est rétracté dans de l'eau à 95°C. Les quatre groupes ainsi obtenus et les deux autres constitués par les muscles non emballés sont stockés en chambre froide à + 2°C avec une humidité relative de l'air de 63 - 65 % .

Série B : les viandes sont découpées dans un atelier central situé à Paris, les douze demi-carcasses utilisées provenant de divers abattoirs français. L'ensemble des muscles cruraux antérieurs (Vastus lateralis, Vastus intermedius, Vastus medialis et Rectus femoris ) sont parés superficiellement puis cet ensemble est divisé longitudinalement en deux parties équivalentes. L'une des moitiés se trouve emballée sous film EPE (trois films soudés : éthylène vinyl acétate, PVDC, éthylène vinyl acétate irradié, perméabilité à l'oxygène 12 à 22 ml/ m<sup>2</sup> / 24 h/atm.), l'autre sous film PM (polyoléfine modifiée, perméabilité à l'oxygène 12 à 15 ml/m<sup>2</sup>/ 24 h/ atm.). Après mise sous vide à l'aide d'une machine à cloche Eurovac (vide résiduel 2-4 mm Hg) les paquets obtenus passent à travers un tunnel Soplaryl à infra-rouge pour rétracter le film EPE et pour sceller le film PM autour du muscle. Les 24 pièces sont ensuite placées en chambre froide à 0 + 1°C .

Techniques microbiologiques

Prélèvements des échantillons . Les prélèvements sont réalisés :

- avant conservation pour toutes les séries;
- au septième et quatorzième jours sur un groupe de cinq muscles de la série A conservés à l'air ;
- au 7ème, 14ème, 21ème et 28ème jours sur un groupe de cinq muscles de la série A conservés sous vide et sur trois pièces sous EPE et trois pièces sous PM de la série B.

Le prélèvement de surface consiste à enlever stérilement une pellicule de viande de 5 x 5 cm . Le prélèvement à coeur du muscle qui a lieu seulement après conservation, est réalisé à l'aide d'un myectome (PANTALEON et al, 1955) après avoir soigneusement brûlé et enlevé la partie superficielle de la pièce de viande .

Analyses microbiologiques . Les techniques et les milieux utilisés sont décrits dans un article précédent (FOURNAUD et al, 1973). Seul le dénombrement de Microbacterium thermosphactum se trouve être différent : le milieu de base de GARDNER (1966) est remplacé par le milieu TVG<sub>5</sub>P.

Interprétation des résultats . Avant tout calcul (calcul des moyennes et calculs statistiques ) les données numériques obtenues sont transformées en données logarithmiques.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Conservation à l'air . En surface des muscles, malgré une humidité relative de l'air ambiant peu élevée, la flore totale s'élève rapidement : de 3,3 x 10<sup>3</sup> bactéries/ cm<sup>2</sup> avant conservation, elle atteint 1,0 x 10<sup>5</sup> bactéries/ cm<sup>2</sup> à sept jours et 2,5 x 10<sup>7</sup> bactéries/ cm<sup>2</sup> à quatorze jours (fig.1). Ceci est dû à une forte croissance des pseudomonas et à celle, un peu moindre, de Microbacterium . Les microcoques et Leuconostoc se

multiplient moins vite mais relativement régulièrement au cours du stockage tandis que les entérobactéries et les lactobacilles se développent seulement pendant la deuxième semaine. A coeur du muscle le nombre total de bactéries n'est pas négligeable. Son facteur de multiplication apparait, en moyenne, sensiblement du même ordre de grandeur qu'en surface de la viande pendant la première semaine mais moins important au cours de la deuxième semaine (fig.1). Les valeurs extrêmes des dénombrements montrent des écarts élevés: de moins de 10 bactéries/g à 4000 bactéries/g à 7 jours et de 260 à 24000 bactéries/g à 14 jours. Les microorganismes présents se révèlent être les pseudomonas et Microbacterium dont les proportions au 7ème et 14ème jour sont égales à celles observées en surface: les pseudomonas sont 5 fois plus nombreux que Microbacterium après une semaine et 10 fois plus après la deuxième semaine. Les microcoques sont décelés dans deux muscles sur cinq à 7 jours et dans aucun à 14 jours; aucune entérobactérie n'est mise en évidence à ces deux stades de la conservation bien que leur nombre en surface atteigne dans un cas  $7,1 \times 10^5$  bactéries/cm<sup>2</sup>.

Conservation sous vide. En surface des muscles de la série A, la flore totale commence par décroître légèrement pendant la première semaine pour augmenter ensuite de plus de 1000 fois au cours des 3 semaines suivantes (fig. 2 et 3); cette remontée résulte du développement plus ou moins rapide des lactobacilles, Leuconostoc, Microbacterium et aussi de celui des entérobactéries. Les pseudomonas, après une semaine de latence, se multiplient jusqu'au 21ème jour pour diminuer ensuite, tandis que les microcoques restent sensiblement stables. La composition de la flore dominante est, de ce fait, complexe et variable au cours du temps. Au 28ème jour elle est constituée par les lactobacilles et Leuconostoc tandis que Microbacterium et les entérobactéries se trouvent immédiatement sous-dominants.

A coeur l'augmentation du nombre de bactéries n'est notable qu'après le 14ème jour. Le facteur de multiplication est alors, en moyenne, comparable à celui de surface (fig.2 et 3). Les écarts observés entre les dénombrements extrêmes, négligeables à 7 et 14 jours (moins de 10 fois), s'accroissent au cours du temps: moins de 10 à  $4,6 \times 10^2$  bactérie/g à 21 jours et 60 à  $5,6 \times 10^4$  bactéries/g à 28 jours. Le tendon de tranche (Semimembranosus) renferme la plus petite quantité de bactéries. Les bactéries à coeur des muscles présentent, en moyenne, sensiblement le même équilibre qu'en surface. Ainsi, à 4 semaines, les lactobacilles et Leuconostoc dominent mais l'écart entre ces bactéries et celles immédiatement sous-dominantes (Microbacterium et entérobactéries) est plus important qu'en surface. Toutes les populations microbiennes ne sont pas mises en évidence dans tous les muscles d'un même groupe sauf pour Leuconostoc à quatre semaines; les lactobacilles sont absents du seul tendon de tranche à 21 et 28 jours.

Dans la série B, les résultats observés en surface et à coeur des muscles sont identiques sous EPE et PM; aussi il n'est fait aucune distinction quant au matériau de conditionnement. En surface des pièces de viande, l'évolution de la flore totale est semblable à celle de la série A (fig.4 et 5). L'élévation du nombre de bactéries provient de la multiplication des lactobacilles, le faible développement des entérobactéries ne jouant aucun rôle. Toutes les autres bactéries restent stables (pseudomonas, Acinetobacter) ou diminuent (Microbacterium, microcoques). A coeur, les bactéries apparaissent dès la première semaine et leur nombre augmente tout au long de la conservation, avec en moyenne, le même facteur de multiplication qu'en surface (fig. 4 et 5).

Après quatre semaines de stockage le nombre total de bactéries dans le muscle est, en moyenne, du même ordre de grandeur que pour la série A. L'écart, entre les dénombrements extrêmes est important dès le septième jour (de moins de dix bactéries/g à  $1,1 \times 10^3$  bactéries/g) et se maintient au cours du temps (de 90 à  $2,1 \times 10^4$  bactéries/g, par exemple à quatre semaines). Les équilibres microbiens à coeur apparaissent, en moyenne, comme les reflets de ceux de surface sauf au 14ème jour. Dans ce cas Acinetobacter se montre le plus nombreux comme à sept jours alors qu'en surface il est dix fois moins important que les lactobacilles. Comme dans la série A toutes les populations microbiennes ne sont pas décelées dans tous les muscles d'un même groupe sauf pour Microbacterium à 14 et 21 jours et les lactobacilles de 21 à 28 jours. Les entérobactéries ne sont dénombrées qu'une fois à quatorze jours. Il faut aussi remarquer que le nombre de muscles contaminés par les bactéries à gram négatif diminue en cours de conservation.

Influence de la nature du muscle. Dans nos conditions expérimentales la pénétration des bactéries dans le muscle en fonction de la multiplication microbienne en surface des pièces de viande semble être indépendante de la nature du muscle sauf pour le Semimembranosus (fig.6). Dans ce cas elle se montre plus faible surtout lors de la conservation sous vide. Pour l'ensemble des muscles elle s'effectue de façon inégale en fonction de la croissance bactérienne de surface ou en fonction de la contamination totale de cette surface. Ainsi, par exemple, le nombre de bactéries à coeur du Semitendinosus ( $2,2 \times 10^2$  /g) à trois et quatre semaines est identique pour une multiplication de surface de 8 fois ou de 4.000 fois ou bien pour une pollution totale de  $1,9 \times 10^5$  /cm<sup>2</sup> ou de  $1,3 \times 10^7$  /cm<sup>2</sup>. Cependant la contamination à coeur du muscle n'est pas indépendante des phénomènes microbiens de surface. Les différents coefficients de corrélation entre le log du nombre de bactéries dans le muscle et, soit le log du facteur de multiplication des microorganismes en surface (0,64 série A et 0,46 série B), soit le log de la flore totale de surface (0,66 série A et 0,62 série B) sont significatifs avec une probabilité d'au moins 95%. Toutefois ils laissent apparaître une variation non contrôlée relativement importante.

#### CONCLUSION

Les équilibres microbiens observés à coeur du muscle sont à l'image de ceux trouvés en surface de la viande avec, peut-être, un léger décalage dans le temps pour la conservation sous vide. La viande agit donc de la même façon sur toutes les bactéries saprophytes qu'elles soient à gram positif ou à gram négatif. Il ne semble pas qu'une multiplication bactérienne s'effectue à coeur du muscle puisque, dès qu'une population microbienne décroît en surface, elle diminue *in situ*. Au contraire on assisterait plutôt à la mort des bactéries, leur nombre en cellules viables ne pouvant rester constant ou augmenter que grâce à un apport continu en provenance de la surface.

La pollution bactérienne à coeur du muscle n'est pas toujours négligeable. Elle peut atteindre  $10^4$  bactéries/g en 14 jours de conservation à l'air à 2°C ou, sous vide, à 0 + 1°C; elle ne semblerait pas liée à la nature du muscle mais une certaine variabilité entre animaux peut avoir masqué des différences existantes. Les grandes variations observées dans le taux de contamination ne peuvent trouver, pour l'instant, une explication rationnelle (BILLON, 1976). Elles dépendraient de phénomènes dont le déterminisme reste à expliciter.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BILLON J. 1976 - Communication personnelle .  
 CHRETIEN (cité par MONVOISIN) 1923 - Dunod éditeurs .  
 ELMOSSALAMI E. and WASSEF N. -1971 - Zbl Vet.Med. ,B 18 ,329.  
 FOURNAUD J., SALÉ P. et VALIN Ch. 1973- 19ème réun européenne des Chercheurs en Viande, Paris.  
 GARDNER G.A. 1966- J.appl.Bact. ,29 , 455 .  
 HEINZ G. 1974 - Fleischwirtschaft , 54 , 1635.  
 KITCHELL A.G. 1971- 17th eur.Meet,Meat Res.Workers , Bristol.  
 LANGRAND P. 1911- Hygiène, viande lait , 5 , 581.  
 PANTALEON J., CAZAILLET M. et ROSSET R. 1955- Bull.Acad.vet. , 28 ,155 .  
 SACQUEPEE E. 1913 - Comptes-rendus Soc.Biol. ,75 , 491.

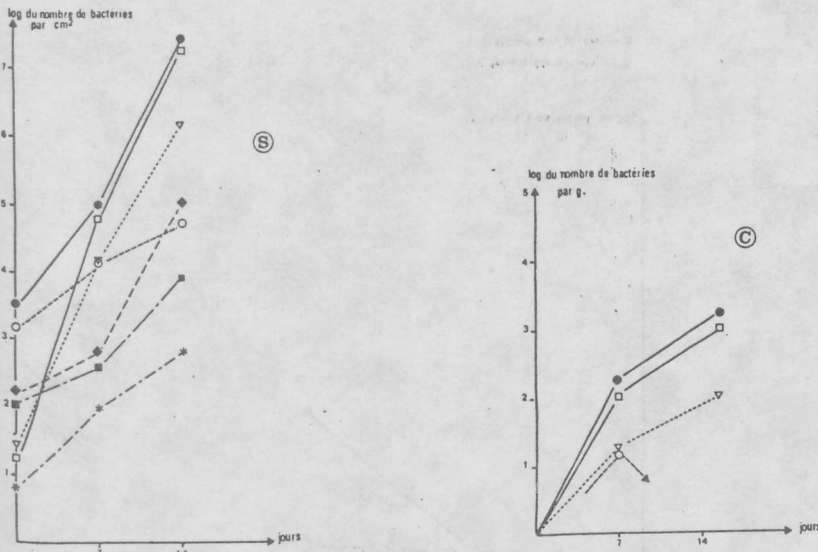


Fig.1 Evolution des diverses populations bactériennes en surface (S) et à cœur (C) au cours d'une conservation en présence d'air à 2°C. (E.B. 63-64%)

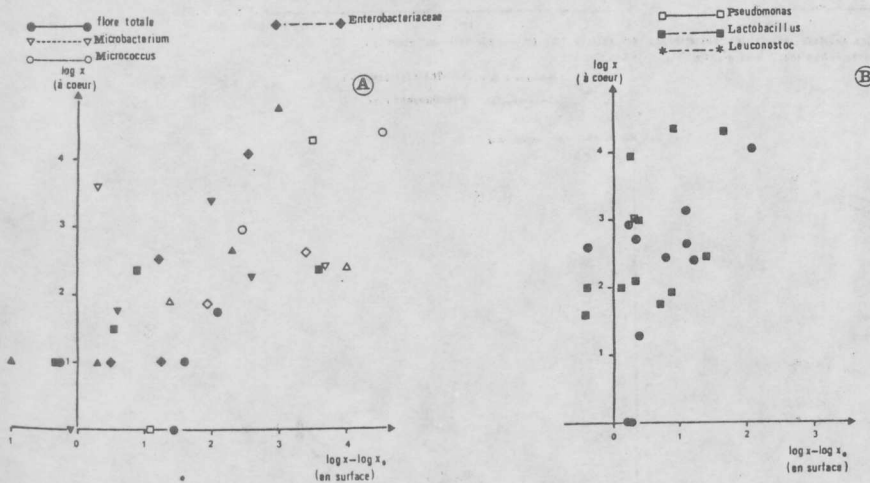


Fig. 6 Relation entre le logarithme du facteur de multiplication des bactéries en surface des muscles et le logarithme de la contamination à cœur de ces muscles.

Conservation nombre de bactéries avant (x) et après (x) signe plein sous PVOC, signe clair à l'air.

- semi membranous
- semi tendinosus
- ▼ Tricipitis brachii caput longum
- ◆ biceps femoris
- ▲ tensor fasciae latae
- rectus femoris } sous E.P.E.
- vastus lateralis } sous E.P.E.
- rectus femoris } sous P.M.
- vastus lateralis } sous P.M.

K1:6

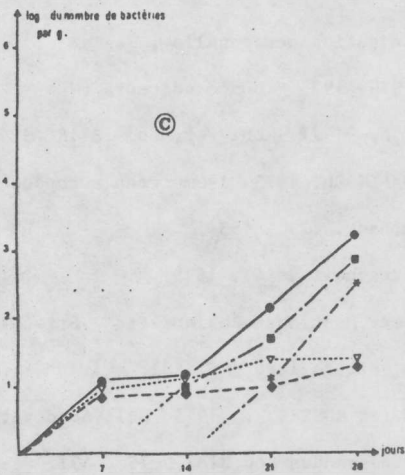
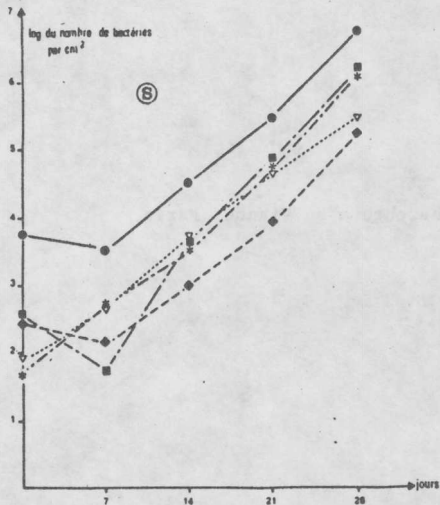


Fig 2 : Evolution des diverses populations bactériennes en surface (S) et à cœur (C) au cours d'une conservation sous PVDC à 23°C.

● flore totale  
 □ Leuconostoc  
 △ Enterobacteriaceae

■ Lactobacillus  
 △ Microbacterium

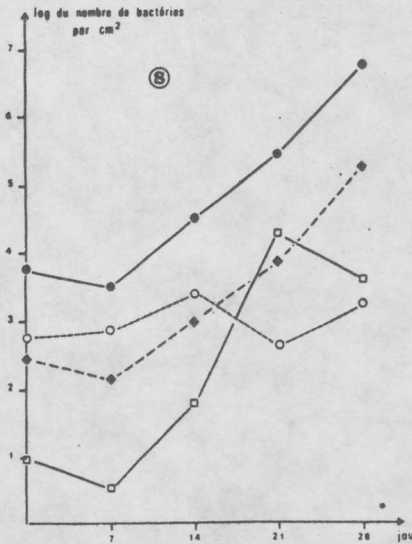
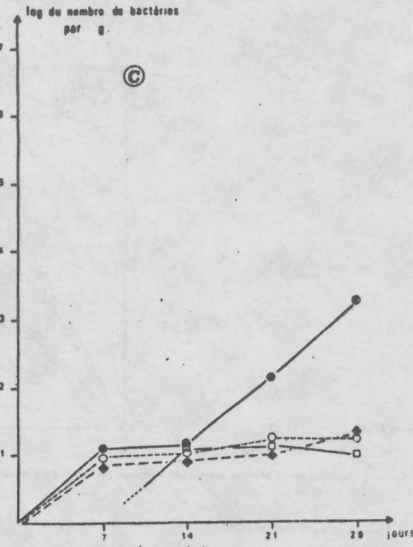


Fig 3 : Evolution des diverses populations bactériennes en surface (S) et à cœur (C) au cours d'une conservation sous PVDC à 23°C.

● flore totale  
 □ Micrococcus



● Enterobacteriaceae  
 □ Pseudomonas

30-300

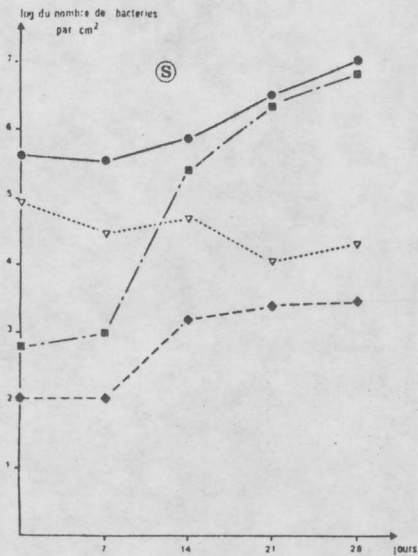
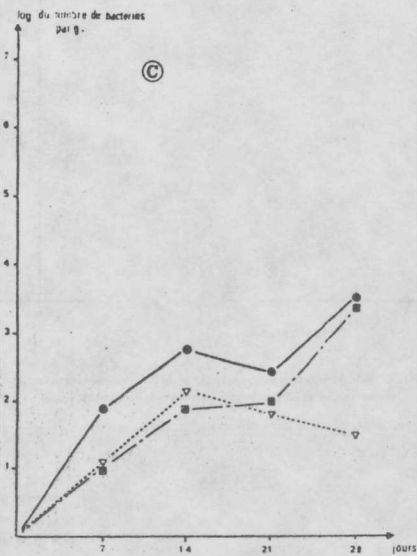


Fig 4 : Evolution des diverses populations bactériennes en surface (S) et à cœur (C) au cours d'une conservation sous EPE ou PM à 21°C.



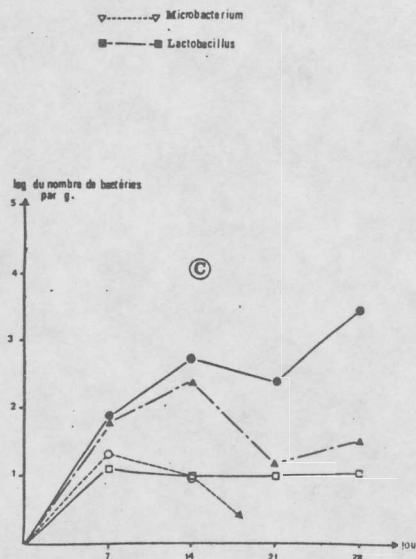
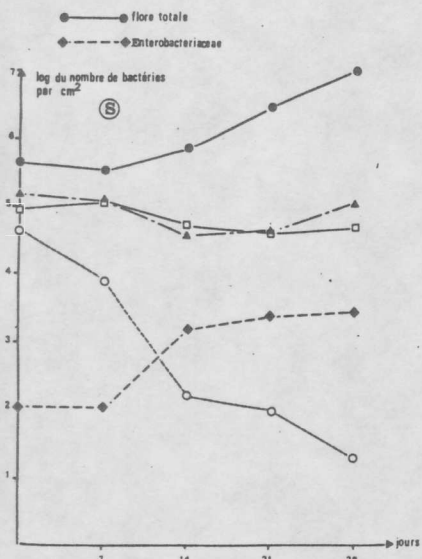
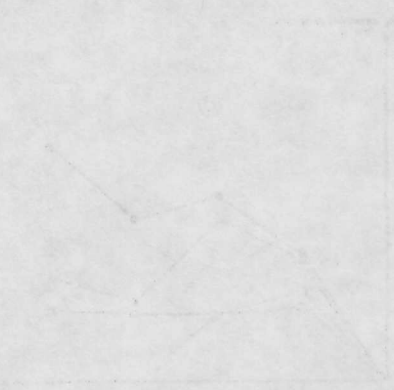


Fig 5 : Evolution des diverses populations bactériennes en surface (S) et à cœur (C) au cours d'une conservation sous EPE ou PM à 0°C

○ — Micrococcus  
 ▲ — Acinetobacter  
 ● — flore totale

□ — Pseudomonas  
 ◆ — Enterobacteriaceae



Faint, illegible text or a legend located below the two graphs, possibly describing the data series or providing a title for the charts.