

Effet du conditionnement sous vide de viandes hachées réfrigérées, contaminées par deux souches d'Enterobacteriaceae (Salmonella typhimurium et E. coli).

M. DUCHENE; A. BOUILLET; D. WEBER; Cl. DEROANNE

Département de Technologie Agro-Alimentaire et Forestière
Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat à Gembloux, Belgique

1. INTRODUCTION

Le conditionnement de la viande en l'état sous vide ou sous atmosphère modifiée permet d'augmenter sensiblement la durée de conservation en réfrigération (HESS E. & al., 1980) (BRECHT, P.E., 1980). Les modifications de l'atmosphère influencent fortement le comportement de la microflore qui contamine la viande. La réponse individuelle des microorganismes à ces nouvelles conditions dépend de leurs exigences respiratoires. Les germes d'altération normalement rencontrés (*Pseudomonas* et *Achromobacter*) sont progressivement "remplacés" par des germes à caractère plus anaérobie et/ou plus tolérants vis-à-vis de la présence de CO₂ (J. PANTALEON, 1979). L'impact de ces différents conditionnements sur des germes réputés dangereux ou à caractère pathogène a fait l'objet d'un nombre relativement restreint de travaux.

Les principaux germes pathogènes responsables des toxi-infections liées à la viande sont anaérobies (*Cl. botulinum* et *Cl. perfringens*) ou anaérobies facultatifs (*Salmonella*, *Staphylococcus*) et donc capables de survivre et de se multiplier dans les conditions d'anaérobiose provoquées par la réalisation du vide.

Le danger de la production de toxines par *Cl. botulinum* et par *S. aureus* a fait l'objet des travaux de THATCHER, F.S. & al. (1962). Ces auteurs ont conclu à la possibilité de production de toxines par ces deux microorganismes dans des aliments emballés sous vide.

Pendant, EDDY, B.P. et INGRAM, M. (1962) ont montré que la production de toxines par *S. aureus* ne se produit pas à des températures inférieures à 10°C. Plus récemment, les travaux de SILLIKER, J.H. et WOLFE, S.K. (1980), sur la viande fraîche, ont conclu que l'utilisation d'atmosphères à taux élevé de CO₂ n'augmentait pas les risques de botulisme ou de toxi-infection par *S. aureus*. Le conditionnement sous vide peut être assimilé à ce type de traitement puisque les faibles quantités d'oxygène encore présentes sont rapidement consommées et font place à un dégagement de CO₂. Les travaux de HANNA, M.O. & al. (1976) ont cependant soulevé le problème de la multiplication sélective de *Yersinia enterocolitica* sur une viande conditionnée sous vide. Le but du présent essai était d'étudier le comportement d'autres entérobactéries dans les mêmes conditions de conservation et en particulier *Salmonella typhimurium* qui est l'agent responsable de très nombreuses toxi-infections.

Nous y avons ajouté l'étude du comportement d'une autre entérobactérie, *E. coli*, essentielle parce que de nombreux auteurs attribuent à la présence de *E. coli* dans un aliment, la valeur d'un indicateur de la présence possible de Salmonelles (GARTNER, H & al., 1975) (MOSSEL, D.A.A. & al., 1963). Pour des raisons essentiellement pratiques, il fut choisi de travailler sur des portions de viande hachée; ce substrat offre des conditions très favorables à la croissance des microorganismes (ELOY, Cl., COPPENS, R., 1972) et les conclusions émises à partir d'une expérimentation sur viande hachée seront a fortiori applicables à des morceaux de découpe non hachés. Nous avons eu recours à une contamination artificielle par un nombre déterminé d'*E. coli* et de *Salmonella typhimurium*. La souche d'*E. coli* utilisée dans cet essai a été préalablement isolée d'une viande hachée du commerce.

Suite aux travaux réalisés précédemment (ELOY, Cl. & al., 1977), nous avons utilisé un mutant de *S. typhimurium* résistant à l'acide nalidixique. Cet artifice permet d'utiliser des milieux rendus plus sélectifs par la présence d'acide nalidixique.

Afin d'éviter les phénomènes d'adaptation, cette souche a d'abord été cultivée sur de la viande hachée et ensuite réisolée avant de servir aux inoculations artificielles. L'emploi de ce mutant et de la technique de détermination du nombre le plus probable (MPN) a permis de réaliser des contaminations très faibles et plus proches de la pratique.

2. MODES OPERATOIRES ET TECHNIQUES

Préparation des échantillons

La viande de boeuf a été hachée et homogénéisée dans un hachoir-mélangeur (HOBART A200) préalablement stérilisé. Des portions de 50 grammes sont introduites dans des sachets plastiques thermosoudables (UCB Sidac-Belgique) de type EAK/41 dont les caractéristiques de perméabilité sont présentées dans la publication annexe des mêmes auteurs. La contamination artificielle est réalisée en dispersant sur la viande 1 ml d'une suspension bactérienne. L'inoculum est préparé par mélange et dilution de deux cultures liquides (*E. coli* et *S. typhimurium*) ajustées à une densité optique déterminée. Le taux de contamination mesuré était de 10.250 *E. coli* et de 690 *S. typhimurium* par portion de 50 g de viande. Après inoculation, les sachets sont scellés sous vide (1 ± 0,2 mm Hg) pour une moitié, et sous air pour l'autre moitié. Ces échantillons sont ensuite stockés à + 4°C ou à + 10°C et les analyses microbiologiques sont réalisées après 0, 1, 3, 7 et 15 jours de conservation.

Analyses microbiologiques

Pour chaque jour d'analyse et pour chaque paramètre étudié, trois portions de 50 g sont analysées. La totalité de l'échantillon (50 g) est utilisée et le diluant stérile est introduit dans le sachet d'emballage. La solution mère est obtenue en homogénéisant trois minutes au STOMACHER et sert à la préparation des dilutions décimales. Les dénombrements des Entérobactéries totales et de *E. coli* se font respectivement sur les milieux VRBA (Oxoid CM.485) et VRBA (Oxoid CM.107) en pratiquant un ensemencement en profondeur avec double couche.

Les modalités d'incubation sont de 24 heures à 30°C pour les Entérobactéries totales et de 24 heures à 44°C + 0,2°C pour *E. coli*. Pour le dénombrement de *S. typhimurium*, nous avons choisi la méthode du nombre le plus probable; bien que cette technique soit assez peu précise, sa grande sensibilité permet de mettre en évidence un nombre peu élevé de microorganismes. Tous les milieux utilisés contiennent 40 mg/l d'acide nalidixique. La première étape est un préenrichissement sur le bouillon nutritif dont la composition est la suivante : extrait de viande 1 g; protéose-peptone 10 g; NaCl 5 g; Na₂HPO₄.12H₂O 9 g; KH₂PO₄ 1,5 g; H₂O 100 ml. Le pH est ajusté à 7,2 + 0,1. Trois séries de trois tubes de 10 ml de ce bouillon dont la première est à double concentration sont ensemencées respectivement par 10 ml, 1 ml et 0,1 ml de la dilution à examiner. Ces tubes sont incubés 24 heures à 37°C. Un ml de chacun de ces tubes est alors prélevé et ajouté à 10 ml de bouillon au tetrathionate (Merck 5285) contenant 40 mg/l d'acide nalidixique. Après 24 et 48 heures à 37°C une ôse de chacun de ces derniers tubes est isolée sur boîtes de BPLS (Merck 7232) contenant 40 mg/l d'acide nalidixique. Les tubes positifs donnent lieu à une culture de *S. typhimurium* sur BPLS. Le nombre le plus probable est alors déterminé à partir de tables. (HARRIGAN, W.F. & Mac. CANE, M.C., 1966).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus font l'objet du tableau I. Chacun de ces résultats est la moyenne des comptages réalisés sur 3 échantillons ayant subi un traitement identique. Les figures I à III illustrent les résultats obtenus regroupés par type de germe. Le comportement microbiologique des différentes portions est indiqué en fonction du conditionnement appliqué. L'examen de ces courbes montre d'abord que tous les germes étudiés sont capables de se multiplier à 10°C sur viande hachée (conditionnée sous vide ou non). Cette prolifération est cependant ralentie par la réalisation du vide et cet effet est particulièrement sensible pour *E. coli*. Cette inhibition des Entérobactéries, suite à l'utilisation d'un conditionnement sous vide, résulte à la fois d'une dépletion de l'O₂ et de la libération de CO₂ (HESS, E. & al., 1980) (SHAW, M.K. & NICOL, D.J., 1969). Les conditions ainsi créées favorisent la croissance des bactéries de la famille des Lactobacillaceae et une autre explication de cette inhibition des Entérobactéries peut être recherchée dans des phénomènes d'antagonisme. Le mécanisme de ces antagonismes pourrait être la libération dans le milieu de métabolites inhibiteurs de la croissance des Entérobactéries (REDDY, S.G. & CHEN, M.L., 1975) (DUBOIS, G. & al., 1979). En considérant les résultats obtenus à 4°C, il apparaît que les germes étudiés, *E. coli* et *S. typhimurium*, présentent un comportement très différent de la population des Entérobactéries totales : celles-ci se multiplient activement à + 4°C alors que les dénombrements de *E. coli* et *S. typhimurium* diminuent progressivement au cours du stockage à cette température. Ce résultat confirme l'incapacité de croissance d'*E. coli* et *S. typhimurium* à des températures inférieures à + 4°C. A cette température, il n'existe pas de différence significative entre les viandes conservées sous vide et sous air. Tout au plus l'inhibition de *S. typhimurium* apparaît-elle légèrement plus importante pour les viandes conditionnées sous air.

CONDITIONS DE STOCKAGE (STORAGE CONDITIONS)	DUREE DE STOCKAGE (STORAGE TIME) EN JOURS (DAYS)	TYPE DE BACTERIE (KIND OF BACTERIA)		
		Enterobacteriaceae/g	<i>E. coli</i> /g	<i>S. typhimurium</i> /50g
Viande non inoculée (meat before inoculation)	0	< 3	< 3	< 2
Viande inoculée (meat after inoculation)	0	269	205	690
Viande inoculée conservée sous vide à 4°C (vacuum packaged and inoculated meat, stored at 4°C)	1	196	211	875
	3	543	222	420
	7	122.000	182	480
	15	652.000	129	271
Viande inoculée conservée sous air à 4°C (air packaged and inoculated meat, stored at 4°C)	1	215	193	917
	3	781	216	700
	7	125.000	169	186
	15	856.000	127	125
Viande inoculée conservée sous vide à 10°C (vacuum packaged and inoculated meat, stored at 10°C)	1	200	200	1.160
	3	32.200	356	5.100
	7	1.520.000	2.250	16.550
	15	5.845.000	23.800	391.000
Viande inoculée conservée sous air à 10°C (air packaged and inoculated meat, stored at 10°C)	1	277	217	1.160
	3	56.000	1.775	3.633
	7	4.840.000	56.000	33.000
	15	15.500.000	1.410.000	3.300.000

Tableau I (table I) : Résultats des analyses microbiologiques (microbiological results)

Cependant, la faible précision de la méthode de dénombrement utilisée rend cette différence peu significative. Ces résultats confirment des observations précédentes obtenues à 4°C avec des taux de contamination beaucoup plus élevés (tableau II). Pour cette expérience, la possibilité d'interférences avec des phénomènes d'adaptation et d'antagonisme n'avait pas permis de conclure quant aux effets de la température et du vide.

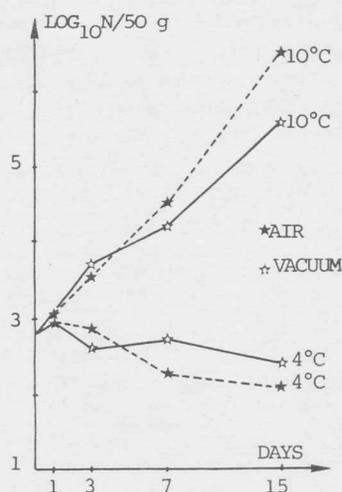
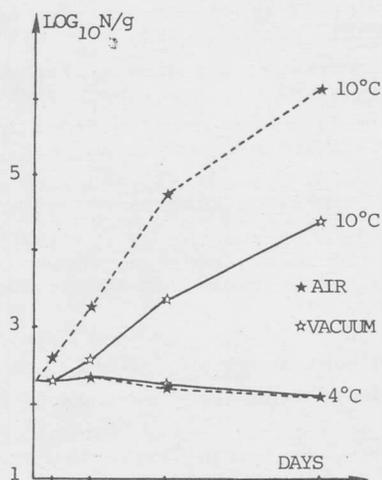
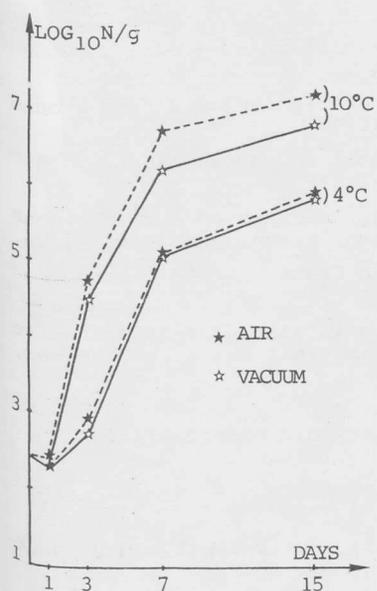


Fig. I : Influence des conditions de stockage sur la croissance des Entérobactéries. (Effect of storage conditions of Enterobacteria growth).

Fig. II : Influence des conditions de stockage sur la croissance des *E. coli*. (Effect of storage conditions of *E. coli* growth).

Fig. III : Influence des conditions de stockage sur la croissance de *S. typhimurium*. (Effect of storage conditions of *S. typhimurium* growth).

CONDITIONS DE STOCKAGE (STORAGE CONDITIONS)	DUREE DE STOCKAGE (STORAGE TIME) EN JOURS (DAYS)	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
Viande non inoculée (meat before inoculation)	0	1.440	-
Viande inoculée (meat after inoculation)	0	44.600	77.000
Viande inoculée conservée sous vide à 4°C (vacuum packaged and inoculated meat, stored at 4°C)	1	33.000	27.300
	4	25.200	19.700
	8	14.100	1.930
	15	10.300	1.570
Viande inoculée conservée sous air à 4°C (air packaged and inoculated meat, stored at 4°C)	1	31.400	37.100
	4	7.880	3.740
	8	5.000	550
	15	4.340	470

Tableau II : Comportement de *E. coli* et de *S. typhimurium* au cours du d'un stockage à 4°C (conditionnement sous vide ou sous air) (Table II : Behaviour of *E. coli* and *S. typhimurium* during storage at 4°C (vacuum and air packaging)).

4. CONCLUSIONS

Au vu de ces résultats, il apparaît que l'application d'un conditionnement sous vide à une viande dans le but d'en augmenter la "durée de vie" en réfrigération, n'augmente pas le risque d'une toxiinfection par *S. typhimurium*. Des conclusions similaires peuvent être dégagées pour *E. coli*. Ces constatations ne vont pas dans le même sens que les observations de HANNA, M.O. & al. (1976) qui font état d'une multiplication alarmante de *Yersinia enterocolitica* sur viande emballée sous vide et concluent à une augmentation du risque de toxiinfection par ce type de traitement. Les résultats obtenus au cours de cet essai montrent que la conservation sous vide ne peut se concevoir qu'en appliquant simultanément un traitement de réfrigération approprié et continu. La température de conservation ne devrait en aucun cas dépasser 4°C. Enfin, les différentes évolutions de *E. coli* et *S. typhimurium* ont montré les mêmes tendances; aussi, dans l'éventualité où le titre en *E. coli* est considéré comme indicateur de la présence possible de Salmonelles, la valeur de cette indication n'est pas modifiée par la réalisation d'un conditionnement sous vide.

5. BIBLIOGRAPHIE

- BRECHT, P.E. (1980), Use of controlled atmospheres to retard deterioration of produce. *Fd. Technol.* (3), 45
- DUBOIS, G.; BEAUMIEU, H.; CHARBONNEAU, R. (1979), Inhibition of bacteria isolated from ground meat by Streptococcaceae and Lactobacillaceae. *J. Fd. Sci.* (44), 1649.
- EDDY, B.P.; INGRAM, M. (1972), The occurrence and growth Staphylococci on packed bacon, with special reference to *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bact.*, 25 (2), 237
- ELOY, CL.; COPPENS, R. (1972), Etude du comportement microbiologique de hachis de viande sous l'influence d'un traitement de congélation-décongélation. *Bull. Rech. Agron. Gembloux, II*, 76.
- ELOY, Cl.; THONART, P.; COPPENS, R. (1977) Etude de l'évolution sur viande hachée décongelée de 3 souches de *Salmonella*. *Coll. Intern. CENECA, Paris*, 525.
- GARTNER, H.; HAVEMEISTER, G.; WALDVOGEL, B.; WUTHE, H.H. (1975), Qualitative und quantitative Salmonellenuntersuchung und ihre hygienische Bewertung im Zusammenhang mit dem E. coli Titer, dargestellt an Beispiele aus den Küntengewässern der Kieler Bucht. *Zbl. Bakt. Hyg., I, Abt. Orig. B* 160, 246.
- HANNA, M.O.; ZINK, D.L.; CARPENTIER, Z.L.; VANDERZANT, C. (1976) *Yersinia enterocolitica* - like organisms from vacuum packaged beef and lamb. *J. Fd. Sci.*, 41, 1254.
- HARRIGAN, W.F.; Mac CANCE, M.E. (1966), *Laboratory methods in microbiology*. Academic Press, London & New-York.
- HESS, E.; RUOSCH, W.; BREER, C (1980), Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von verpacktem Frischfleisch. *Fleischwirtschaft*, 60 (8), 1449.
- MOSSEL, D.A.A.; VISSER, M.; CORNELISSEN, A.M.R. (1963), The examination of foods for Enterobacteriaceae using a test of the type adopted for the detection of Salmonellae. *J. Appl. Bact.* 26 (3), 444.
- PANTALEON, J. (1977) *Microbiologie des viandes conditionnées sous pellicule plastique*. R.T.V.A., 146, 21.
- REDDY, S.G.; CHEN, M.L. (1975), Influence of lactic cultures on the biochemical, bacterial and organoleptic changes in beef. *J. Fd. Sci.*, 40, 314.
- SHAW, M.K.; NICOL, D.J. (1969), Effect of the gaseous environment on the growth on meat of some poisoning and food spoilage organisms. *Proc. 15th Eur. Meet. of meat. Res. Wkrs.* 226.
- SILLIKER, J.H.; WOLFE, S.K. (1981), Microbiological safety considerations in controlled-atmospheres storage of meats. *Fd. Technol.*, 3, 59.
- THATCHER, F.S.; ROBINSON, J.; ERDMAN, I. (1962), The "vacuum pack" method of packaging foods in relation to the formation of the botulism and staphylococcal toxins. *J. Appl. Bact.*, 25 (1), 120.
- VALIN, C.; LACOURT, A (1980), Etude comparée de différents modes de conditionnement des viandes bovines hachées et réfrigérées. *Ind. Alim. Agr.*, 97, 3, 123.