**Chapitre 2 : L’altération microbienne des aliments**

Un aliment est considéré comme altéré lorsqu’il perd ses qualités d'acceptation. Les facteurs qui déterminent les qualités d'acceptation d'un aliment sont : la couleur, la texture, saveur (gout), odeur, la flaveur (saveur+odeur+arome), la forme et l'absence d'anomalies.

Les qualités d'acceptation d'un aliment peuvent être perdues à cause de l'infestation par des insectes et des rongeurs, les actions physiques et chimiques indésirables, et la croissance des micro-organismes. Un exemple de la détérioration physique est la déshydratation de légumes frais (flétrissement). L’altération chimique comprend l'oxydation de la graisse, le brunissement des fruits et légumes, et la dégradation autolytique de certains légumes (par pectinases) ou poissons (par protéases). L’altération microbienne résulte soit de la croissance microbienne dans un produit alimentaire (libération de métabolites indésirables par exemple), soit par l'action de certaines enzymes microbiennes extracellulaires et intracellulaires présentes.

**1. Facteurs influençant l’altération microbienne des aliments**

Les paramètres les plus détectables associés à l’altération des différents types d'aliments sont les changements de couleur, d'odeur, de goût et de texture, les formations de biofilm et les accumulations de gaz (ou mousse) et de liquide (exsudat). L'altération par une croissance microbienne se produit beaucoup plus rapidement que l'altération par des enzymes intracellulaires ou extra-microbiennes en l'absence de cellules microbiennes viables. Entre la production initiale (récolte de végétaux et abattage des animaux de boucherie) et la consommation finale, différentes méthodes sont utilisées pour conserver les qualités d'acceptation des aliments, qui comprennent la réduction du nombre de microorganismes et l’inhibition de la croissance.

**1.1. Conditions favorables pour l’altération microbienne des aliments**

En général, l’altération microbienne des aliments se produit quand quelques conditions sont réunies. Tout d’abord, les microorganismes doivent se transférer dans l’aliment à partir d'une ou de plusieurs sources ; l'environnement alimentaire (pH, nutriments, agents inhibiteurs ou stimulateurs, Aw) doit favoriser la croissance d'un ou plusieurs types de ces micro-organismes contaminants ; l’aliment doit être conservé à une température qui permet à un ou plusieurs types de se multiplier ; et enfin, l’aliment doit être stocké dans des conditions de croissance durant une période suffisante pour que les microorganismes puissent se multiplier et atteindre un nombre nécessaire pour provoquer des changements détectables dans un aliment. Dans un aliment traité thermiquement, les micro-organismes d’altération peuvent résister à ce traitement spécifique (thermophiles) ou contaminent les aliments après traitement. L'altération d'un aliment traité thermiquement par des enzymes microbiennes, en l'absence de cellules microbiennes viables, peut être provoquée par certaines enzymes thermostables produites par des micro-organismes dans les aliments avant ce traitement thermique. En outre, les aliments doivent être conservés à une température pendant une période suffisante pour que les activités catalytiques des enzymes puissent se produire et entrainent des modifications détectables.

**1.2. Facteurs liés aux microorganismes**

**1.2.1. Types de microorganismes**

Les aliments crus ou transformés peuvent contenir de nombreux types de moisissures, de levures et de bactéries capables de se multiplier et causer l’altération (Les virus ne se multiplient pas dans les aliments). Comme la multiplication est un élément important dans l’altération, les bactéries (en raison de temps de génération plus court), suivies par les levures, provoquent une altération rapide des aliments en comparaison avec les moisissures. Cependant, dans les aliments où les bactéries ou les levures ne poussent pas favorablement et ces aliments sont stockés pendant une période de temps relativement plus longue, comme le pain, les fromages durs et les fruits acides et légumes, l’altération due à la croissance des moisissures est plus répandue. L’emballage en anaérobiose des aliments ont considérablement réduit l’altération par les moisissures, et certains types de levures, mais pas par les bactéries anaérobies et anaérobies facultatives.

**1.2.2. Nombre de microorganismes**

Pour produire des changements détectables de la qualité de l’aliment, les micro-organismes (principalement des bactéries et des levures) doivent se multiplier et atteindre un certain niveau, souvent désigné comme le «niveau de détection de l’altération." Selon le type d'aliments et de micro-organismes, les bactéries et les levures ont besoin de se développer et atteindre jusqu'à environ 107 microorganismes /g ou /ml, ou /cm2 (entre 106 et 108). L'altération associée à la libération de H2S, des amines, et la formation de H2O2 peut être détectée même si charge microbienne est basse, tandis que la formation d'acide lactique ne peut être détectée que si la charge microbienne est élevée. La formation de biofilm est associée à l'accumulation de cellules microbiennes, généralement détectée à 108 microorganismes /g ou /ml, ou /cm2 d'un aliment. Il semble donc que l’aliment, avec des charges initiales de bactéries ou des levures d'altération relativement élevées et une condition de stockage qui favorise la croissance rapide avec un temps de génération plus court, va s’altérer plus rapidement qu'un aliment avec une faible charge initiale de microorganismes ou avec temps de génération plus long.

**1.2.3. Prédominantes microorganismes**

Parmi les différentes espèces présentes initialement et capables de croître dans un aliment, seules les espèces qui ont un temps de génération le plus court atteignent rapidement un niveau nécessaire et causent une altération. Par exemple, un échantillon d’un bovin contient initialement environ 103 bactéries /g, *Pseudomonas* spp. : 1%, *Acinetobacter* et *Morexella* : 11%, *Brochothrix* : 13%, et autres (*Micrococcus, Staphylococcus*, entérobactéries, bactéries lactiques, etc.) : 75%. Après un stockage en aérobiose à +2°C pendant 12 jours, le nombre total de microorganismes a atteint 107 microorganismes /g ; dont, le nombre de *Pseudomonas* spp. présente 99% du nombre total et 1% pour toutes les autres qui sont présents.

Si le même échantillon de viande est conservé à +2°C dans des conditions anaérobies (par exemple, dans l'emballage sous vide) jusqu'à ce que le nombre de microorganismes atteint 107 /g, les bactéries prédominantes sont des anaérobies facultatives *Lactobacillus* ou *Leuconostoc*, ou les deux.

**2. Altération de quelques groupes d’aliment**

**2.1. Viandes crues**

La viande est un produit alimentaire hautement périssable avec une activité de l'eau élevée (Aw de 0,97) qui favorise la croissance de la plupart des micro-organismes. La viande elle-même est stérile à l'intérieur de la carcasse. Cependant, elle peut être facilement contaminée lors de l'abattage, la manipulation pendant le traitement ou lors d’un stockage inadéquat. Les viandes fraîches provenant d'animaux de boucherie et de la volaille contiennent un grand nombre de bactéries d'altération qui comprennent des espèces de *Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Shewanella, Alcaligenes, Aeromonas, Escherichia, Enterobacter, Serratia, Hafnia, Proteus, Brochothrix, Micrococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc Carnobacterium* et *Clostridium*, ainsi que des levures et des moisissures. La flore d'altération des viandes est déterminée par la disponibilité des nutriments, la disponibilité de l'oxygène, la température de stockage, le pH, la durée de stockage du produit, et le temps de génération des micro-organismes. Les viandes, avec un pH de 5,5, sont riches en azote non protéique, des peptides et des protéines, mais contiennent de faibles concentrations de glucides.

Pour retarder l’altération microbienne, les viandes fraîches sont conservées à une température réfrigérée (+ 5°C). Ainsi, les bactéries psychrotrophes sont les plus prédominantes dans l’altération de la viande crue. Lors d’un stockage aérobie à basse température, la croissance des bactéries psychrotrophes aérobies et anaérobies facultatives est favorisée. *Pseudomonas* spp. se développent rapidement, en utilisant le glucose en premier, puis les acides aminés; le métabolisme des acides aminés est accompagnée par la production d’odeurs indésirables de sulfures de diméthyle, d’esters et d’acides.

Les psychrotrophes anaérobies et anaérobies facultatives peuvent se développer dans la viande emballée sous vide et entrainent différents types d’altération. *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus saké* métabolisent le glucose (pour produire de l'acide lactique) et les acides aminés « leucine et valine » (pour produire les acides isovalérique et isobutyrique). Ces acides gras volatils donnent une odeur de fromage à la viande. Cependant, quand ils métabolisent la cystéine, ils produisent du gaz H2S et les produits ont une odeur et une couleur indésirables. Les *Leuconostoc carnosum* et *Leu. gelidum* métabolisent le glucose et produisent du CO2 et de l'acide lactique, ce qui provoque l'accumulation de gaz dans l'emballage. *Shewanella putrefaciens*, qui peut se développer dans des conditions aérobies et anaérobies, métabolise les acides aminés (en particulier la cystéine) pour produire les sulfures de diméthyle et l’H2S en grandes quantités. Avec les mauvaises odeurs dégagées de l’aliment, *Shewanella putrefaciens* altère la couleur normale des viandes. L’H2S oxydent la myoglobine à une forme de metmyoglobine, provoquant une coloration verte. Les espèces anaérobies facultatives *Enterobacter, Serratia, Proteus et Hafnia* métabolisent les acides aminés dans la viande pour produire des amines, de l'ammoniac, des sulfures de diméthyle et des mercaptans, et entrainent la putréfaction.

**2.2. Œufs**

Les pores de la coquille et de ses deux membranes intérieures ne préviennent pas l'entrée des bactéries et des hyphes de moisissures, en particulier, lorsque la taille des pores s’augmente au cours du stockage. La présence d'humidité améliore la pénétration des bactéries mobiles. Pendant le stockage, le pH devient plus alcalin (pH 9 à 10). Le jaune d'œuf ne contient pas de facteurs antimicrobiens, les lysozymes dans le blanc d’œuf provoquent la lyse de quelques espèces de bactéries. La détérioration la plus prédominante des œufs est causée par des bactéries Gram-négatives de plusieurs genres qui incluent *Pseudomonas, Proteus, Alcaligenes, Aeromonas*. La putréfaction verte provoque l’apparition de couleur verte des albumens en raison de la croissance de *Pseudomonas fluorescens*; la putréfaction noire provoque une décoloration du jaune à cause de la production de H2S par *Proteus vulgaris*; la putréfaction rouge par *Serratia mercescens*, entraine la production de pigments rouges. Dans certains cas, des moisissures du genre *Penicillium, Alternaria* et *Mucor* peuvent se développer à l'intérieur des œufs.

**2.3. Poisson**

Les microorganismes se concentrent dans le poisson frais au niveau de la peau, des branchies et dans les intestins.

Les poissons d’eau de mer ou d’eau douce sont sensibles à l’altération par des actions autolytiques des enzymes, l'oxydation des acides gras insaturés, et la croissance microbienne. Les protéines sont hydrolysées par les enzymes autolytiques (protéinases) si les poissons ne sont pas éviscérés après capture. L'oxydation des acides gras insaturés est également élevée dans les poissons gras. L’altération microbienne est déterminée par les types microbiens, leur niveau, l'environnement de poisson, les types de poissons, les méthodes utilisées pour la capture et la manipulation ultérieure. Le pH de la chair de poisson est généralement supérieur à 6,0. Les aérobies à Gram négatif telles que *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter, Moraxella* et *Flavobacterium*, et les anaérobies facultatives, telles que *Shewanella, Alcaligenes, Vibrio*, et les coliformes, sont les principales bactéries d'altération. Toutefois, en raison du temps de génération relativement courte, la détérioration par *Pseudomonas* spp. prédomine lors d’un stockage réfrigéré en aérobiose. Chez le poisson stocké sous vide, les bactéries lactiques (y compris les entérocoques) peut devenir prédominantes.

Les bactéries Gram négatives métabolisent l’azote non protéique pour produire des composés volatils tels que NH3, triméthylamine, histamine, putrescine, cadavérine, indoles, H2S, mercaptans, sulfure de diméthyle (en particulier par *Shewanella putrefaciens*) et les acides gras volatils (acétique, isobutyrique, isovalérique). Les composés volatils produisent différents types d'odeurs désagréables. La croissance bactérienne est également associée à la production de mucus, la décoloration des branchies et des yeux (dans le poisson entier), et la perte de la texture musculaire (due à la protéolyse).

**2.4. Lait cru**

Une activité de l'eau élevée, un pH modérée (6,4-6,6) et un grand apport nutritif font du lait un excellent moyen pour la croissance microbienne.

Le lait cru contient de nombreux types de microorganismes provenant de différentes sources. La flore intrinsèque (environ 103 à 104 UFC/ml) est provenue des conduits du trayon de la mamelle d’une vache, des équipements de traite, lors de la production, etc.

L’altération microbienne du lait cru peut se produire à partir du métabolisme du lactose, des composés protéiques, des acides gras (insaturés), et l'hydrolyse des triglycérides.

Comme le principal glucide du lait est le lactose, ces micro-organismes sont classés en microorganismes lactose positif (ceux qui peuvent hydrolyser ou métaboliser le lactose par leurs enzymes) et microorganismes lactose négatif.

Si le lait est réfrigéré immédiatement après la traite, et conservé pendant quelques jours, l’altération est principalement causée par des bacilles Gram négatif psychrotrophes, tels que *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium* spp., ainsi que des coliformes. Les matières grasses du lait peuvent être hydrolysées par des lipases microbiennes (*Pseudomonas, flavobactéries* et *Alcaligenes* spp.) avec la libération des acides gras volatils (butyrique, caprique, et caproïque) donnant l’arome rance au lait. Les *Pseudomonas* « lactose négatif », *Aeromonas, Serratia* et *Bacillus* spp métabolisent les composés protéiniques pour produire des peptides et donner au lait la saveur amer ou de fruit pourri. La croissance des coliformes « lactose positif » produit l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique, CO2 et H2 (fermentation acide) et provoque le caillage, le moussage, et l’acidification du lait.

Toutefois, si le lait cru n’est pas réfrigéré juste après collecte, les mésophiles, comme les espèces de *Lactococcus, Lactobacille, Enterococcus, Micrococcus, Bacillus, Clostridium*, et des coliformes, ainsi que *Pseudomonas, Proteus*, et d'autres commencent à se multiplier. Mais les espèces, telles que *Lactococcus* spp et *Lactobacillus* spp hydrolysent le lactose et prédominent, en produisant suffisamment d'acide pour abaisser le pH et prévenir ou réduire la croissance des autres microorganismes. Dans ce cas, le caillage du lait est de saveur aigre.

**2.5. Lait pasteurisé**

Les bactéries thermorésistantes (*Micrococcus, Enterococcus*, certains *Lactobacillus, Streptococcus, Corynebacterium*, et les spores de *Bacillus* et *Clostridium*) survivent après traitement. En outre, les coliformes, *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium* peuvent contaminer le lait après pasteurisation. Le lait pasteurisé dans des conditions de stockage réfrigéré, a une durée de vie limitée, principalement en raison de la croissance des contaminants psychrotrophes.

L’altération du lait est essentiellement due à la croissance des micro-organismes psychrophiles qui produisent des lipases et des protéases thermostables qui ne sont pas dénaturées durant la pasteurisation.

**2.6. Légumes**

Les légumes frais contiennent des microorganismes provenant du sol, de l'eau, de l'air, et d'autres sources environnementales, et peuvent inclure des agents pathogènes des plantes. Ils ont un pH élevé sauf les tomates. Les microorganismes croissent plus rapidement dans les légumes endommagés ou coupés. La présence d'air, une humidité élevée et une température plus élevée pendant le stockage augmente les taux d’altération. L’altération la plus fréquente est causée par différents types de moisissures (*Penicillium, Phytophthora, Alternaria, Botrytis* et *Aspergillus*) et quelques types bactériens (*Pseudomonas, Erwinia, Bacillus* et *Clostridium*).

**2.7. Fruits**

Les fruits frais ont un pH au-dessous de 4,5. Par conséquent, l’altération microbienne des fruits et des produits de fruits est limitée aux moisissures, aux levures et aux bactéries acidophiles (Lactobacilles, *Acetobacter, Gluconobacter*). Comme les légumes frais, les fruits frais sont sensibles à la pourriture par différents types de moisissures de genres *Penicillium, Aspergillus, Alternaria, Botrytis, Rhizopus*, et d'autres.

**2.8. Boissons, jus de fruit et conserve de légume**

Les boissons gazeuses et non gazeuses et jus de fruits sont des produits à faible pH (pH 2,5 à 4,0). La teneur en glucides (saccharose, le glucose et le fructose) est comprise entre 5 et 15% dans les jus et les boissons, mais 40 à 60% dans les concentrés de jus et les confitures. La haute teneur en sucre réduit la Aw de ces produits (0.9).

Parmi les micro-organismes qui peuvent être présents dans ces produits, seules les moisissures, les levures et les bactéries acidophiles(*Lactobacillus, Leuconostoc* et *Acetobacter*) qui sont capables de provoquer une altération si les méthodes de conservation appropriées ne sont pas utilisées.

**2.9. Grains et graines**

Les céréales et les graines ont un taux d’humidité de 10 à 12%, et une Aw de 0,6, ce qui inhibe la croissance microbienne. Dans les grains de céréales, si l'Aw augmente au-dessus de 0,6 pendant le traitement et le stockage, certaines moisissures (*Aspergillus, Penicillium et Rhizopus*) peuvent se développer.

**2.10. Pain**

L'Aw du pain est assez faible (0,75 à 0,9) afin d'empêcher la croissance des bactéries. Cependant, certaines moisissures (*Rhizopus stolonifer*) peuvent se développer. Les moisissures sont tuées pendant la cuisson; cependant, les spores provenant de l'air et d’équipement peuvent contaminer le pain après cuisson.

**3. Indicateurs de l’altération microbienne des aliments**

De nombreux critères ont été évalués pour leur efficacité comme indicateurs pour prédire la durée de vie prévue, ainsi que pour estimer les étapes d’altération microbienne d’un aliment. Ces critères ou indicateurs peuvent être regroupés en critères sensoriels, microbiologiques, et ou chimique (métabolites microbiens spécifiques). Des tests sensoriels (par exemple, les changements de couleur, d'odeur, de saveur, de texture ou d'aspect général), bien que faciles et rapides à effectuer, présentent plusieurs inconvénients comme indicateurs, en particulier si ils sont utilisés seuls. Les changements de la texture et de la saveur d’un aliment apparaissent généralement à un stade avancé d’altération. Les changements d'odeurs peuvent être masqués par des épices utilisées dans de nombreux produits. Les changements d’odeur dus aux métabolites volatils ne peuvent pas être détectés dans un produit qui est exposé à l'air, par rapport au même produit mis dans un emballage étanche. Les changements de couleur, d’une viande exposée à l'air par exemple, ne peuvent pas être associés à la croissance microbienne. Enfin, les individus diffèrent dans leur perception des critères organoleptiques d’un aliment. Cependant, les critères sensoriels peuvent être utilisés avantageusement avec des critères microbiologiques ou chimiques, ou les deux.

**3.1. Critères de choix d’un indicateur d’altération des aliments**

1. Dans un produit frais de bonne qualité, il est présent en faible nombre (microorganisme) ou absent (substance chimique).

2. Dans des conditions de stockage données, il doit atteindre un niveau très élevé en ce qui concerne le nombre de microorganisme ou la quantité du produit chimique.

3. Lorsque l’altération se produit dans des conditions de stockage données, il doit être l'agent causal prédominant (microbien ou chimique).

4. Il doit être rapidement détecté.

5. Il doit avoir une bonne corrélation avec les critères sensoriels d’altération de l’aliment.

**3.2. Critères microbiologiques d’altération des aliments**

**3.2.1. Enumération des unités formant des colonies (CFU)**

Les niveaux et les espèces de flore initiale d'altération diffèrent avec les produits ou, plus précisément, avec les sources et les environnements intrinsèques et extrinsèques des produits.

La flore totale, utilisée pour le dénombrement des microorganismes mésophiles, ne peut ne pas être un bon indicateur car certaines bactéries psychrotrophes ne se multiplient à 30°C.

Exemples :

* Viandes fraîches crues réfrigérées et stockées en aérobiose : Énumération des CFU /g ou /cm2 des aérobies psychrotrophes, *Pseudomonas* spp. Les données peuvent être disponibles en 2 à 7 jours, la température d'incubation utilisée est de 10 à 25°C.
* Viandes fraîches crues réfrigérées et stockées en anaérobiose (emballage sous vide) : Dénombrement des UFC /g /cm2 de bactéries lactiques psychrotrophes (milieu gélosé ajusté à pH 5,0 avec de l'acide lactique), de bactéries psychrotrophes, ou d’*Enterobacteriaceées*. Les données peuvent être disponibles en 2 à 7 jours.
* Lait cru : Bactéries Gram-négatives psychrotrophes.
* Lait pasteurisé : Bactéries psychrotrophes (Gram-négatives et Gram-positives).
* Beurre : Microorganismes lipolytiques.
* Fromage : Bactéries psychrotrophes, en particulier des bactéries Gram-négatives.
* Produits de la pêche : Bactéries psychrotrophes Gram-négatives.
* Boissons : Bactéries acidophiles, les levures et les moisissures.
* Vinaigrette et Mayonnaise : *Lactobacillus* spp. et les levures.

L'inconvénient majeur des méthodes de dénombrement microbiologiques est que les analyses prennent parfois plusieurs jours pour être exploiter. Pour maîtriser ce problème, plusieurs méthodes indirectes qui indiquent la population probable de micro-organismes dans les aliments ont été mises au point.

**3.2.2. Microscopie**

Le microscope est petit et facile à utiliser pour identifier rapidement les types microbiens (nombre, morphologie, la motilité, spores) présents dans un aliment. Il est également possible de faire le dénombrement rapide et direct des microorganismes par un dispositif de comptage approprié. Un aliment solide peut être mis en suspension dans un diluant pour le diluer, il faut bien mélanger, et le liquide surnageant est étalé sur une lame de microscope. Les résultats sont comparés après avec des seuils d’interprétation. Cependant, l’inconvénient majeur de cette méthode est que les particules d'aliments peuvent interférer avec l'identification.

**3.3. Critères physico-chimiques**

Les micro-organismes se développent dans les aliments et produisent de nombreux types de sous-produits métaboliques associés aux caractéristiques d'altération. Des méthodes sont développées pour mesurer un métabolite spécifique même à des concentrations très faibles et les résultats peuvent être utilisés pour déterminer l'état d’altération d'un aliment. Les méthodes les plus utilisées mesurent la production des métabolites microbiens de H2S, NH3, CO2, diacétyle, l'indole, etc. Cependant, ces méthodes ne sont pas constantes; elles s ne peuvent pas être utilisées pour différents types de produits.

Le pH d’un aliment, en particulier la viande et les produits carnés, en raison de la croissance microbienne est utilisé pour déterminer l'état d’altération. Dans les viandes normales, avec un pH d'environ 5,5, le métabolisme des acides aminés par des bactéries d'altération génère le NH3, des amines et d'autres composés basiques qui augmente le pH (jusqu’à pH 8,0). Pour d’autres aliments, le métabolisme des glucides (présents ou ajoutés) par certaines bactéries produit des acides et diminue le pH.

**3.4. Dosage des enzymes**

* Les protéinases thermostables dans le lait : Les protéinases de certaines bactéries psychrotrophes, tels que *Pseudomonas fluorescens*, peuvent réduire la qualité du lait UHT pendant le stockage.
* Lipases thermostable dans le lait : Étant donné que les lipases naturelles sont présentes dans le lait, la mesure des lipases produites par des bactéries psychrotrophes spécifiquement crée une certaine difficulté. Cependant, le chauffage du lait détruit les lipases du lait, mais non pas les lipases bactériennes thermostables.