

Etude de l'impact de la congélation/décongélation sur l'évolution de la microflore endogène de la viande hachée conditionnée sous atmosphère modifiée

Auteur : Vertcour-Monami, Mathilde

Promoteur(s) : Daube, Georges

Faculté : Faculté de Médecine Vétérinaire

Diplôme : Master en médecine vétérinaire

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/18026>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Etude de l'impact de la congélation/décongélation sur
l'évolution de la microflore endogène de la viande
hachée conservée sous atmosphère protectrice

Study of the impact of freezing/thawing on the evolution of
the endogenous microflora of minced meat stored in a
protective atmosphere

Mathilde Vertcour-Monami

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecin Vétérinaire

Année académique 2022/2023

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

Etude de l'impact de la congélation/décongélation sur
l'évolution de la microflore endogène de la viande
hachée conservée sous atmosphère protectrice

Study of the impact of freezing/thawing on the evolution of
the endogenous microflora of minced meat stored in a
protective atmosphere

Mathilde Vertcour-Monami

Tuteur : Pr. Georges Daube

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecin Vétérinaire

Année académique 2022/2023

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

Etude de l'impact de la congélation/décongélation sur l'évolution de la microflore endogène de la viande hachée conservée sous atmosphère protectrice

OBJECTIF DU TRAVAIL : Cette étude a pour but d'évaluer dans quelles proportions les différentes méthodes de décongélation peuvent impacter la croissance de la microflore endogène de la viande hachée de porc et bœuf.

RESUME :

La viande hachée est un type de denrées alimentaires de plus en plus consommé. Comme pour tout aliment d'origine animal, une contamination microbienne y est associée. Par le processus de fabrication de la viande hachée ou des préparations à base de viande, les bactéries présentes en surface sont amenées en profondeur et se répandent dans l'entièreté du produit augmentant le risque pour le consommateur.

La congélation est une technique de conservation de plus en plus utilisée par les consommateurs afin d'augmenter la durée de vie de leurs achats alimentaires. Mais il est important d'assurer un bon processus de décongélation à ces denrées, non seulement pour éviter une perte de qualité organoleptique, mais également afin de limiter la multiplication bactérienne pouvant survenir lors de paramètres de décongélation extrêmes.

Afin de déterminer quelle différence significative il existe entre différentes méthodes de décongélation, deux protocoles de test ont été réalisés sur de la viande hachée provenant de trois magasins différents. Les viandes décongelées ont ensuite subis des analyses par dénombrement microbiologique et par métagénomique.

Study of the impact of freezing/thawing on the evolution of the endogenous microflora of minced meat stored in a protective atmosphere

AIM OF THE WORK: The purpose of this study is to evaluate the extent to which different thawing methods can impact the growth of endogenous microflora in ground pork and beef.

SUMMARY:

Remerciements

Table des matières

1. INTRODUCTION	7
1.1. Evolution de la consommation de viande	7
1.2. Viande hachée	7
1.3. Flore altérante et pathogène	8
1.4. Conservation : principes de congélation, surgélation et décongélation	13
1.5. Méthodes d'analyses microbiologiques : dénombrement par étalements	14
1.6. Méthodes d'analyses génétiques : métagénomique ciblée	14
2. OBJECTIFS	15
3. MATERIEL ET METHODE	15
3.1. Design expérimental	15
3.1.1. Protocole 1	16
3.1.2. Protocole 2	18
3.2. Analyses microbiologiques	20
3.2.1. Ensemencements	20
3.2.2. Dénombrements	22
3.3. Analyses génétiques	22
4. RESULTATS	23
4.1. Analyses directement après décongélation	24
4.2. Analyses post-posées par rapport à la décongélation	28
5. DISCUSSION	35
6. BIBLIOGRAPHIE	35
7. ANNEXES	40
7.1. Plan de congélation et d'analyses protocole 1	40
7.2. Plan de congélation et d'analyse protocole 2	41
7.3. Ensemencements réalisés lors du protocole 1 et du protocole 2	42

1. Introduction

1.1. Evolution de la consommation de viande

En 2014, la dernière enquête nationale de consommation alimentaire rapporte une diminution de 6% en ce qui concerne la consommation de viande et de produits à base de viande en Belgique. En parallèle à cette diminution globale de la consommation de viande, la consommation de viande hachée a augmenté au détriment des viandes nobles. Le Belge consommait en moyenne 40,51 kg par an de viande.

Enfin, en 2021, la consommation apparente de viande, qui correspond à la quantité totale de viande mise sur la marché nationale, exprimée en poids de carcasse s'élevait à 81,7 kg (poids équivalent carcasse). Cette valeur ne correspond donc pas à la valeur de consommation réelle. De plus, la valeur moyenne de viande commercialisable s'élevait à 64,4 kg par habitant par an. Hors de cette valeur, il est intéressant de constater que 32,8 kg sont de la viande de porc, 13,8 kg sont de la viande de volaille et 10,8 kg sont de la viande de bœuf/porc. Cependant, ces valeurs restent surestimées puisqu'elles ne tiennent ni compte du gaspillage alimentaire ni de la fraction de viande utilisée dans l'alimentation animale (« Quelle est la consommation de viande et de poisson en Belgique ? » 2022).

1.2. Viande hachée

Selon le règlement (CE) n° 853/2004, la viande hachée et les préparations de viandes sont considérées comme des viandes fraîches. Ce règlement définit

- Les viandes fraîches : «les viandes n'ayant subi aucun traitement de conservation autre que la réfrigération, la congélation ou la surgélation, y compris les viandes conditionnées sous vide ou sous atmosphère contrôlée »
- Les viandes hachées : « les viandes désossées qui ont été soumises à une opération de hachage en fragment et contenant moins de 1 % de sel »
- Les préparations de viandes : «les viandes fraîches, y compris les viandes qui ont été réduites en fragments, auxquelles ont été ajoutés des denrées alimentaires, des condiments ou des additifs ou qui ont subi une transformation insuffisante pour modifier à cœur la structure fibreuse des muscles et ainsi faire disparaître les caractéristiques de la viande fraîche ».

L'arrêté royal du 13 juillet 2014 tolère un délai de maximum 48 h après préparation pour la vente de produits à base de viande hachée. Toutefois, le Comité scientifique responsable de l'évaluation du projet d'arrêté royal relatif à l'hygiène des denrées alimentaires approuve, dans son Avis 24-2013, un délai de vente au-delà de 48 h à condition que l'opérateur réalise une évaluation des risques démontrant que le produit peut être vendu durant une plus longue période.

Afin d'être transformée en produit final, la viande doit être hachée. Le hachage favorise la dissémination des micro-organismes et peut donc induire leur développement au cœur du produit. Ce procédé nécessite aussi plus de manipulations, ce qui est susceptible d'apporter de nouvelles contaminations. Puisqu'aucun traitement de stabilisation ne sera appliqué à la préparation par la suite, les viandes hachées présentent un risque microbiologique plus élevé. C'est pourquoi il est recommandé de conserver la viande hachée à maximum 4 °C afin de limiter le développement des micro-organismes.

[AFSCAModule Viande-fraiche scherm G-044 15-01-2018.pdf](#)

On considère que malgré sa transformation, la viande hachée conserve les caractéristiques physico-chimiques de la viande fraîche. L' a_w de la viande fraîche est de $\pm 0,98$, elle sera cependant diminuée par l'ajout de sel dans la préparation. Le pH quant à lui devra se situer entre 5,3 et 5,8 (Cauchie et al. 2020).

La viande - Clinquart – chapitre 5

1.3. Flore altérante et pathogène

En ce qui concerne les bactéries retrouvées dans la viande hachée, il faudra différencier la flore pathogène de la flore altérante.

Cette dernière sera responsable de la putréfaction, du verdissement et du rancissement de la denrée alimentaire. Nous traiterons entre autres de *Pseudomonas* spp, de *Brochothrix thermosphacta*, de *Clostridium perfringens*, des entérobactéries et de certaines bactéries lactiques (Koutsoumanis et al. 2006; Nychas et al. 2008; Delhalle et al. 2016; Jiang et al. 2022).

La flore pathogène, quant à elle, induira des troubles digestifs plus ou moins graves. Les pathogènes nous intéressant sont *Salmonella* spp., *Escherichia coli* entérohémorragiques, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni/coli*, mais également

Staphylococcus aureus (Choi et al. 2013; De Filippis et al. 2013; Wang et al. 2015; Weinroth et al. 2019).

Le tableau situé à la page suivante présente les caractéristiques de ces différentes bactéries.

Tableau I. Caractéristiques et origine des différentes bactéries pouvant être retrouvées dans la viande hachée de porc et bœuf

	Bactérie	Caractéristiques	Conditions de croissance			Source de contamination	Transmission	Références
			Température (° C)	pH	a _w *			
F L O R E A L T E R A N T E	<i>Pseudomonas</i> spp	Bacille Gram – Aérobie	4-42	4,5-9,5	>0,97	Environnement	Contamination lors de la production	Klein et al. 2009 Limsong et Frazier 1966 Meng et al. 2017
	<i>Brochotrix thermosphacta</i>	Bacille Gram + Anaérobie facultative	-3,4-30	5-8	>0,94	Environnement	Contamination lors de la production	Fall 2011 Blickstad 1984 Freiner 2006
	<i>Clostridium perfringens</i>	Bacille Gram + Sporulante Anaérobie	10-52	5-8,3	>0,95	Tractus digestif des mammifères	Sporulation et production d'entérotoxines	Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : "Clostridium perfringens" - Mai 2017, 2018
	<i>Photobacterium</i> spp	Gram - Coccobacille Aérobie et anaérobie facultative	4-45	4-11		Eau	Contamination	Moi et al. 2017
	<i>Leuconostoc</i> spp	Bactérie lactique Coque Gram + Anaérobie facultative	20-30 (optimum)			Viande fraîche Environnement Plantes	Contamination	Salveti et al. 2021 Devoyod et Poullain 1988 Nychas et al. 2008
	<i>Lactococcus</i> spp	Bactérie lactique Coque Gram +	-4,8-27	>4,8	<~2,3 g de NaCl/100 mL	Environnement	Contamination	Fall 2011 Nychas et al. 2008

F L O R E P A T H O G E N E	<i>Salmonella spp</i>	Entérobactérie Bacille Gram – Aéro-anaérobie	5-50	3,8-9,5	>0,94	Tractus digestif porc, bovin et volailles	Alimentaire à partir d'aliments contaminés crus ou peu cuits	Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “Salmonella spp” - juin 2021, 2021
	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques	Entérobactérie Bacille Gram – Aéro-anaérobie	6-45,5	4,4-9	>0,95	Tractus digestif ruminants et homme	Alimentaire à partir de viande de bovin	Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments : “Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC) - Mai 2019, 2019
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Entérobactérie Bacille Gram – Aéro-anaérobie	-2-42	4-10	0,945	Viande de porc	Alimentaire à partir d'aliments contaminés non ou pas assez cuits	Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis” - Mai 2017, 2019
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacille Gram + Ubiquitaire et tellurique Anaérobie facultative et microaérophile	-2-45	4-9,6	>0,92	Viandes cuites et produits à base de viande	Alimentaire	Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “Listeria monocytogenes” - Avril 2020, 2021
	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	Bacille Gram – Microaérophile	30-45	4,9-9	0,98	Viande de porc, de bœuf et de volailles	Alimentaire	Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “Campylobacter jejuni, Campylobacter coli” - Juin 2020, 2021
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coque Gram +	6-48	4-10	0,83 pour la bactérie	Peau et muqueuses	Alimentaire à partir d'aliments	Fiche de description de danger biologique

			Toxinogène Aéro-anaérobie facultative			0,86 pour la production de toxine	Environnement Sphère respiratoire des animaux à sang chaud	contaminés par l'homme	transmissible par les aliments : "Staphylococcus aureus et entérotoxines staphylococciques" - Mars 2022, 2022
--	--	--	---	--	--	--	--	---------------------------	--

* a_w = activité de l'eau

En ce qui concerne les limites légales de sécurité, le règlement (CE) n° 2073/2005 impose l'absence de *Salmonella* dans un échantillon de 25 g de viande hachée et de préparation de viande destinées à être cuites ou mangées crues. En termes d'hygiène, ce même règlement impose des limites comprises entre 500.000 et 5.000.000 UFC/g de colonies aérobies dans la viande hachée en fin de fabrication, des limites comprises entre 50 et 500 UFC/g d'*Escherichia coli* dans la viande hachée en fin de fabrication et des limites comprises entre 500 et 5.000 UFC/g dans les préparations de viande en fin de fabrication.

1.4. Conservation : principes de congélation, surgélation et décongélation

La congélation des viandes fraîches est la méthode la plus commune de conservation pratiquée par les consommateurs (Lianou et Koutsoumanis 2009). Il est dès lors nécessaire de différencier congélation et surgélation. Pour ces deux méthodes de conservation, la température est abaissée et maintenue basse, en dessous du point de congélation du produit. La distinction se fait sur base de la température de conservation. En effet, entre -12 °C et -18 °C, il est nécessaire de parler de congélation, celle-ci empêchant le développement de toute bactérie. En dessous de -18 °C, on parle alors de surgélation, ce qui induit un arrêt du développement de tout micro-organisme.

Les techniques de conservation des aliments Antoine CLINQUART

La congélation semble être une méthode intéressante pour diminuer légèrement la contamination bactérienne des denrées alimentaires et assurer une bonne conservation sur le long terme. Il semble cependant que l'effet de la congélation sera différent en fonction de la nature de la denrée alimentaire et de la bactérie incriminée. En effet, il est remarqué qu'une congélation de 9 jours à -20 °C permet une diminution de l'ordre de 1 log de *Campylobacter* (Georgsson et al. 2006) chez la volaille. Néanmoins, l'impact de ce procédé ne donne pas les mêmes résultats en ce qui concerne *Listeria monocytogenes* dans la viande de bœuf, pour laquelle la congélation n'a pas permis de diminuer la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon (Lianou et Koutsoumanis 2009). En ce qui concerne *E. coli* et *Salmonella*, les résultats sont variables en fonction des études. Il est possible de noter une diminution de 0,7 log de ces bactéries dans des burgers de bœuf (Manios et Skandamis 2015), une invariabilité de ces bactéries pour la viande de bœuf (Dykes 2006), voire une augmentation de ces bactéries sur du bœuf haché (Lianou et Koutsoumanis 2009) après une période de congélation.

La décongélation d'un aliment peut se réaliser en suivant différentes méthodes. Les méthodes préconisées sont la décongélation lente au réfrigérateur ou la décongélation rapide au micro-onde (Lianou et Koutsoumanis 2009). La décongélation à température ambiante est déconseillée d'un point de vue sanitaire. Des études comparent l'impact de ces différentes méthodes de décongélation sur des viandes différentes et pour des bactéries différentes. En 2009, Lianou et collaborateurs ont comparé différentes méthodes de décongélation sur du bœuf haché inoculé par une solution contenant *Listeria monocytogenes* et *Salmonella Enteridis*. Cette étude n'a pas montré de différence significative entre les différentes méthodes de décongélation testées. Cependant, Stavros et collaborateurs (2015) ont démontré une augmentation de la population de *Salmonella spp* et d'*Escherichia coli O157:H7* lors d'une décongélation à 20 °C pendant 12 h de bœuf haché, en comparaison aux méthodes de décongélation prescrites. Toujours en 2015, Roccato et collaborateurs, ont montré une augmentation significative du nombre de *Salmonella Typhimurium* détectées dans des kebabs de volaille décongelés pendant une nuit à 23 °C comparativement à une décongélation pendant une nuit à 8 °C.

1.5. Méthodes d'analyses microbiologiques : dénombrement par étalements

Le dénombrement de colonies bactériennes en surface et en profondeur nous donne une indication sur le niveau de contamination de l'aliment et plus précisément nous permet de dénombrer les micro-organismes cultivables.

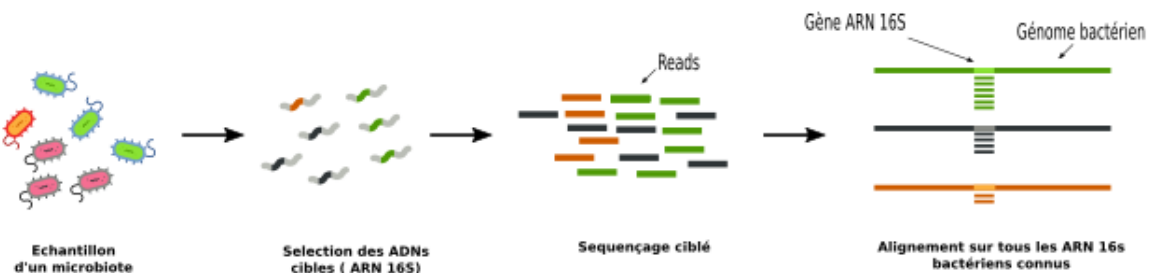
En fonction de leur caractéristiques de croissance, les bactéries poussent sur certains milieux plus ou moins sélectifs. Certains milieux permettent la croissance d'un type de bactéries, comme c'est le cas pour le Plate Count Agar qui permet la croissance des bactéries mésophiles aérobies. D'autres milieux sont plus sélectifs et permettent la croissance de certaines bactéries uniquement, comme par exemple le Violet Red Bile Glucose qui permet la croissance des entérobactéries. Associés au milieu choisi, les paramètres d'incubation permettront également la croissance de certaines bactéries plutôt que d'autres.

1.6. Méthodes d'analyses génétiques : métagénomique ciblée

En complément aux analyses microbiologiques, il est intéressant de réaliser une analyse de métagénomique ciblée. La métagénomique consiste à séquencer l'ADN présent dans un échantillon pour déterminer avec précision l'ensemble des micro-organismes

présents dans celui-ci. Cette méthode a pour avantage de permettre la détection d'espèces minoritaires, mais également la mise en évidence de bactéries non cultivables. La limite de cette méthode est qu'elle ne permet pas de déterminer si la bactérie identifiée est vivante, quiescente ou morte. Pour réaliser cette analyse, il sera nécessaire d'amplifier les fragments ADN extraits de l'échantillon et les séquencer (Martin et al. 2018).

Figure 1 : Schéma du principe de métagenomique ciblée



Source : <https://dridk.me/metagenomique.html>

2. Objectifs

Cette étude a pour but d'évaluer dans quelles proportions les différentes méthodes de décongélation peuvent impacter la croissance de la microflore endogène de la viande hachée de porc et bœuf.

3. Matériel et méthode

3.1. Design expérimental

Les deux protocoles suivants furent mis en place sur de la viande hachée de porc et bœuf. Ces deux protocoles ont été pensés afin de déterminer si la congélation permet de diminuer la contamination de la viande hachée, mais également d'observer une potentielle différence dans le genre et espèce des bactéries présentes.

De plus, ils nous permettent de constater si des méthodes différentes de décongélation auront un impact significatif sur la population bactérienne et si les espèces bactériennes prédominantes seront modifiées par ces différentes méthodes de décongélation.

3.1.1. Protocole 1

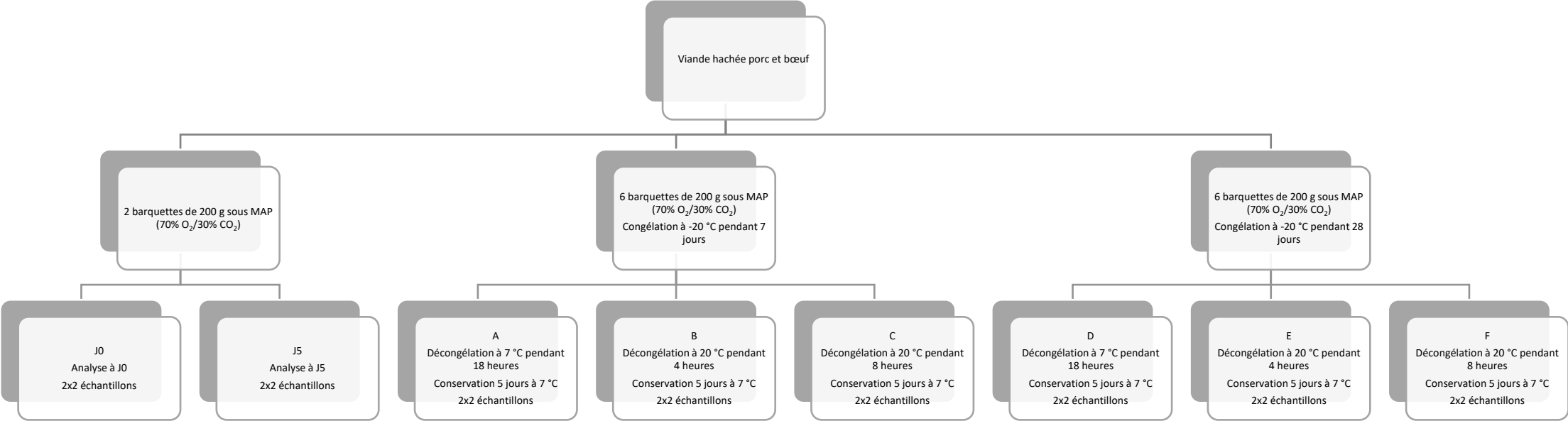
La viande a été achetée au Delhaize de Ans dans le comptoir boucherie. Le lendemain, jour considéré comme J0 du protocole, la viande a été répartie dans 19 barquettes de 200 g (± 1 g) à une température ambiante de 10,4 °C au sein de l'unité pilote. L'ensemble des barquettes a été mise sous atmosphère protectrice composée de 70 % d'O₂ et 30 % de CO₂ (machine Tecnovac – Italie). La composition du mélange fut préalablement vérifiée à l'aide d'un analyseur de gaz (machine PBI Dansensor Checkmate 3 – Allemagne). Les barquettes ont ensuite été étiquetées et placées aux températures adéquates (annexe 7.1).

Les échantillons J0 et J5 ont été analysés avant congélation, respectivement le jour de mise en conditionnement et après une conservation de 5 jours à 7 °C.

Les échantillons A, B et C ont été congelés pendant 7 jours à -20 °C, mais ont subi des méthodes de décongélation différentes. Les échantillons A ont été décongelés à 7 °C pendant 18 h afin de mimer une décongélation au réfrigérateur (méthode 1). Les échantillons B ont été décongelés à 20 °C pendant 4 h, qui est le temps nécessaire pour que l'échantillon soit dégelé (méthode 2) et les échantillons C ont été décongelés à 20 °C pendant 8h afin de mimer une décongélation à température ambiante durant une journée de travail (méthode 3). Les 6 échantillons, une fois le processus de décongélation terminé, ont été conservé 5 jours à 7 °C.

Les échantillons D, E et F ont été congelés pendant 28 jours à -20 °C et ont subi, respectivement, les mêmes traitements que les échantillons A, B et C.

Figure 2 : Schéma expliquant le protocole 1



3.1.2. Protocole 2

Ce deuxième protocole diffère du premier, car deux viandes d'origine différentes sont analysées. La première viande a été achetée au Carrefour de Bonnelles et la deuxième au Colruyt de Bonnelles (8 mars 2023). La première viande est composée de 77 % de porc et 13 % de bœuf, conservée sous atmosphère protectrice (composition inconnue) et la DLC prévue est le 13 mars 2023. Cette première viande n'a pas été achetée le jour de mise en rayon. La deuxième viande est composée de 52 % de bœuf et 42 % de porc, conservée dans des emballages alimentaires et la DLC prévue est le 11 mars 2023. Cette deuxième viande a été achetée le jour de mise en rayon.

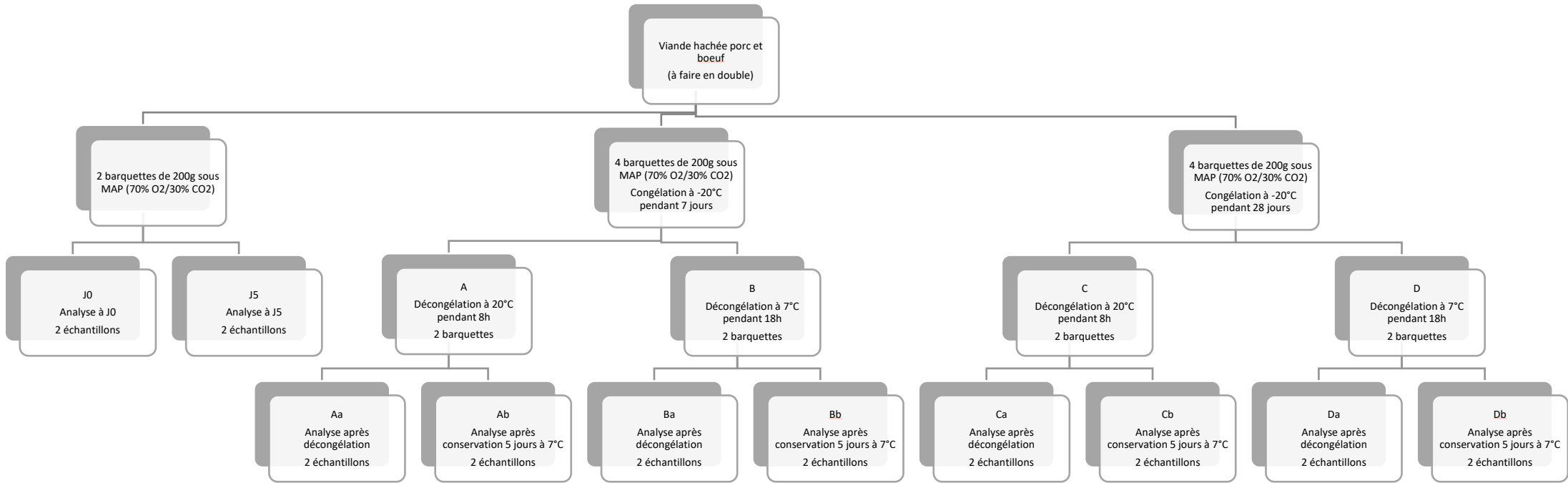
Le jour de l'achat, considéré comme J0 du protocole, 15 barquettes de 200 g (± 1 g) de viande en provenance du Colruyt et 14 barquettes de 200 g (± 1 g) de viande en provenance du Carrefour ont été réalisées dans l'unité pilote à une température de 10,6 °C. Toutes les barquettes ont été mises sous atmosphère protectrice (70 % CO₂ et 30 % O₂) (machine Tecnovac – Italie) préalablement vérifiée par un analyseur de gaz (machine PBI Dansensor Checkmate 3 – Allemagne). Les barquettes ont été identifiées et placées aux températures correctes de conservation (annexe 7.2).

Les échantillons J0 et J5 ont été analysés avant congélation, respectivement au jour de mise en conditionnement et après une conservation de 5 jours à une température de 7 °C.

Les échantillons A-D, A-C, B-D et B-C ont été congelés à -20 °C pendant 7 jours et ont subi des méthodes de décongélation différentes. Les échantillons A ont subi la méthode 3 de décongélation et les échantillons B ont subi la méthode 1 de décongélation. Une première partie de ces 4 échantillons est analysée immédiatement après décongélation et l'autre partie est analysée après une conservation de 7 jours à 5 °C.

Les échantillons C-D, C-C, D-D et D-C ont été congelés à -20 °C pendant 28 jours et ont respectivement subi la méthode 3 et la méthode 1 de décongélation. Similairement aux échantillons A et B, une première partie des échantillons C et D est analysée immédiatement après décongélation et la seconde partie est analysée après une conservation de 7 jours à 5 °C.

Figure 3 : Schéma expliquant le protocole 2

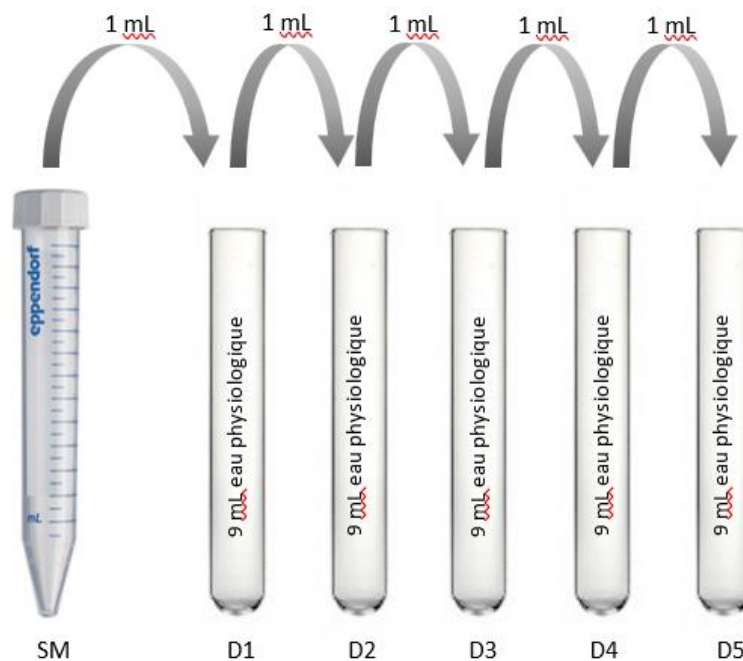


3.2. Analyses microbiologiques

Préalablement aux ensemencements, il est nécessaire de réaliser une solution à partir de la viande hachée. Pour se faire, une dilution de 1/10 a été réalisée (machine Diluflow Interscience – France). En pratique, 25 g (\pm 0,5 g) de viande hachée ont été déposés stérilement dans un sac Stomacher stérile et 225 g (\pm 5 g) d'eau physiologique ont été ajoutés pour réaliser la dilution. La solution a ensuite été homogénéisée (machine Stomacher Interscience – France) pendant 120 secondes. Une fois la solution mère obtenue, 15 mL de celle-ci ont été transvasés dans un Eppendorf afin de réaliser les différentes analyses.

En fonction de la contamination de la viande, il est parfois nécessaire de réaliser des dilutions de cette suspension mère pour permettre le dénombrement sur boîte. Des dilutions 1/10 seront réalisées successivement.

Figure 4 : Schéma expliquant le principe de dilution 1/10 utilisé



3.2.1. Ensemencements

Dans le cadre de cette expérience, il est important d'avoir une idée de la contamination globale de la viande hachée, c'est pourquoi 5 milieux différents furent ensemencés.

Tableau II : Résumé des différents milieux utilisés et de leurs conditions d'utilisation

Milieu	Flore dénombrée	Conditions de croissance	
		protocole 1	protocole 2
PCA – Plate Count Agar Bio-Rad	Flore aérobie mésophile	22 °C pendant 72 h	22 °C pendant 72 h
VRBG – Violet Red Bite Glucose Bio-Rad	Entérobactéries	30 °C pendant 24 h selon la norme ISO 21528:2004	30 °C pendant 24 selon la norme ISO 21528:2004
TBX – Tryptone Bite Glucuronate Bio-Rad	<i>Escherichia coli</i>	37 °C pendant 24 h	44 °C pendant 24 h selon la norme ISO 16649
CFC Thermo Scientific	<i>Pseudomonas spp</i>	22 °C pendant 72 h	22 °C pendant 72h
MRS – Man, Rogosa, Sharpe Bio-Rad	Bactéries lactiques	22 °C pendant 72 h	22 °C pendant 72h

Utiliser le milieu PCA permet de faire pousser la flore aérobie mésophile, c'est-à-dire la flore qui est capable de croître en aérobiose entre 20 °C et 45 °C. Le dénombrement de cette flore donne une estimation de la flore totale de l'échantillon sans permettre une identification des bactéries dénombrées.

Les entérobactéries sont un ensemble de bactéries que l'on retrouve dans le tube digestif des animaux ou de l'homme. Ces bactéries peuvent être responsables de pathologies plus ou moins graves chez l'homme une fois ingérées. La gélose VRBG permet de faire pousser de manière sélective ces bactéries à l'origine de viandes notamment. En ce qui concerne *Escherichia coli*, le milieu TBX permet de la faire pousser de manière sélective à partir de denrées alimentaires. Dénombrer les entérobactéries permet de donner une indication de l'état d'hygiène des denrées alimentaires.

Les *Pseudomonas* sont les bactéries majoritaires responsable de l'altération de la viande. En les cultivant sur milieu sélectif, il est possible d'avoir une idée générale de l'état d'altération de la viande.

En ce qui concerne les bactéries lactiques, elles sont utiles dans la conservation de la viande, car elles permettent de diminuer le pH de la viande et ainsi inhibent le développement de bactéries pathogènes.

Les ensemencements et dilutions réalisés lors des deux protocoles sont repris en annexe 7.3.

3.2.2. Dénombrements

Toutes les boîtes ont été comptées après 24 h, 48 h et 72 h d'incubation. Le dénombrement a ensuite été réalisé selon les différentes normes.

Lorsque la contamination était supérieure à 300 colonies, il a été décidé de prendre comme seuil 2 fois la valeur réelle de contamination et lorsque qu'aucune colonie ne s'est développée, il a été décidé de prendre comme seuil la moitié de la valeur réelle.

3.3. Analyses génétiques

L'étape inhérente aux analyses génétiques est l'extraction d'ADN. Cette première étape, permettant d'extraire l'ADN total de l'échantillon, a été réalisée avec le kit DNeasy Blood and Tissue en suivant les instructions du fabricant (QIAGEN Benelux BV, Anvers, Belgique).

Une extraction d'ADN comporte 3 étapes successives :

- Une lyse chimique et mécanique

Celle-ci se réalise à l'aide non seulement d'enzyme, par exemple la protéinase K, de chaleur et de billes.

- La liaison de l'ADN

L'ADN se liera à la colonne, et plus précisément au filtre de silice, après avoir subi de multiples lavages et centrifugations.

- L'élution

L'élution consiste en une centrifugation finale après ajout d'un buffer qui retiendra l'ADN.

À la suite de son extraction, la concentration d'ADN a été évaluée avec un spectrophotomètre ND-1000 (NanoDrop ND-1000, Isogen, De Meern, Pays-Bas).

Ensuite, une PCR 16S a été effectuée pour identifier les différentes bactéries présentes dans l'échantillon. Pour réaliser cette PCR deux amorces différentes ont été utilisées, l'une directe (5'-GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') et l'autre indirecte (5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3') qui permettent de cibler des régions hypervariables V1-V3 de l'ADN 16S. A la fin de ce processus, des amplicons sont obtenus, ceux-ci sont purifiés, quantifiés et soumis à un deuxième tour de PCR. Après cette seconde PCR, une qPCR est réalisée pour permettre la quantification de tous les échantillons et un regroupement des amplicons pour former une base de données. Les bases de données ont ensuite été séquencées à l'aide d'un séquenceur MiSeq Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA) en utilisant les réactifs V3.

4. Résultats

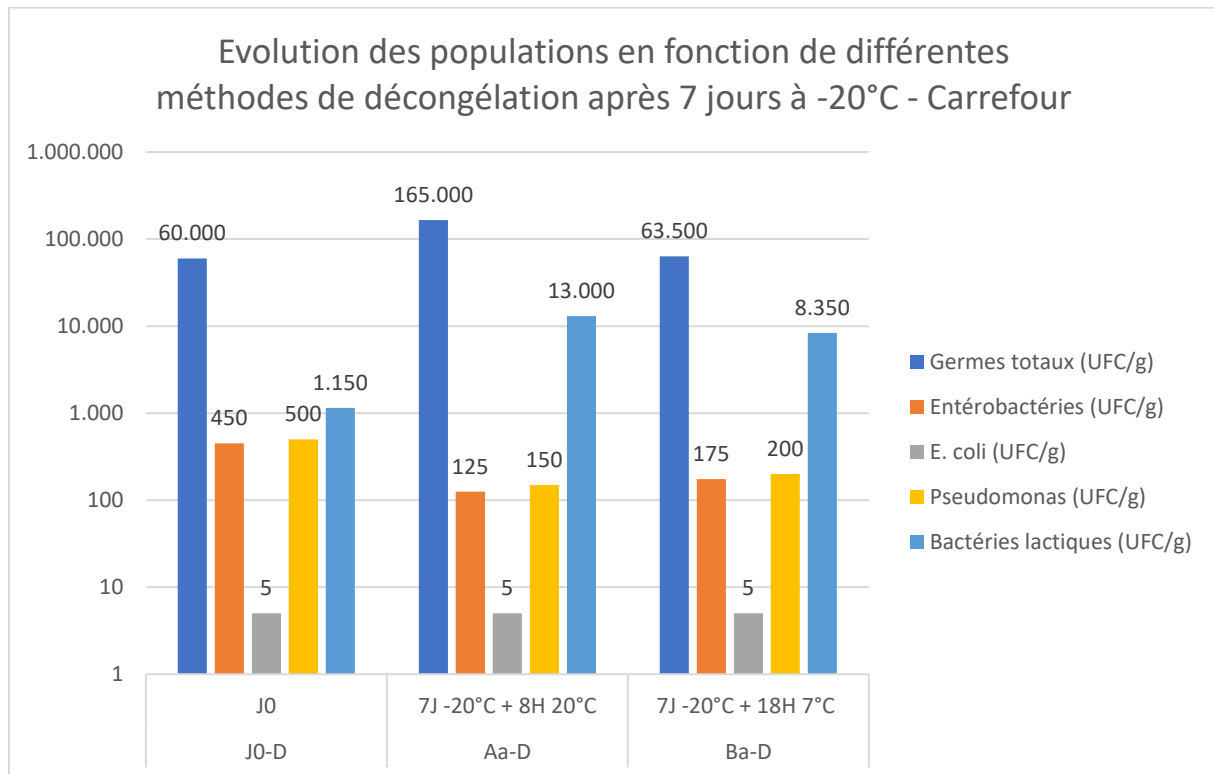
Concernant le protocole 1, les échantillons J0 et J5 ont été analysés avant congélation le jour de conditionnement et après une conservation à 7 °C pendant 5 jours. Les échantillons A, B et C ont été analysés après une congélation de 7 jours à -20 °C et avoir subi les différentes méthodes de décongélation (voir annexe 7.1). Les échantillons D, E et F ont été analysés après une congélation de 28 jours à -20 °C et avoir subi les différentes méthodes de décongélation (voir annexe 7.1).

Tout comme pour le protocole 1, les échantillons J0-D, J0-C, J5-D et J0-C ont été analysés avant congélation le jour de conditionnement et après une conservation à 7 °C pendant 5 jours. Les échantillons Aa et Ba ont été analysés après une congélation de 7 jours à -20 °C et directement après décongélation. Les échantillons Ab et Bb ont quant à eux été analysés après une congélation de 7 jours à -20 °C, mais après une conservation de 5 jours à 7 °C après avoir été dégelé. Les échantillons Ca et Da ont été analysés après une conservation de 28 jours à -20 °C et directement après décongélation. Tout comme les échantillons Ab et Bb, les échantillons Cb et Db ont été analysés après congélation de 28 jours, mais après une conservation supplémentaire de 5 jours à 7 °C après décongélation. Les différentes méthodes imposées aux différents échantillons sont reprises dans l'annexe 7.2.

La croissance des bactéries cultivables a été testée pour tous les échantillons sur PCA, VRBG, TBX, CFC et MRS. Les résultats sont repris dans les graphiques ci-dessous.

4.1. Analyses directement après décongélation

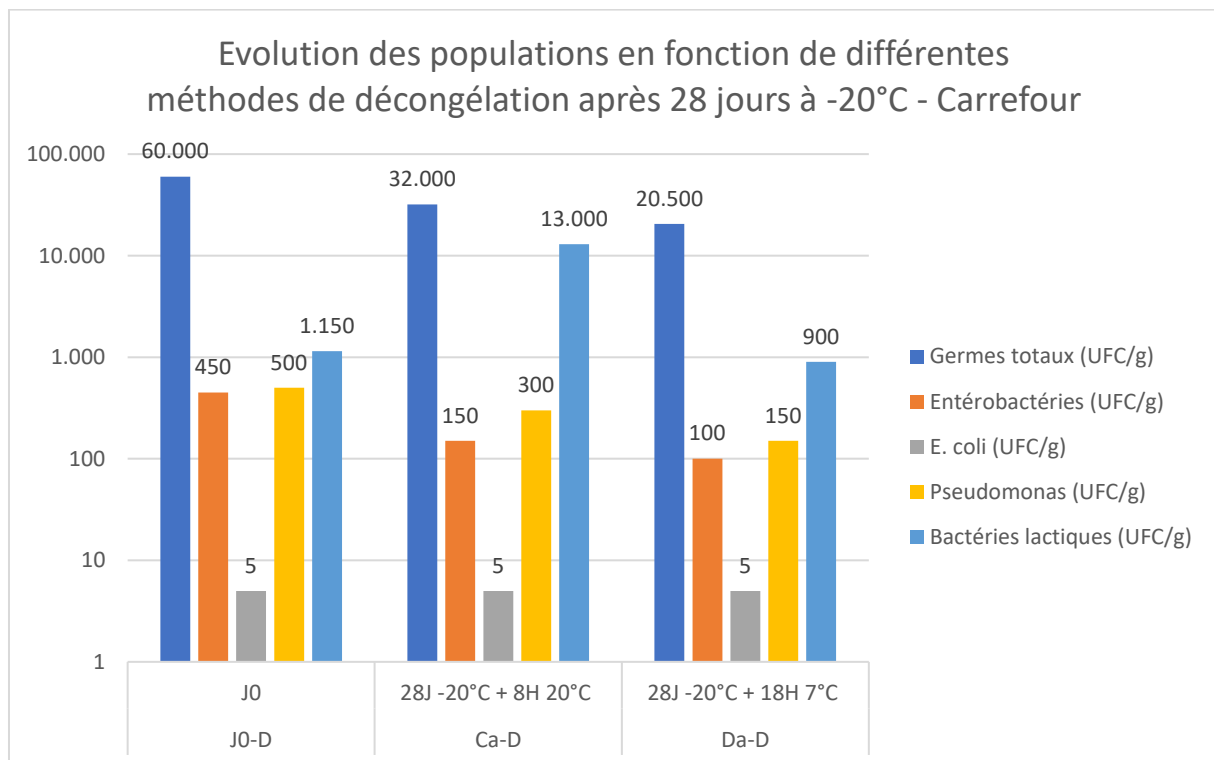
Figure 5 : Dénombrement microbiologique après 7 jours de congélation – Carrefour (protocole 2)



En ce qui concerne les échantillons ayant subi une décongélation à 20° C pendant 8 heures (Aa-D), une augmentation d'un log est remarqué pour les germes totaux et les bactéries lactiques en comparaison aux données obtenues à J0. Il est également possible de constater une légère diminution des entérobactéries et des *Pseudomonas* après la congélation.

Pour les échantillons ayant subi une décongélation à 7° C pendant 18 heures (Ba-D), une augmentation des bactéries lactiques et une légère diminution des entérobactéries et des *Pseudomonas* sont visibles. La population totale de bactéries restent quant à elle stable.

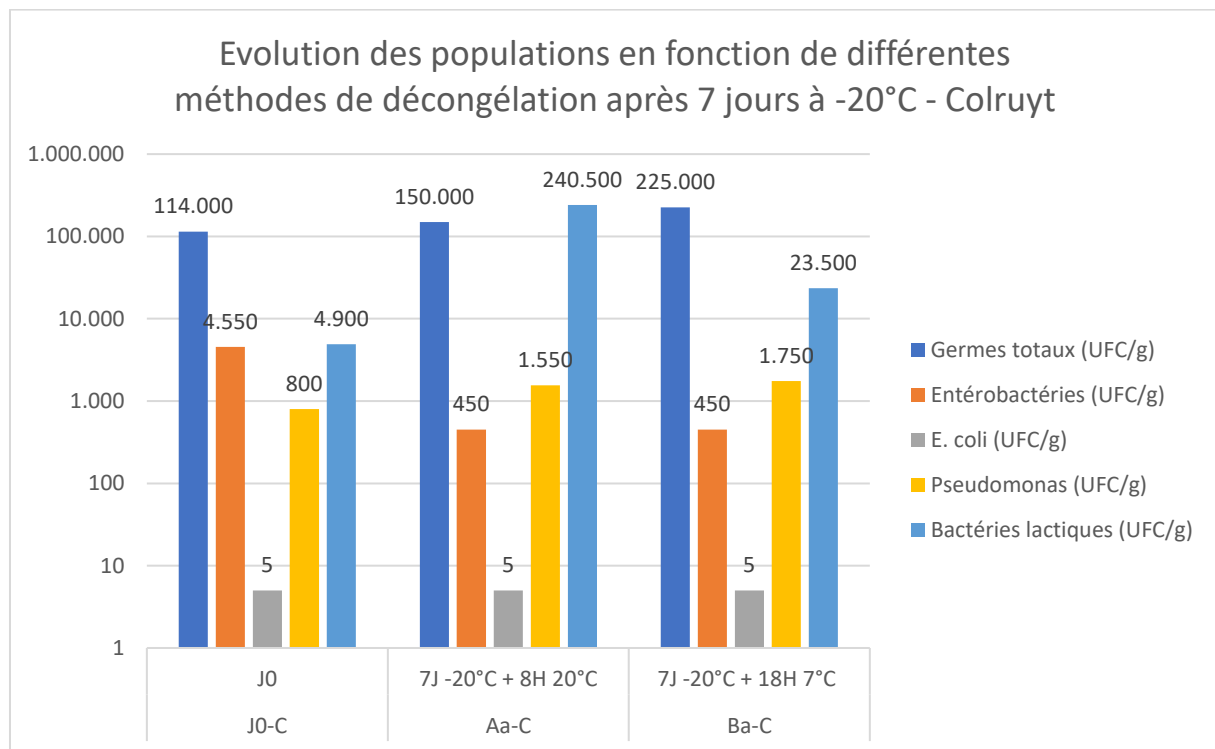
Figure 6 : Dénombrement microbiologique après 28 jours de congélation - Carrefour (protocole 2)



De manière générale, la congélation de 28 jours à -20° C permet une réduction de moitié de la flore totale des échantillons, et ce indépendamment la méthode de décongélation.

Pour les échantillons ayant été décongelés à 20° C pendant 8 heures (Ca-D), on constate une augmentation d'un log des bactéries lactiques. Outre cette modification, les autres valeurs restent similaires à celles obtenues à J0, ce compris pour les échantillons Da-D.

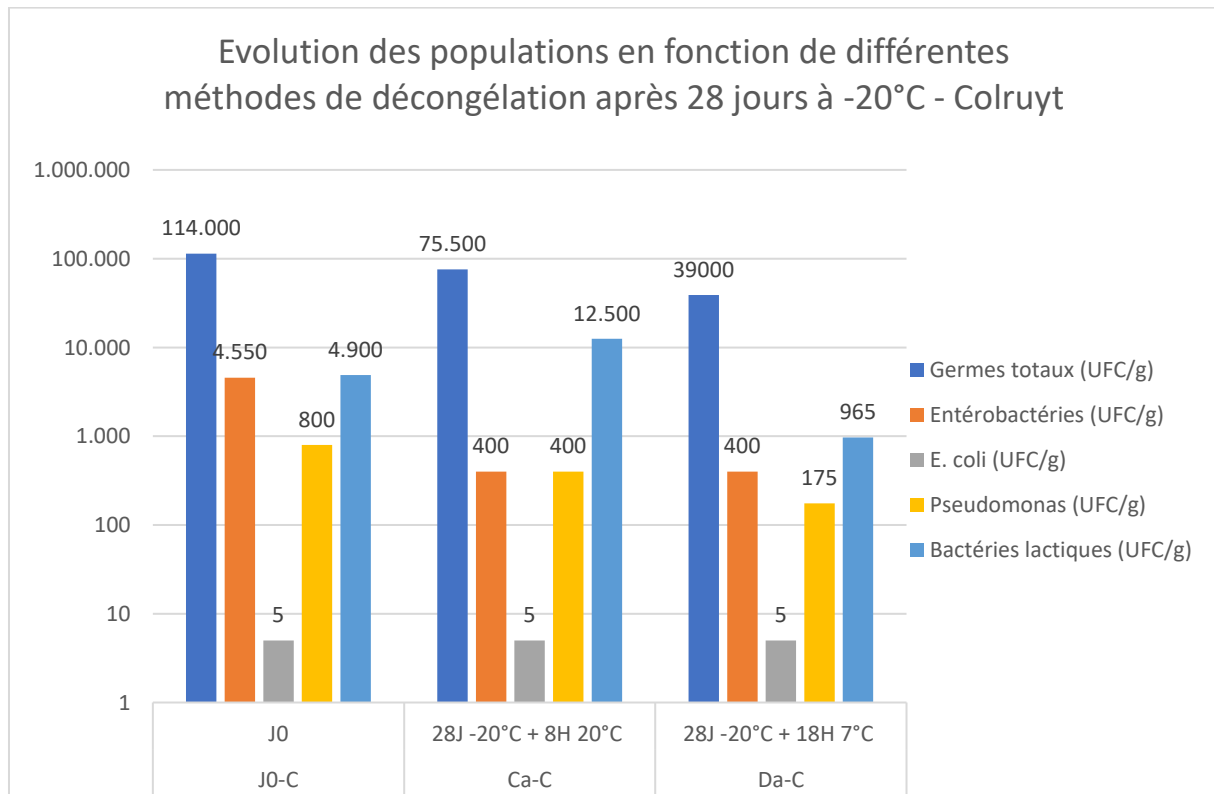
Figure 7 : Dénombrement microbiologique après 7 jours de congélation - Colruyt (protocole 2)



Pour les échantillons décongelés à 20° C pendant 8 heures (Aa-C), on constate une augmentation de deux log pour la population de bactéries lactiques, une légère augmentation de la population de *Pseudomonas* et une diminution d'un log des entérobactéries. La flore totale reste stable.

Pour les échantillons décongelés à 7° C pendant 18 heures (Ba-C), on constate une augmentation d'un log des bactéries lactiques, une légère augmentation de la flore totale et des *Pseudomonas*, et une diminution d'un log des entérobactéries.

Figure 8 : Dénombrement microbiologique après 28 jours de congélation - Colruyt (protocole 2)



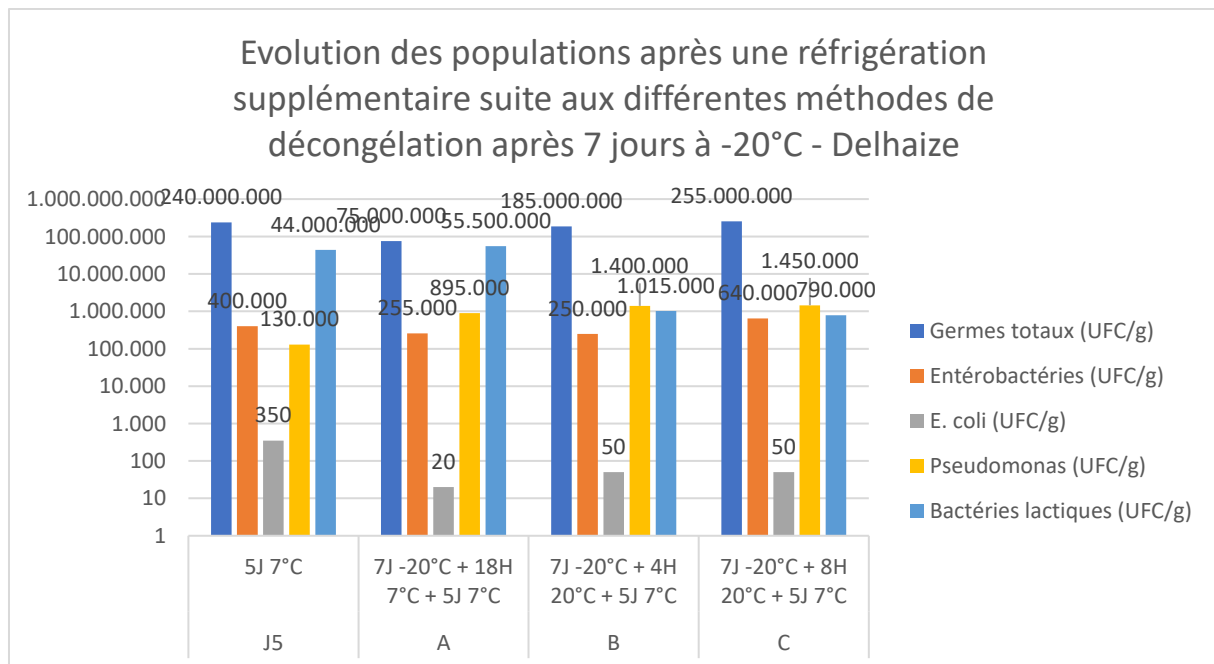
Il est remarqué, et ce indépendamment de la méthode de décongélation, une diminution de la flore totale appuyée par la congélation de 28 jours. Cette diminution est cependant plus marquée pour les échantillons Da-C, puisqu'une diminution d'un log est visible en comparaison avec les valeurs observées à J0. De même, une diminution d'un log concernant les entérobactéries est observée sans l'impact de la méthode de décongélation utilisée.

Concernant les échantillons ayant subi une décongélation à 20° C pendant 8 heures (Ca-C), on constate une augmentation d'un log pour les bactéries lactiques.

Il est également remarqué une diminution des bactéries lactiques pour les échantillons décongelés à 7° C pendant 18 heures.

4.2. Analyses post-posées par rapport à la décongélation

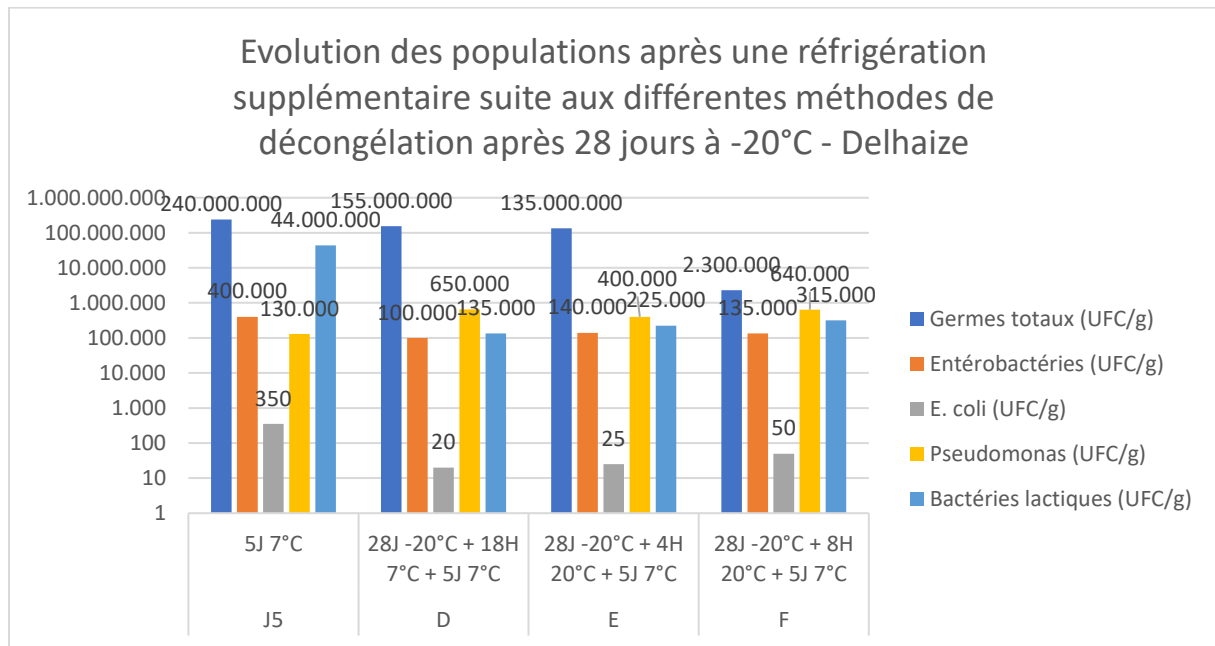
Figure 9 : Dénombrement microbiologique différé après 7 jours de congélation - Delhaize (protocole 1)



En ce qui concerne les échantillons A, qui ont été décongelés à 7° C, on remarque une diminution d'un log pour les germes totaux et *E. coli*, et une augmentation de *Pseudomonas* et des bactéries lactiques.

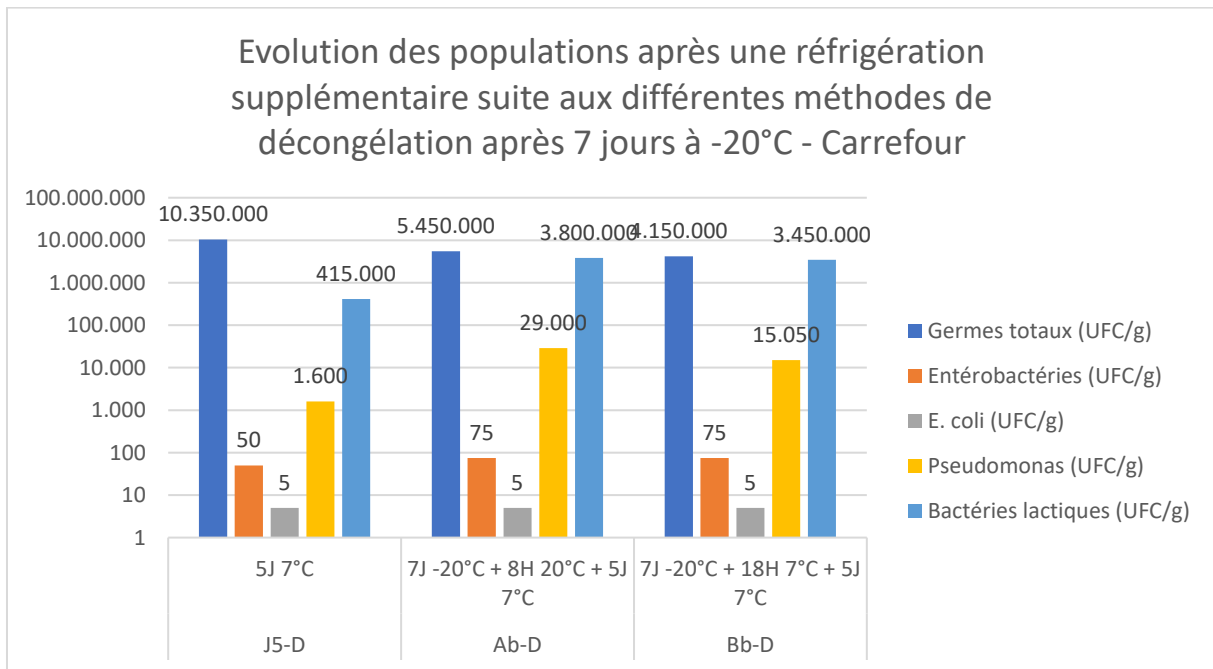
En ce qui concerne les échantillons C, qui ont été décongelés à 20° C, la flore totale et les entérobactéries restent stables, on constate une diminution d'un log pour les bactéries lactiques et pour *E. coli*, et une augmentation d'un log pour *Pseudomonas*.

Figure 10 : Dénombrement microbiologique différé après 28 jours de congélation - Delhaize (protocole 1)



De manière globale, on constate une diminution de la flore totale, qui est cependant plus marquée pour les échantillons F puisqu'elle s'élève à deux log. On peut également observer une diminution de deux log pour les bactéries lactiques, d'un log pour les *E. coli* et une diminution des entérobactéries après décongélation. On remarque également une augmentation des *Pseudomonas*.

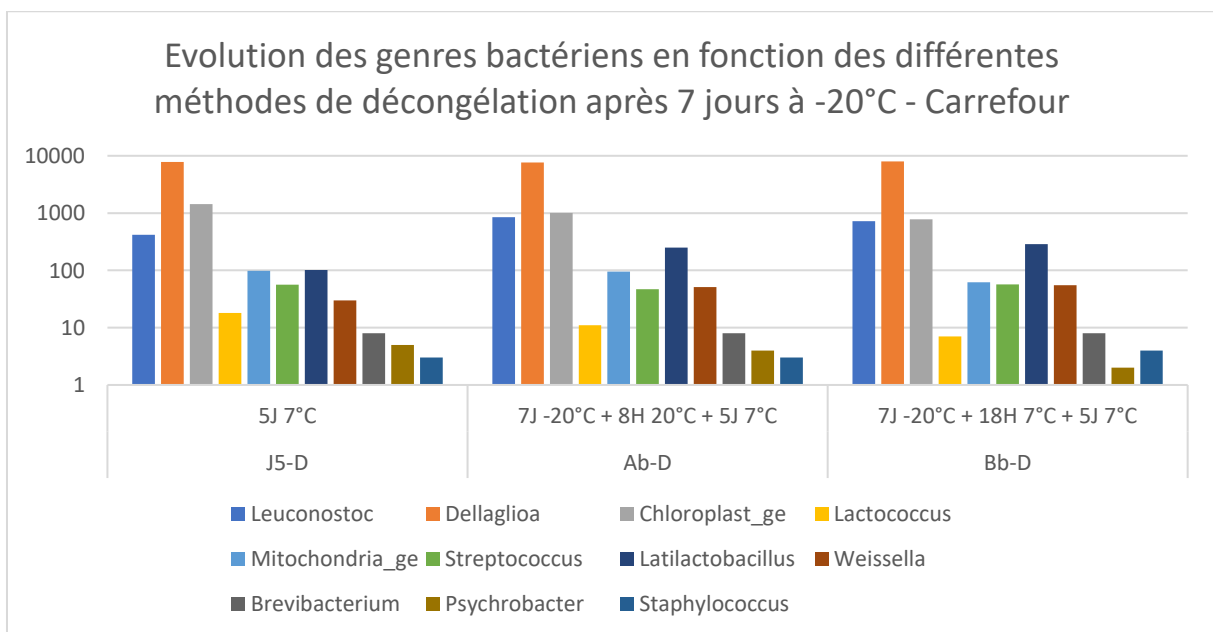
Figure 11 : Dénombrement microbiologique différé après 7 jours de congélation - Carrefour (protocole 2)



En ce qui concerne la flore totale, on peut remarquer une diminution similaire quelque soit la méthode de décongélation. Les entérobactéries et la population d'*E. coli* restent stables. On peut observer une augmentation d'un log pour les *Pseudomonas* et pour les bactéries lactiques.

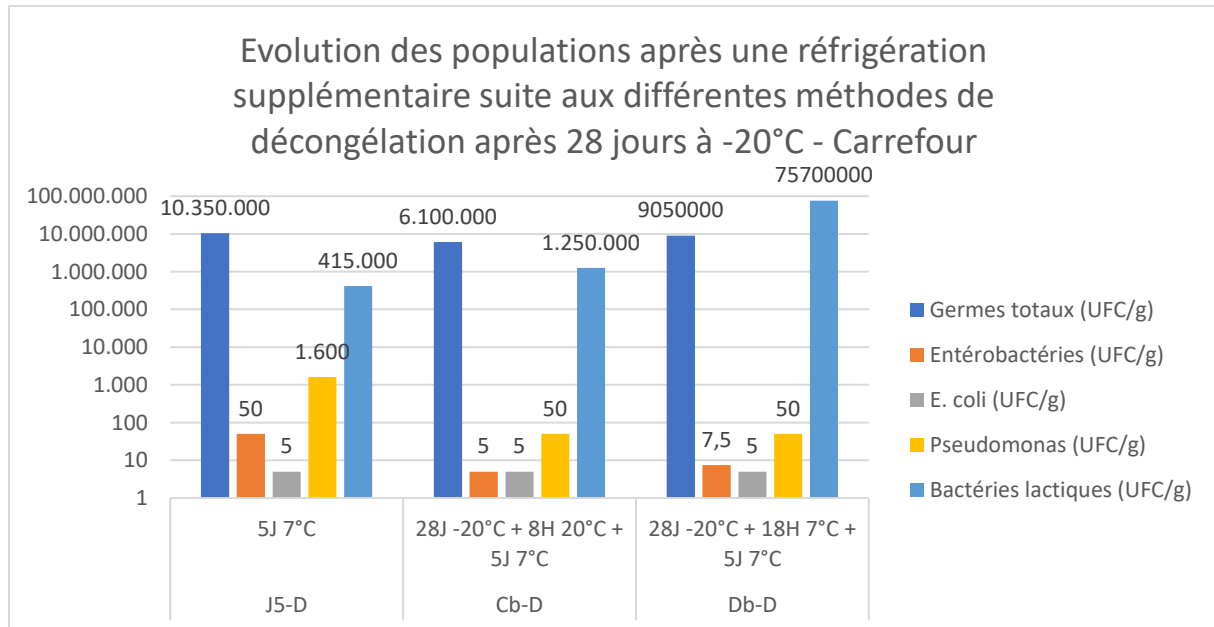
Dans ce cas, il n'y a pas de différence marquante entre les différentes méthodes de décongélation.

Figure 12 : Différence dans les genres bactériens après 7 jours de congélation -Carrefour



On remarque qu'une congélation de 7 jours à -20°C n'a pas impacté la diversité des genres bactériens présents dans les échantillons, hormis une légère augmentation du genre *latilactobacillus*. De plus, aucune différence significative n'est à notifier en ce qui concerne l'impact des deux méthodes de décongélation différentes sur la diversité bactérienne.

Figure 13 : Dénombrement microbiologique différé après 28 jours de congélation - Carrefour (protocole 2)

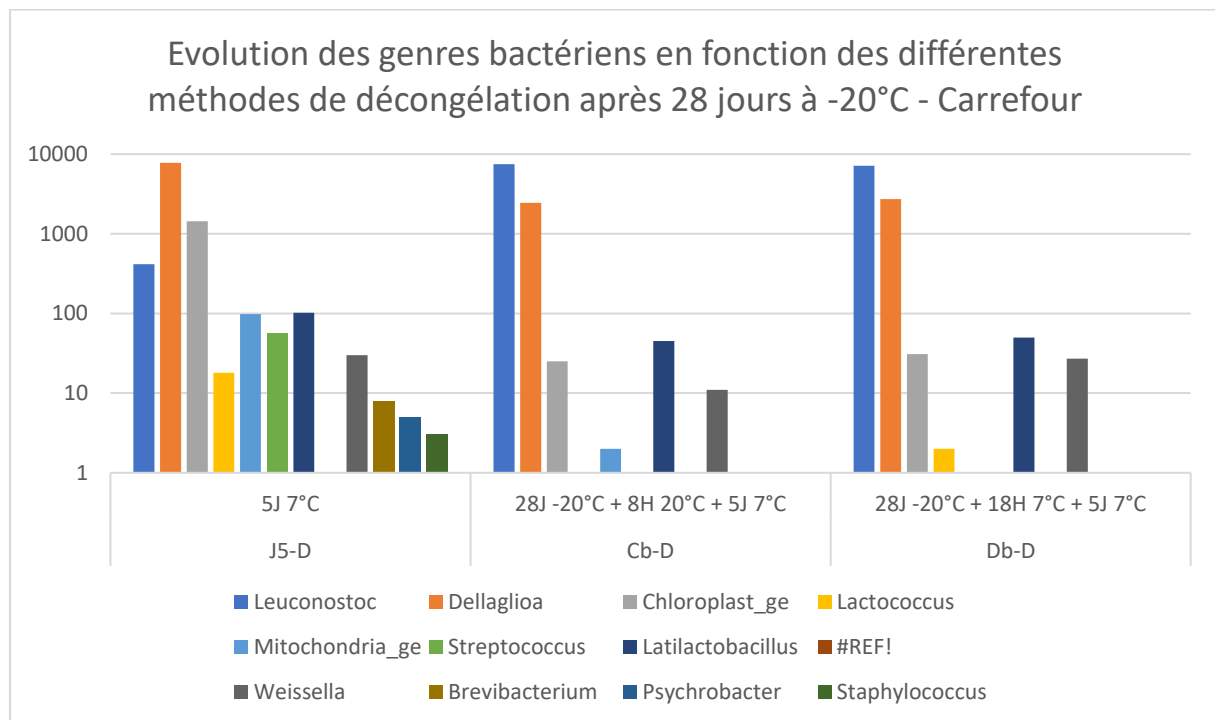


Globalement, on remarque une légère diminution de la flore totale, qui est cependant moins marquée pour les échantillons décongelés à 7° C pendant 18 heures. Pour les entérobactéries et *Pseudomonas*, on peut observer une diminution similaire pour les deux méthodes de décongélation. Aucune évolution n'est à constater pour *E. coli*.

La tendance est différente pour les bactéries lactiques, on constate une augmentation d'un log pour les échantillons décongelés à 20° C et de deux log pour les échantillons décongelés à 7° C.

Dans ce cas, on peut constater que la décongélation à 7° C suivie de la conservation à 7° C durant 5 jours supplémentaires permet un plus grand développement des bactéries lactiques dans les échantillons.

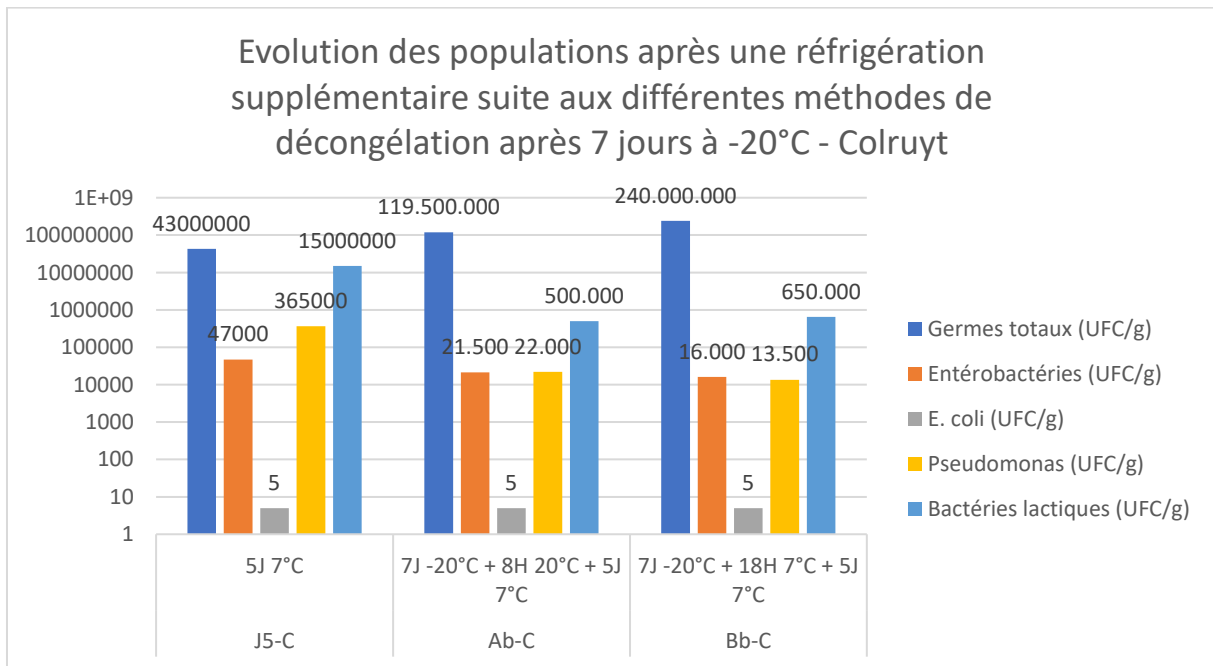
Figure 14 : Différence dans les genres bactériens après 28 jours de congélation - Carrefour



On peut remarquer qu'avec une congélation longue de 28 jours, on aura une perte de diversité importante après décongélation. Nous observons une diminution voir disparition des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Brevibacterium*, *Psychrobacter* et *Staphylococcus*. A contrario, on remarque que le genre *Leuconostoc* est augmenté en quantité.

On remarque également que la température de décongélation n'impacte pas les genres bactériens retrouvés après une congélation de 28 jours.

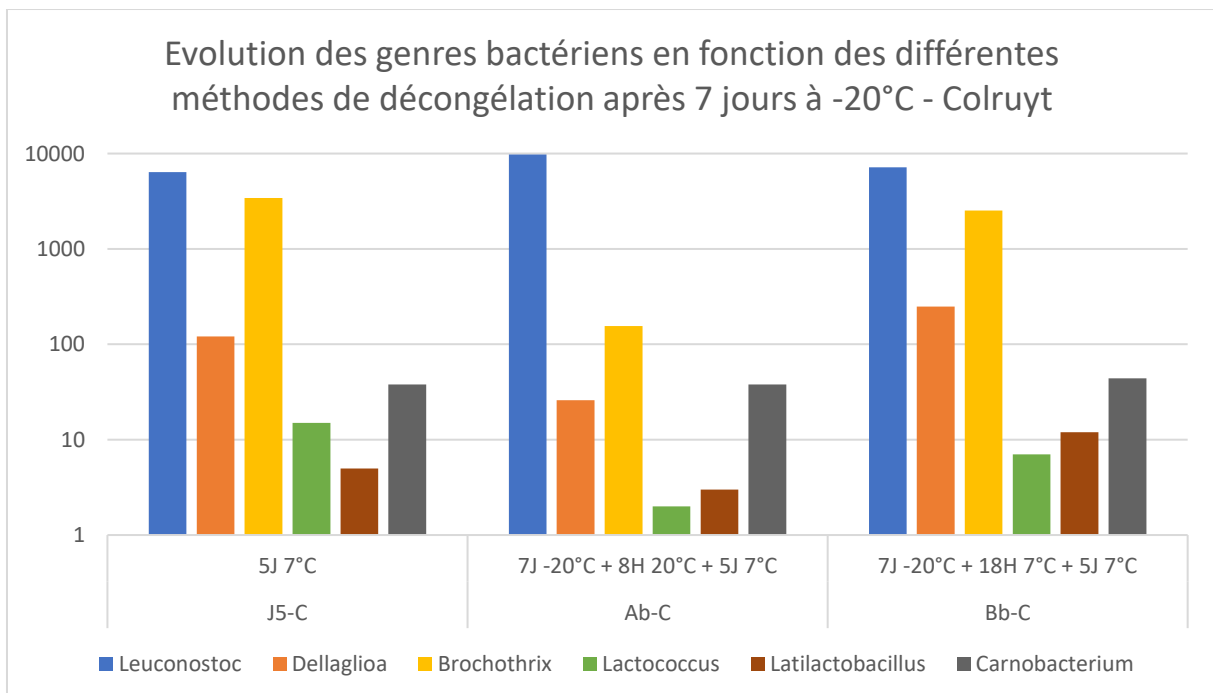
Figure 15 : Dénombrement microbiologique différé après 7 jours de congélation - Colruyt (protocole 2)



Dans la globalité, on constate une augmentation d'un log pour la flore totale, une diminution d'un log pour *Pseudomonas* et les bactéries lactiques, et aucun changement notable pour les entérobactéries et *E. coli* pour les deux méthodes de décongélation.

Les différentes méthodes de décongélation n'impactent pas la population dans ce cas.

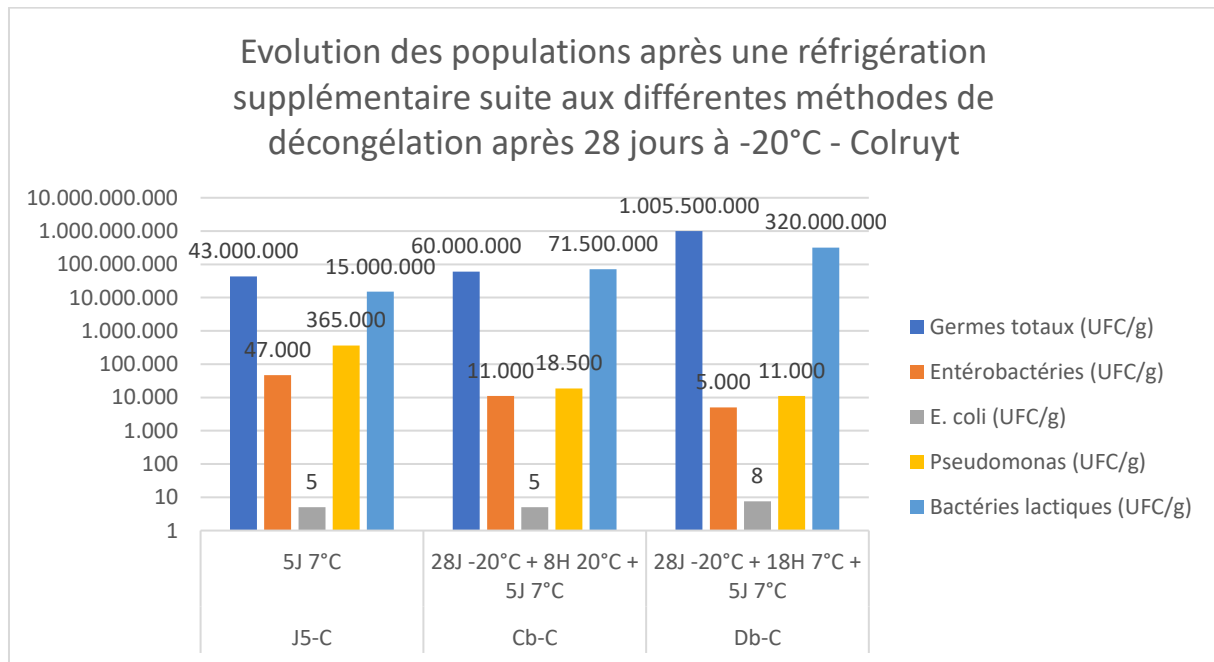
Figure 16 : Différence dans les genres bactériens après 7 jours de congélation - Colruyt



Dans l'ensemble, la congélation n'a pas impactée la diversité bactérienne présente dans ces échantillons, on remarque néanmoins une diminution des *Lactococcus* après congélation. Celle-ci est également plus marquée avec la décongélation à 20°C.

On remarque une tendance différente en fonction de la température de décongélation. A 7°C, très peu de changements sont remarqués, les bactéries en genre et en quantité semblent peu impactées. A 20°C, on remarque une légère augmentation du genre *Leuconostoc*, une diminution importante du genre *Brochotrix* et une diminution du genre *Dellaglioia*, s'additionnant à la diminution des *Lactococcus*.

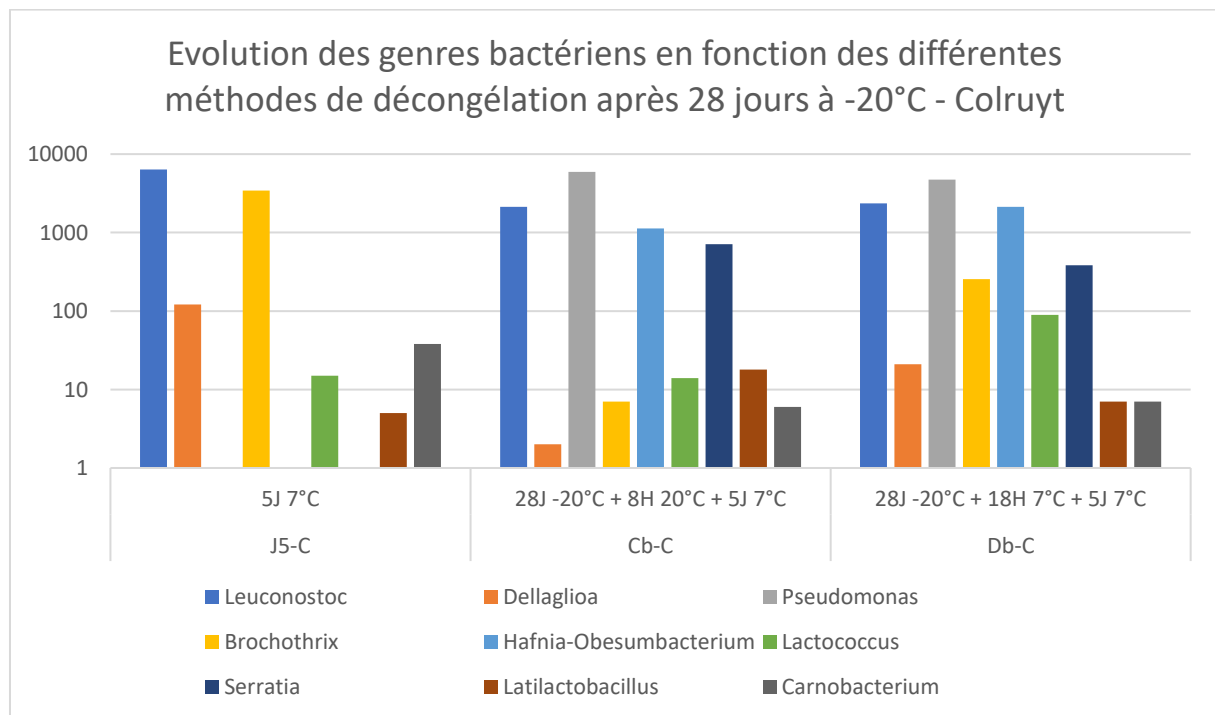
Figure 17 : Dénombrement microbiologique différé après 28 jours de congélation - Colruyt (protocole 2)



En ce qui concerne les échantillons décongelés à 20° C pendant 8 heures, on remarque que la flore totale, les entérobactéries et la population d'*E. coli* restent stables par rapport aux données de comparaison. On observe une diminution d'un log pour les *Pseudomonas* et une légère augmentation pour les bactéries lactiques.

Pour les échantillons ayant subi une décongélation à 7° C pendant 18 heures, on constate une augmentation de deux log de la flore totale et une augmentation d'un log des bactéries lactiques. Les entérobactéries et les *Pseudomonas* sont tout deux diminués de l'ordre d'un log.

Figure 18 : Différence dans les genres bactériens après 28 jours de congélation - Colruyt



Après une congélation de 28 jours, on remarque une modification importante dans les genres bactériens créant la diversité de nos échantillons avant et après congélation/décongélation.

Globalement on observe une apparition de Pseudomonas, d'Hafnia et de Serratia après congélation, ainsi qu'une légère diminution des Leuconostoc.

Lors de la décongélation à 20°C, on observe en plus une diminution importante des genres Dellaglioia et Brochothrix, une légère diminution des Carnobacterium et une légère augmentation des Latilactobacillus. Lors de la décongélation à 7°C, on observe une diminution des genres Dellaglioia, Brochothrix et Carnobacterium ainsi qu'une augmentation de Lactococcus.

5. Discussion

6. Bibliographie

Articles publiés dans un périodique scientifique

- Blickstad, Elisabeth. 1984. « The Effect of Water Activity on Growth and End-Product Formation of Two *Lactobacillus* Spp. and *Brochothrix Thermosphacta* ATCC 11509T ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 19 (janvier): 13-17.
<https://doi.org/10.1007/BF00252810>.
- Cauchie, Emilie, Laurent Delhalle, Bernard Taminiau, Assia Tahiri, Nicolas Korsak Koulagenko, Sophie Burteau, Abdoulaye Papa Fall, Frédéric Farnir, Ghislain Baré, et Georges Daube. 2020. « Assessment of Spoilage Bacterial Communities in Food Wrap and Modified Atmospheres-Packed Minced Pork Meat Samples by 16S rDNA Metagenetic Analysis. » *Frontiers in Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03074>.
- Choi, Y. M., H. J. Park, H. I. Jang, S. A. Kim, J. Y. Imm, I. G. Hwang, et M. S. Rhee. 2013. « Changes in Microbial Contamination Levels of Porcine Carcasses and Fresh Pork in Slaughterhouses, Processing Lines, Retail Outlets, and Local Markets by Commercial Distribution ». *Research in Veterinary Science* 94 (3): 413-18.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.015>.
- De Filippis, Francesca, Antonietta La Stora, Francesco Villani, et Danilo Ercolini. 2013. « Exploring the Sources of Bacterial Spoilers in Beefsteaks by Culture-Independent High-Throughput Sequencing ». *PLoS One* 8 (7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070222>.
- Delhalle, L., N. Korsak, B. Taminiau, C. Nezer, S. Burteau, V. Delcenserie, J. B. Pouillet, et G. Daube. 2016. « Exploring the Bacterial Diversity of Belgian Steak Tartare Using Metagenetics and Quantitative Real-Time PCR Analysis ». *Journal of Food Protection* 79 (2): 220-29. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-185>.
- Devoyod, J. J., et Françoise Poullain. 1988. « Les Leuconostocs. Propriétés : leur rôle en technologie laitière ». *Le Lait* 68 (3): 249-79. <https://doi.org/10.1051/lait:1988317>.
- Dykes, Gary A. 2006. « Laboratory-Based Simulation of Freezing Profiles of Beef Trim for *Escherichia Coli* O157 Survival Determinations ». *Journal of Microbiological Methods* 64 (2): 266-74. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.05.006>.
- Georgsson, Franklín, Ásmundur E. Þorkelsson, Margrét Geirsdóttir, Jarle Reiersen, et Norman J. Stern. 2006. « The Influence of Freezing and Duration of Storage on *Campylobacter* and Indicator Bacteria in Broiler Carcasses ». *Food Microbiology* 23 (7): 677-83.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.10.003>.

- Jiang, Yanfen, Yinghui Ma, Qianqian Liu, Tianmei Li, Yiming Li, Kangkang Guo, et Yanming Zhang. 2022. « Tracing Clostridium Perfringens Strains from Beef Processing of Slaughter House by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and the Distribution and Toxinotype of Isolates in Shaanxi Province, China ». *Food Microbiology* 101. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103887>.
- Klein, Stefanie, Carlos Lorenzo, Sonja Hoffmann, Johannes M. Walther, Sonja Storbeck, Tanja Piekarski, Bryan J. Tindall, Victor Wray, Manfred Nimtz, et Jürgen Moser. 2009. « Adaptation of Pseudomonas Aeruginosa to Various Conditions Includes TRNA-Dependent Formation of Alanyl-Phosphatidylglycerol ». *Molecular Microbiology* 71 (3): 551-65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06562.x>.
- Koutsoumanis, K., A. Stamatiou, P. Skandamis, et G.-J. E. Nychas. 2006. « Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and PH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1): 124-34. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.124-134.2006>.
- Lianou, Alexandra, et Konstantinos P. Koutsoumanis. 2009. « Evaluation of the Effect of Defrosting Practices of Ground Beef on the Heat Tolerance of Listeria Monocytogenes and Salmonella Enteritidis ». *Meat Science* 82 (4): 461-68. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.018>.
- Limsong, S., et W. C. Frazier. 1966. « Adaptation of Pseudomonas Fluorescens to Low Levels of Water Activity Produced by Different Solutes ». *Applied Microbiology* 14 (6): 899-901. <https://doi.org/10.1128/am.14.6.899-901.1966>.
- Manios, Stavros G., et Panagiotis N. Skandamis. 2015. « Effect of Frozen Storage, Different Thawing Methods and Cooking Processes on the Survival of Salmonella Spp. and Escherichia Coli O157:H7 in Commercially Shaped Beef Patties ». *Meat Science* 101: 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.031>.
- Martin, Tiphaine C., Alessia Visconti, Tim D. Spector, et Mario Falchi. 2018. « Conducting Metagenomic Studies in Microbiology and Clinical Research ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (20): 8629-46. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9209-9>.
- Meng, Lu, Yangdong Zhang, Huimin Liu, Shengguo Zhao, Jiaqi Wang, et Nan Zheng. 2017. « Characterization of Pseudomonas spp. and associated proteolytic properties in raw

- milk stored at low temperatures ». *Frontiers in Microbiology* 8 (novembre): 2158.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02158>.
- Moi, Ibrahim Musa, Noordiyanah Nadhirah Roslan, Adam Thean Chor Leow, Mohd Shukuri Mohamad Ali, Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman, Azam Rahimpour, et Suriana Sabri. 2017. « The Biology and the Importance of Photobacterium Species ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (juin): 4371-85.
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8300-y>.
- Nychas, George-John E., Panos N. Skandamis, Chrysoula C. Tassou, et Konstantinos P. Koutsoumanis. 2008. « Meat Spoilage during Distribution ». *Meat Science*, Symposium on Meat safety: From Abattoir to Consumer, 78 (1): 77-89.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>.
- Roccatò, Anna, Mieke Uyttendaele, Veronica Cibin, Federica Barrucci, Veronica Cappa, Paola Zavagnin, Alessandra Longo, Paolo Catellani, et Antonia Ricci. 2015. « Effects of Domestic Storage and Thawing Practices on Salmonella in Poultry-Based Meat Preparations ». *Journal of Food Protection* 78 (12): 2117-25.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-048>.
- Salveti, Elisa, Ilenia Campedelli, Ilaria Larini, Giada Conedera, et Sandra Torriani. 2021. « Exploring Antibiotic Resistance Diversity in *Leuconostoc* Spp. by a Genome-Based Approach: Focus on the *LsaA* Gene ». *Microorganisms* 9 (3): 491.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030491>.
- Tordjman-Valency, Laura. 2016. « Défi du dénombrement microbien dans l'industrie pharmaceutique : les nouvelles méthodes alternatives sont-elles appliquées ? »
<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01373145>.
- Wang, Xiang, Evy Lahou, Elien De Boeck, Frank Devlieghere, Annemie Geeraerd, et Mieke Uyttendaele. 2015. « Growth and Inactivation of Salmonella Enterica and *Listeria Monocytogenes* in Broth and Validation in Ground Pork Meat during Simulated Home Storage Abusive Temperature and Home Pan-Frying ». *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01161>.
- Weinroth, Margaret D., Brianna C. Britton, Kathryn R. McCullough, Jennifer N. Martin, Ifigenia Geornaras, Rob Knight, Keith E. Belk, et Jessica L. Metcalf. 2019. « Ground Beef Microbiome Changes with Antimicrobial Decontamination Interventions and Product Storage ». *PLoS One* 14 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217947>.

Livres

Mémoire et thèse de doctorat

Fall, Papa-Abdoulaye. 2011. « Études des interactions entre la bactérie bioprotectrice *Lactococcus piscium* et *Brochothrix thermosphacta* et *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale ». Université de Nantes.
<https://archimer.ifremer.fr/doc/00050/16164/>.

Page WEB

« Quelle est la consommation de viande et de poisson en Belgique ? » 2022. Celagri. 14 juillet 2022. <https://www.celagri.be/quelle-est-la-consommation-de-viande-en-belgique/>.

7. Annexes

7.1. Plan de congélation et d'analyses protocole 1

ORIGINE DE LA VIANDE	BARQUETTE	ECHANTILLON	JOUR DE L'ANALYSE	CONGELATION ¹	METHODE DE DECONGELATION ²
DELHAIZE ANS	J0A	J0A1 et J0A2	J0	X	/
	J0B	J0B1 et J0B2			
	J5A	J5A1 et J5A2	J5	X	/
	J5B	J5B1 et J5B2			
	AA	AA1 et AA2	J13	V1	M1
	AB	AB1 et AB2			
	BA	BA1 et BA2	J12	V1	M2
	BB	BB1 et BB2			
	CA	CA1 et CA2	J12	V1	M3
	CB	CB1 et CB2			
	DA	DA1 et DA2	J35	V2	M1
	DB	DB1 et DB2			
	EA	EA1 et EA2	J34	V2	M2
	EB	EB1 et EB2			
	FA	FA1 et FA2	J34	V2	M3
	FB	FB1 et FB2			

¹ X : non, V1 : 7 jours, V2 : 28 jours

² M1 : 18 heures à 7 °C, M2 : 4 heures à 20 °C, M3 : 8 heures à 20 °C

7.2. Plan de congélation et d'analyse protocole 2

ORIGINE DE LA VIANDE	BARQUETTE	ECHANTILLON	JOUR DE L'ANALYSE	CONGELATION ¹	METHODE DE DECONGELATION ²	CONSERVATION POST-CONGELATION ³	
CARREFOUR	J0-D	J0-D1 et J0-D2	J0	X	/	/	
	J5-D	J5-D1 et J5-D2	J5	X	/	/	
	Aa-D	Aa-D1 et Aa-D2	J7	V1	M3	X	
	Ab-D	Ab-D1 et Ab-D2	J11	V1	M3	V	
	Ba-D	Ba-D1 et Ba-D2	J7	V1	M1	X	
	BONCELLES	Bb-D	Bb-D1 et Bb-D2	J11	V1	M1	V
		Ca-D	Ca-D1 et Ca-D2	J26	V2	M3	X
		Cb-D	Cb-D1 et Cb-D2	J32	V2	M3	V
		Da-D	Da-D1 et Da-D2	J26	V2	M1	X
		Db-D	Db-D1 et Db-D2	J32	V2	M1	V
COLRUYT	J0-C	J0-C1 et J0-C2	J0	X	/	/	
	J5-C	J5-C1 et J5-C2	J5	X	/	/	
	Aa-C	Aa-C1 et Aa-C2	J7	V1	M3	X	
	Ab-C	Ab-C1 et Ab-C2	J11	V1	M3	V	
	Ba-C	Ba-C1 et Ba-C2	J7	V1	M1	X	
	BONCELLES	Bb-C	Bb-C1 et Bb-C2	J11	V1	M1	V
		Ca-C	Ca-C1 et Ca-C2	J26	V2	M3	X
		Cb-C	Cb-C1 et Cb-C2	J32	V2	M3	V
		Da-C	Da-C1 et Da-C2	J26	V2	M1	X
		Db-C	Db-C1 et Db-C2	J32	V2	M1	V

¹ X : non, V1 : 7 jours, V2 : 28 jours

² M1 : 18 heures à 7 °C, M2 : 4 heures à 20 °C, M3 : 8 heures à 20 °C

³ X : non, V : 5 jours à 7 °C

7.3. Ensemencements réalisés lors du protocole 1 et du protocole 2

PROTOCOLE 1

		PCA	VRBG	TBX	CFC	MRS
J0	J0	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM
J5	J5	Surface : D3	Surface : D3	Surface : SM	Surface : D3	Surface : D1
		Surface : D5	Surface : D5		Surface : D5	Surface : D4
A	J13	Surface : D2	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D2
		Surface : D4	Surface : D4	Surface : D2	Surface : D4	Surface : D4
B	J12	Surface : D2	Surface : D2	Surface : SM	Surface : SM	Surface : D2
		Surface : D5	Surface : D5	Surface : D2	Surface : D3	Surface : D5
C	J12	Surface : D2	Surface : D2	Surface : SM	Surface : SM	Surface : D2
		Surface : D5	Surface : D5	Surface : D2	Surface : D3	Surface : D5
D	J35	Surface : D3	Surface : D1	Surface : SM	Surface : D1	Surface : D1
		Surface : D5	Surface : D3	Profondeur : SM	Surface : D3	Surface : D3
E	J34	Surface : D3	Surface : D1	Surface : SM	Surface : D2	Surface : D2
		Surface : D5	Surface : D3	Profondeur : SM	Surface : D4	Surface : D4
F	J34	Surface : D3	Surface : D1	Surface : SM	Surface : D2	Surface : D2
		Surface : D5	Surface : D3	Profondeur : SM	Surface : D4	Surface : D4

PROTOCOLE 2

		PCA	VRBG	TBX	CFC	MRS
J0-D	J0	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM
J0-C	J0	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Profondeur : SM
J5-D	J5	Surface : D1	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D3	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D1
J5-C	J5	Surface : D1	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D3	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D1
AA-D	J7	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D2	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D2
		Surface : D3				
AA-C	J7	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D2	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D2
		Surface : D3				
AB-D	J11	Surface : D1	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1
		Surface : D3	Surface : D2		Surface : D2	Surface : D3
AB-C	J11	Surface : D1	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1
		Surface : D3	Surface : D2		Surface : D2	Surface : D3
BA-D	J7	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D2	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D2
BA-C	J7	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM	Surface : SM

		Surface : D2	Surface : D2	Profondeur : SM	Surface : D2	Surface : D2
BB-D	J11	Surface : D1	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1
		Surface : D3	Surface : D2		Surface : D2	Surface : D3
BB-C	J11	Surface : D1	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1
		Surface : D3	Surface : D2		Surface : D2	Surface : D3
CA-D	J26	Surface : D1	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D3	Surface : D2		Surface : D2	Surface : D2
CA-C	J26	Surface : D1	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D3	Surface : SM		Surface : D2	Surface : D2
CB-D	J32	Surface : D1	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1
		Surface : D3	Surface : SM			Surface : D3
CB-C	J32	Surface : D1	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1
		Surface : D3	Surface : D1			Surface : D3
DA-D	J26	Surface : SM	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D2	Surface : D2		Surface : D2	Surface : D2
DA-C	J26	Surface : SM	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : SM
		Surface : D2	Surface : D2		Surface : D2	Surface : D2
DB-D	J32	Surface : D1	Profondeur : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1
		Surface : D3	Surface : SM			Surface : D3
DB-C	J32	Surface : D1	Surface : SM	Profondeur : SM	Surface : SM	Surface : D1
		Surface : D3	Surface : D1			Surface : D3