

# Filière Technologies du vivant

## Orientation Technologie alimentaire

# Diplôme 2010

*Romina Buchs*

Origine de  
*Clostridium estertheticum*  
et *Clostridium gasigenes*  
lors de la production  
de viande de bœuf sous-vide

Professeur

ESTHER SCHMITT

Experte

HELENA KNEUBÜHLER

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr <b>2009/2010</b>	No TD / Nr. DA <b>ta/2010/42</b>
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input checked="" type="checkbox"/> Industrie <b>Cher—Mignon SA   Chermignon</b> <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire	Etudiant / Student <b>Romina Buchs</b>	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire
Professeur / Dozent <b>Esther Schmitt</b>	Expert / Experte (données complètes) Helena Kneubühler Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP Schwarzenburgstrasse 161   3003 Bern	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja <sup>1</sup> <input checked="" type="checkbox"/> non / nein		

Titre / Titel

**Origine de *Clostridium estertheticum* et *Clostridium gasigenes*  
lors de la production de viande de bœuf sous-vide**

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Il arrive parfois que du gaz se forme dans les emballages de viande de boeuf sous-vide réfrigérés. La présence de *Clostridium estertheticum* ainsi qu'éventuellement d'autres Clostridies est à l'origine de ce phénomène. *Clostridium estertheticum* est un anaérobe sporulant qui tolère de basses températures et qui entraîne une altération de la viande. L'origine de la contamination de la viande n'est pas entièrement connue. A ce jour, il est présumé que le détachement de la peau lors de l'abattage soit le facteur de propagation des germes.

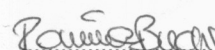
- Recherche de littérature
- Identification de *Clostridium estertheticum* et *Clostridium gasigenes* au moyen de la méthode PCR développée pour les germes issus d'échantillons de viande bombés
- Analyse GC de la composition du gaz des emballages bombés
- Identification par MALDI-TOF MS des souches isolées (effectué par l'entreprise Mabritec AG | Riehen)
- Etude de l'origine et de la transmission des germes en collaboration avec la Société Cher—Mignon, ainsi que différents abattoirs suisses.

Délais / Termine

Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:  
03.05.2010Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:  
27.08.2010Fin des travaux en laboratoires / Ende Laborarbeiten:  
16.07.2010Défense orale / Mündliche Verteidigung:  
dès la semaine 35 / ab Woche 35Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:  
20.08.2010 | 12h00

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

Responsable de la filière  
Leiter des Studiengangs: .....

<sup>1</sup> Etudiant/Student: .....


<sup>1</sup> Par sa signature, l'étudiant s'engage à respecter strictement le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition; il s'engage également à appliquer formellement la directive y relative.  
Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Richtlinie einzuhalten sowie die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.



www.flickr.com, by Lionoche

## Travail de diplôme | édition 2010 |

Filière  
*Technologies du vivant*

Domaine d'application  
*Agroalimentaire*

Professeur responsable  
*Esther Schmitt*  
[esther.schmitt@hevs.ch](mailto:esther.schmitt@hevs.ch)

Partenaire  
*Cher-Mignon SA | Chermignon*

# Origine de *Clostridium estertheticum* et *Clostridium gasigenes* lors de la production de viande de bœuf sous-vide

■ Diplômant/e Romina Buchs

## Objectif du projet

Identification de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* sur des échantillons de viande sous-vide gonflés au moyen de la méthode PCR, étude de leur origine et transmission, analyse du gaz formé et identification des souches par MALDI-TOF.

## Méthodes | Expériences | Résultats

Le jus issu des échantillons de viande sous-vide gonflés a été soumis à une extraction d'ADN et à une analyse PCR en utilisant des amorces spécifiques pour *C. estertheticum* et *C. gasigenes*. Les fragments d'ADN ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse. L'analyse du gaz par micro GC des paquets bombés a aussi été faite.

En parallèle, des prélèvements par écouvillonnage ont été faits dans différents abattoirs. Après enrichissement, ils ont été soumis à une analyse PCR, afin de déterminer la présence des deux clostridies d'intérêt. Les deux souches issues des viandes bombées et des prélèvements ont été isolées sur plaque et identifiées par MALDI-TOF.

L'analyse des viandes a donné des résultats positifs pour *C. estertheticum* et négatifs pour *C. gasigenes*. Par contre, les deux clostridies ont été retrouvées sur la peau des vaches, dans leurs fèces et dans les souillures sur le sol de la partie sale des abattoirs. La vache est donc le réservoir et la source de contamination primaire.

L'isolation des deux clostridies a été difficile. Elle exige des conditions anaérobies strictes. Le gaz des paquets gonflés est composé en majorité de CO<sub>2</sub> et présente une odeur typique de beurre rance.



Paquet de viande sous vide gonflé.



www.flickr.com, by Lionoche

## Diplomarbeit | 2010 |

Studiengang  
*Life Technologies*

Anwendungsbereich  
*Lebensmitteltechnologie*

Verantwortliche/r Dozent/in  
*Esther Schmitt*  
[esther.schmitt@hevs.ch](mailto:esther.schmitt@hevs.ch)

Partner  
*Cher-Mignon SA | Chermignon*

# Herkunft von *Clostridium estertheticum* und *Clostridium gasigenes* bei vakuumverpacktem Rindfleisch

Diplomand/in Romina Buchs

## Ziel des Projekts

Identifikation mittels PCR von *C. estertheticum* und *C. gasigenes* aus vakuumverpackten Fleischproben die während der Kühlagerung aufblähen. Studie des Ursprungs und der Kontaminationswege der Keime, sowie Analyse des gebildeten Gases und Identifizierung der Stämme mittels MALDI-TOF MS.

## Methoden | Experimente | Resultate

Mit dem Fleischtropfsaft von aufgeblähten Fleischproben wurde eine DNA Extraktion und anschliessend eine PCR Analyse durchgeführt. Spezifische Primer für *C. estertheticum* und *C. gasigenes* wurden dazu verwendet. Die erhaltenen DNA Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese getrennt. Das in den Fleischpackungen gebildete Gas wurde mittels Mikro-Gaschromatographie analysiert.

Gleichzeitig wurden Tupferproben in verschiedenen Schlachthöfen entnommen. Diese wurden nach Anreicherung mittels PCR Analyse untersucht um das Vorhandensein der beiden Clostridien nachzuweisen. Die beiden Stämme wurden auf Agar Platten isoliert und mittels MALDI-TOF MS identifiziert.

In den aufgeblähten Fleischproben konnte *C. estertheticum* nachgewiesen werden, *C. gasigenes* war in den Proben jedoch nicht nachweisbar. Bei den angereicherten Schlachthofproben wurden beide Keime auf den Häuten der Kühe, in deren Kot und im Viehtransporter nachgewiesen. Die Kuh scheint deshalb die Hauptkontaminationsquelle zu sein.

Die Isolierung der Clostridienstämme ist sehr schwierig. Die Übertragung von flüssigen Nährmedien auf solide Nährböden muss unter strikt anaeroben Bedingungen stattfinden.

Das Gas der aufgeblähten Fleischproben besteht mehrheitlich aus Kohlendioxid und weist einen typischen Buttersäuregeruch auf.



Aufgeblähte Fleischpackung.

## Table des matières

<b>1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Partie théorique.....</b>	<b>3</b>
2.1 Le marché suisse de la viande.....	3
2.1.1 Exportations.....	3
2.1.2 Importations.....	5
2.2 L'altération de la viande sous-vide.....	7
2.2.1 Conditions de stockage et qualité optimales.....	7
2.2.2 Conditions de stockage et qualité défectueuses.....	7
2.2.3 Altération par les clostridies.....	7
2.3 Caractéristiques de <i>C. estertheticum</i> , <i>C. gasigenes</i> et d' autres clostridies psychrophiles/psychrotrophes.....	8
2.3.1 Les termes psychrophiles et psychrotrophes.....	8
2.3.2 Description des bactéries.....	9
2.4 Détection de <i>C. estertheticum</i> et <i>C. gasigenes</i> par PCR.....	11
2.4.1 Description de la PCR.....	11
2.4.2 Le gène 16S rADN.....	12
2.4.3 Distinction entre <i>C. estertheticum</i> et organismes <i>C. estertheticum</i> -like.....	12
2.5 Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	13
<b>3 Matériel et Méthodes.....</b>	<b>14</b>
3.1 Matériel.....	14
3.2 Méthodes.....	17
3.2.1 Cultures bactériennes de référence.....	17
3.2.2 Analyse du gaz des viandes sous-vide gonflés.....	17
3.2.3 Microscopie.....	18
3.2.4 Analyse des viandes sous-vide gonflés.....	19
3.2.5 Prélèvements dans les abattoirs.....	19
3.2.6 Extraction d'ADN.....	22
3.2.7 Les amorces.....	22
3.2.8 Amplification PCR.....	22
3.2.9 Vérification sur plaque.....	23
3.2.10 Identification des colonies bactériennes par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	23
<b>4 Résultats.....</b>	<b>24</b>
4.1 Composition du gaz des paquets de viande gonflés.....	24
4.2 Détection de <i>C. estertheticum</i> et <i>C. gasigenes</i> par PCR.....	24
4.2.1 Paquets de viande gonflés.....	24
4.2.2 Prélèvements des abattoirs.....	27
4.3 Croissance de <i>C. estertheticum</i> et <i>C. gasigenes</i> sur plaque CBA.....	30
4.4 Identification des colonies bactériennes par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	32
4.5 Étude sur les cas de « blown pack » en Suisse.....	34

<b>5 Discussion.....</b>	<b>35</b>
5.1 Composition du gaz des paquets de viande gonflés.....	35
5.2 Détection de <i>C. estertheticum</i> et <i>C. gasigenes</i> par PCR.....	36
5.2.1 Paquets de viande gonflés.....	36
5.2.2 Prélèvements des abattoirs.....	36
5.3 Croissance de <i>C. estertheticum</i> et <i>C. gasigenes</i> sur plaque CBA.....	38
5.3.1 <i>C. estertheticum</i> .....	38
5.3.2 <i>C. gasigenes</i> .....	40
5.4 Identifications des colonies bactériennes par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	41
5.5 Étude sur les cas de « blown pack » en Suisse.....	42
<b>6 Conclusions et perspectives.....</b>	<b>43</b>
<b>7 Bibliographie.....</b>	<b>44</b>
<b>8 Annexes.....</b>	<b>48</b>
Annexe 1: Chiffres des exportations et importations suisses en 2009.....	49
Annexe 2: Illustration d'une PRC, du génome jusqu'au fragment désirée.....	50
Annexe 3: Mode de fonctionnement de la méthode de ionisation MALDI.....	51
Annexe 4: Distribution de Student avec niveau de signification $\alpha$ et degré de liberté $\phi$ .....	52
Annexe 5: Dilution décimale utilisé pour diluer le jus des viandes.....	53
Annexe 6: Résultats brutes de l'analyse de gaz des paquets de viande gonflés.....	54
Annexe 7: Résultats de l'identification par MALDI-TOF livrés par Mabritec AG.....	65

## Table des figures

Figure 1: "Blown pack" d'une viande emballé sous-vide.....	2
Figure 2: Exportation de viande de bœuf en 2009.....	4
Figure 3: Exportation de viande de porc en 2009.....	4
Figure 4: Importation de volaille en 2009.....	5
Figure 5: Importation de viande de porc en 2009.....	6
Figure 6: Importation de viande de bœuf en 2009.....	6
Figure 7: Importation de viande de mouton en 2009.....	6
Figure 8: Travaux effectués avec les cultures de référence, les viandes et les prélèvements.....	20
Figure 9: Coupelle MALDI.....	23
Figure 10: Analyse PCR des deux viandes de cheval issues d'emballages gonflés. ....	25
Figure 11: Analyse de la viande de bœuf issu d'un paquet gonflé.....	26
Figure 12: Analyse PCR de la viande de bœuf issu d'un paquet gonflé.....	26
Figure 13: Analyse PCR de la viande de bœuf et des deux viandes de cheval. ....	26
Figure 14: Analyse PCR des prélèvements de l'abattoir d'Oensingen.....	27
Figure 15: Analyse PCR des prélèvements de l'abattoir de Cheseaux.....	28
Figure 16: Dendrogramme issu de l'analyse des colonies cultivées à partir du jus des viandes gonflés, des prélèvements des abattoirs et des cultures de référence.....	33

## Table des tableaux

Tableau 1: Description de <i>C. estertheticum</i> et <i>C. gasigenes</i> .....	9
Tableau 2: Températures de croissance minimale, optimale et maximale de quelques clostridies psychrophiles/psychrotrophes.....	10
Tableau 3: Composants du Mastermix et leur fonction.....	11
Tableau 4: Paramètres de mesure des deux colonnes de chromatographie utilisées pour l'analyse de la composition du gaz des paquets de viande gonflés.....	17
Tableau 5: Composition du gaz de référence.....	18
Tableau 6: Informations sur les viandes emballés sous-vide gonflés qui ont été analysés.....	19
Tableau 7: Abattoirs, lieux et méthodes de prélèvement des échantillons.....	21
Tableau 8: Composition du gaz des paquets de viande gonflés, comparés à l'air ambiant.....	24
Tableau 9: Résumé de toutes les analyses PCR. ....	29
Tableau 10: Description des colonies sur plaque CBA.....	30
Tableau 11: Origine des colonies utilisées pour la spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	32
Tableau 12: Informations récoltées depuis quatre sources sur les cas de "blown pack" en Suisse....	34

## 1 Introduction

Depuis les temps les plus antiques la viande est un bien de consommation très apprécié, d'un côté à cause de sa valeur nutritionnelle élevée et de l'autre à cause de ses qualités organoleptiques. Différents mécanismes de conservation ont été trouvés afin de conserver la viande. À côté des techniques les plus classiques, comme la réfrigération, le fumage et la salaison, la progression technique en matière des plastiques dans le 20<sup>ème</sup> siècle a permis d'améliorer certaines techniques existantes comme la congélation et de mettre au point de nouvelles techniques efficaces comme l'emballage sous atmosphère modifiée ou sous-vide [1].

Malgré les nouvelles techniques d'emballage et de conservation, l'altération de la viande reste un problème d'actualité. Depuis la fin des années 80 un nouveau type d'altération lié à la viande emballée sous-vide est apparu. Il s'agit d'un type d'altération provoqué par des bactéries sporulantes de la classe des clostridia qui sont capables de se développer à de basses températures. Leur plage de croissance optimale se situe entre 10 °C et 20 °C et elles sont encore capables de se reproduire à des températures de -1.5 °C. Ces microorganismes psychrotrophes ou psychrophiles sont anaérobies obligatoires, pouvant se reproduire seulement en absence d'oxygène. La caractéristique de ces organismes est la production d'une telle quantité de gaz que les paquets de viande gonflent, raison pour laquelle ce type d'altération a reçu le nom de « blown pack » (par le monde anglophone). La production d'odeur déplaisante, associée principalement à la formation d'acides organiques et esters, est aussi associée à ce type d'altération [2].

La croissance des clostridies psychrophiles est lente. Un long temps de stockage de la viande emballée sous-vide est donc important pour le développement du « blown pack ». Une viande emballée sous-vide pendant 2-4 semaines, stockée à une température optimale de  $0 \pm 0.5$  °C, représente une ambiance adaptée à leur croissance.

Les premiers cas de « blown pack » se manifestaient avec les viandes de bœuf, mais le phénomène s'est répandu aussi sur d'autres types de viande comme celle de cheval, de mouton, de porc, de volaille et de gibier. Pas seulement la viande crue, mais aussi la viande cuite emballée sous-vide est touchée [3].

Pour le moment, l'explication la plus plausible des voies de contamination est la transmission des spores depuis la peau des animaux aux muscles lors de l'abattage et du détachement de la peau [3]. En effet les spores de ces bactéries se trouvent principalement dans le sol et sur les plantes. Leur présence a même été confirmée dans les fèces des vaches. Un transfert de ces spores sur la peau des animaux depuis l'environnement est très probable.

Actuellement, différentes souches de clostridies psychrophiles/psychrotrophes ont été associées au phénomène du « blown pack ». *Clostridium estertheticum* et *Clostridium gasigenes* sont les représentantes les plus connues par rapport à cette problématique [3]. *C. algidicarnis*, *C. fridicarnis*, *C. vincentii* sont des autres clostridies psychrophiles/psychrotrophes qui ont été décrites [4]. Toutes ces souches ont en commun la formation d'odeurs déplaisantes, mais pas toutes ne produisent du gaz et gonflent ainsi la viande réfrigérée sous-vide [5].



Le but de ce travail consiste en premier lieu à identifier les deux bactéries *C. estertheticum* et *C. gasigenes* dans des échantillons de viande de bœuf gonflés, ou d'autres types de viande, par la méthode biomoléculaire de la PCR (polymerase chain reaction). Cette méthode permet de confirmer la présence des clostridies psychrophiles/psychrotrophes dans les viandes altérées et de les identifier dans une durée très courte qui ne dépasse pas le jour. À l'inverse, les techniques d'identification classiques, qui comportent la croissance des bactéries sur des milieux exigeants et spécifiques, se sont avérées très longues et difficiles, en raison de la lente croissance et de l'anaérobiose de ces bactéries [6].

Un deuxième objectif est d'analyser la composition du gaz formé par les clostridies psychrophiles lors de l'altération des viandes, le but étant de réussir à confirmer la présence/absence des bactéries qui sont à l'origine du « blown pack ». La simple analyse du gaz servirait à identifier le type d'altération et d'en comprendre les origines. En effet la production de gaz ou de composants volatiles est différente en fonction du type d'organisme [7].

Lors de ce travail l'utilisation d'une technologie d'identification assez récente a été testée. Il s'agit de la spectrométrie de masse de type désorption-ionisation laser assistée par matrice à temps de vol (en anglais Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry). Le principe de la technique est la ionisation des protéines se trouvant dans les cellules des microorganismes et la représentation de la masse de toutes ces protéines dans un spectre qui est comparé avec une base de données. L'analyse se fait à partir d'une colonie du microorganisme d'intérêt et l'identification est assez précise et peut aller jusqu'à la différenciation des sous-espèces.

Le dernier objectif a été l'étude des voies de contamination qui amènent les spores des clostridies psychrophiles sur la viande. La localisation de ces bactéries est importante pour connaître les points les plus critiques et donc de pouvoir gérer de la manière la plus soignée toutes les manipulations liées à l'abattage des animaux. L'étude des voies de contamination a une grande importance pour l'entreprise Cher-Mignon SA, mandataire de ce travail. L'entreprise ne pratique pas l'abattage des animaux, donc connaître l'origine de ces bactéries et les voies qui les amènent à l'intérieur du bâtiment pourrait aider à la gestion des nettoyages et désinfections.



**Figure 1:** "Blown pack" d'une viande emballé sous-vide.

Source : [8]

## 2 Partie théorique

### 2.1 Le marché suisse de la viande

La production animale est une branche très importante de l'agriculture, car elle représente environ la moitié du revenu total de la branche. Le 50.8 % de la production animale est associée à la production de viande, qui représente donc une partie notable de la production suisse [9].

La consommation suisse de viande s'élève à plus de 400'000 tonnes par année. En 2008 la consommation annuelle était de 417'330 tonnes. La viande de porc était la plus consommée (196'312 t)<sup>1</sup>, suivie par celle de bœuf (88'406 t), de volaille (85'120 t) et de veau (24'382 t). En quantités nettement plus basses ont été consommées les viandes de mouton (9'849 t), de lapin et de gibier (7'184 t), de cheval (5'344 t) et de chèvre (733) [10]. En 2009, la consommation totale de viande a baissé de 1 %. La consommation de viande de veau a augmenté de 4.6 %, celles de bœuf et de porc ont baissé de 1,9 % respectivement de 1,0 %. En ce qui concerne la volaille, la consommation est restée stable [9].

La production totale de viande en 2008 s'est élevée à 440'271<sup>2</sup> tonnes, dont 231'013 t de porc, 105'143 t de bœuf, 63'830 t de volaille et 30'251 t de veau. Les quantités de viande de mouton, de cheval, de chèvre et de gibier produites étaient inférieures à la quantité consommée.

#### 2.1.1 Exportations

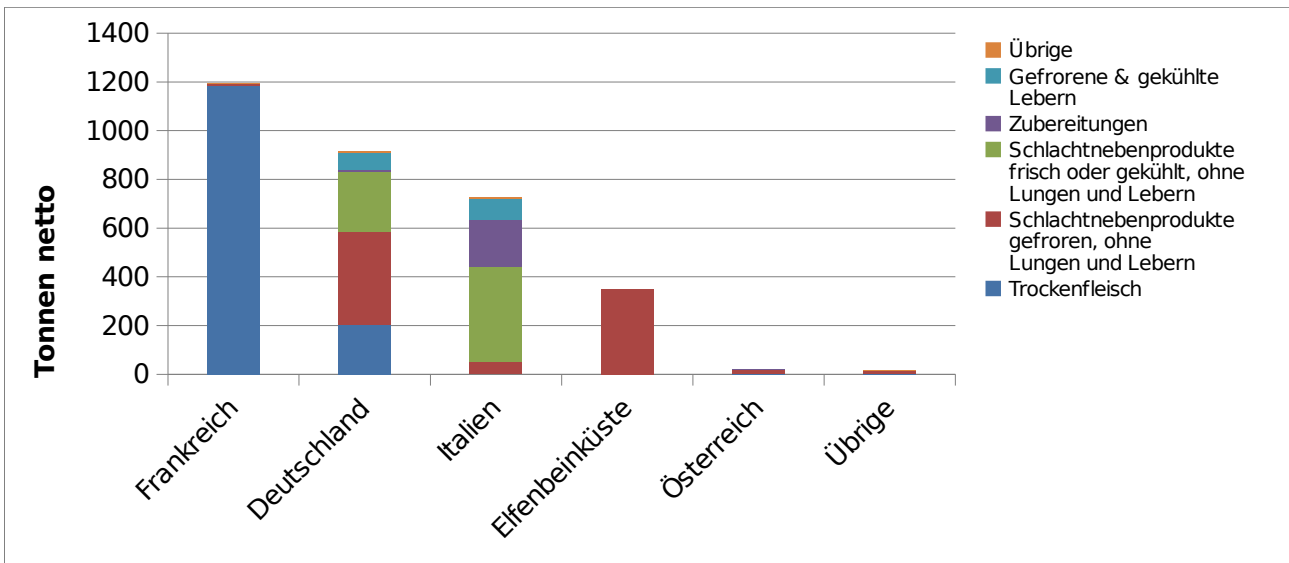
Les exportations totales de viande en 2009 s'élèvent à 4'496 tonnes, la majorité étant du bœuf (3'447 t), du porc (778 t) et du veau (158 t). La volaille (82 t), le gibier (27 t) et la viande de mouton (4 t) ont été exportés en quantités mineures. La viande de bœuf est principalement exportée en France, Allemagne et en Italie. Une plus petite partie est exportée vers la Côte d'Ivoire et l'Autriche. Tout les produits exportés sont principalement des écarts d'abattage, comme les poumons, le foie, la peau, etc. Pour la viande de porc, les exportations se font presque exclusivement avec l'Allemagne et comme pour le bœuf, les écarts d'abattage sont exportés en quantités majeures.

La problématique de l'altération « blown pack » semble être assez peu fréquente dans les produit exportés, vu la localisation relativement proche des pays de destination et la nature des produits exportés. Une perte de confiance et de réputation de la Suisse liée au phénomène « blown pack » des produits exportés est donc peu probable. D'ailleurs aucune information de ce type n'a été traitée par les médias dans les dernières années.

---

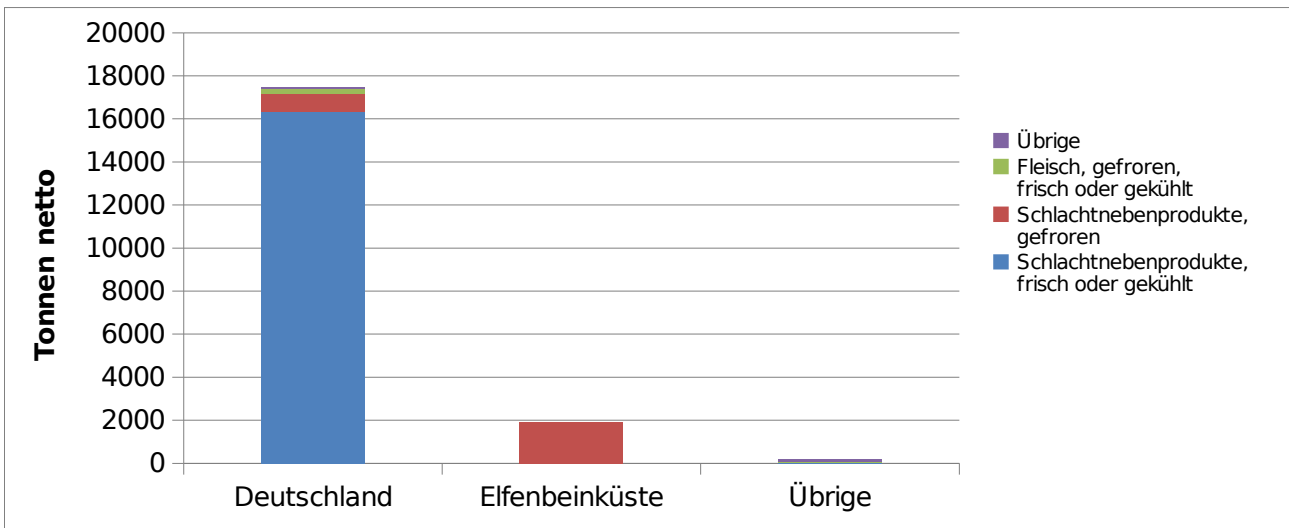
1 Tout les chiffres concernant la consommation, l'importation et l'exportation de viande sont donnés en équivalents poids de vente.

2 Tout les chiffres concernant la production de viande sont donnés en tonnes par poids mort.



**Figure 2:** Exportation de viande de bœuf en 2009

[Source : Direction générale des douanes (DGD)]



**Figure 3:** Exportation de viande de porc en 2009.

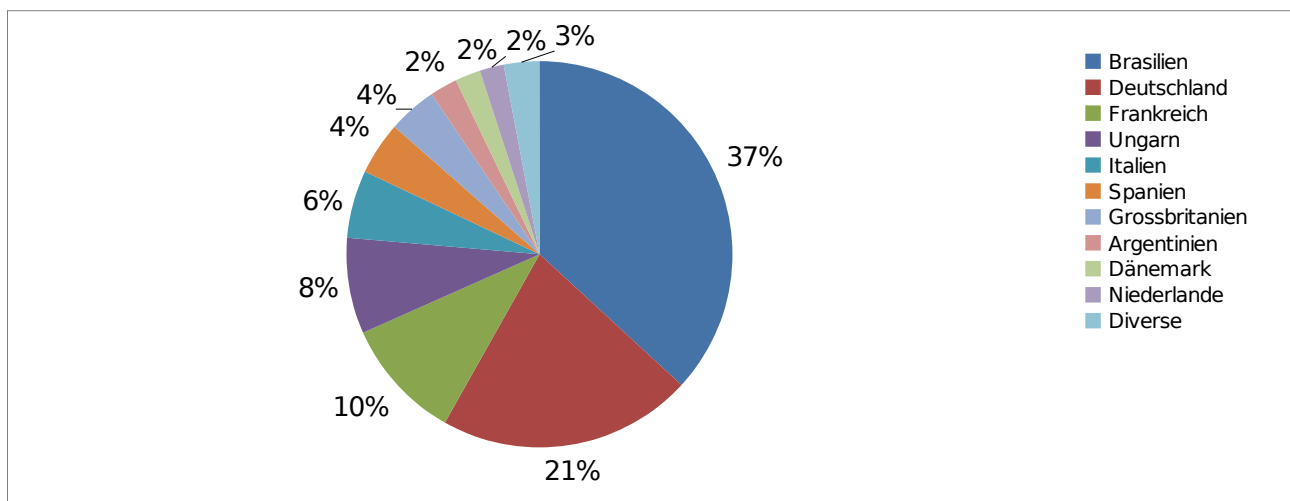
[Source : Direction générale des douanes (DGD)]

## 2.1.2 Importations

La disponibilité de viande suisse destinée à la consommation est très bonne et couvre presque tout le besoin interne. En 2009 la production interne de viande de veau a couvert le 98 % de la consommation totale. Pour la viande de bœuf seulement le 85.4 % provenait de la production Suisse. Pour ce qui concerne la volaille, les viandes de chèvre, mouton et cheval la situation est différente et plus de 50 % de la consommation est importée [11].

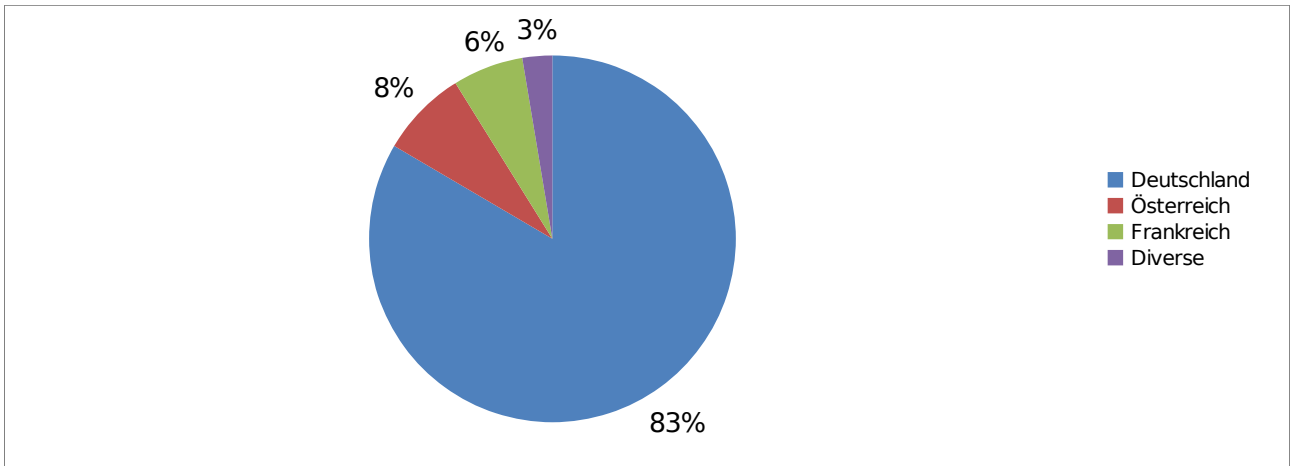
En 2009 la quantité totale de viande importée était de 88'348 tonnes, dont 43'506 t de volaille. Plus des détails concernant les chiffres d'importation sont présentés dans l' Annexe 1.

Les informations les plus importantes concernant les importations sont les pays d'origine, car c'est la distance entre le pays d'importation et la Suisse qui détermine le temps de stockage sous-vide des viandes. Par conséquent la probabilité d'observer le phénomène du « blown pack » sera plus élevé pour les viandes sous-vide provenant des pays les plus éloignés. Pour la volaille, le 37 % de la viande importée provient du Brésil. Pour la viande de bœuf la plupart (37.2 %) provient d'Allemagne et la partie qui provient des pays au-delà de l'océan (Brésil, Uruguay, Argentine, U.S.A) s'élève à 32,9 %. La viande de porc est principalement importée d'Allemagne (83,4 %) et seulement une petite partie (< 2,6 %) pourrait provenir de l'extérieur de l'Europe. La viande de mouton est beaucoup importée depuis l'Australie (46,8 %) et la Nouvelle-Zélande (39.4 %). Avec un total de 86.2 % de viande importée depuis des pays distant, la viande de mouton semble être la plus sujette à la problématique du « blown pack ». Par contre la consommation suisse de ce type de viande reste réduite et la quantité importée représente le 6.3 % de toute la viande importé en 2009.



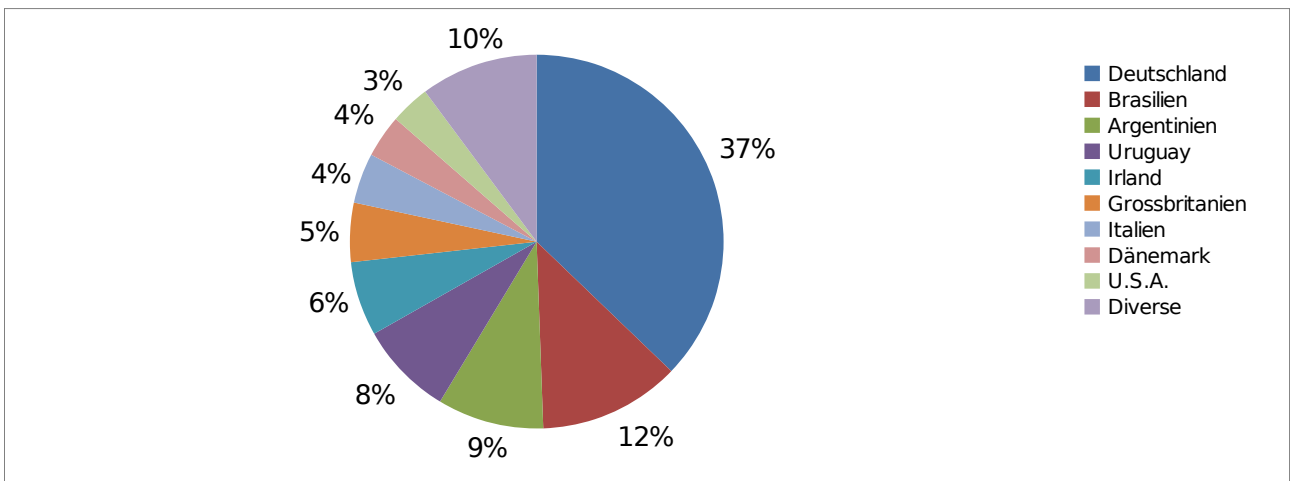
**Figure 4:** Importation de volaille en 2009.

[Source : Oberzolldirektion, Aussenhandelsstatistik, Bern]



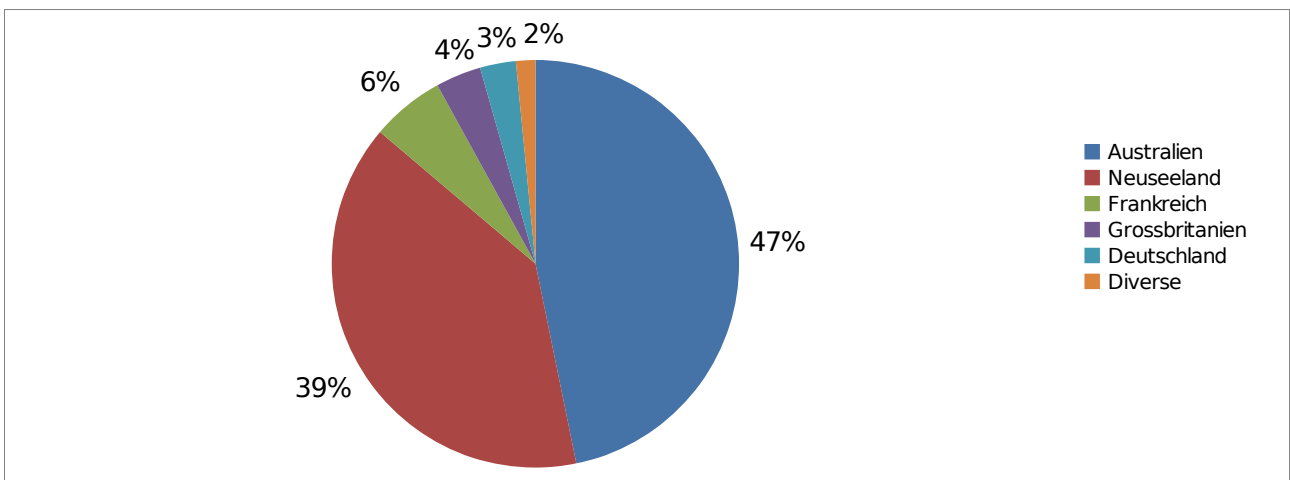
**Figure 5:** Importation de viande de porc en 2009.

[Source : Oberzolldirektion, Aussenhandelsstatistik, Bern]



**Figure 6:** Importation de viande de bœuf en 2009.

[Source : Oberzolldirektion, Aussenhandelsstatistik, Bern]



**Figure 7:** Importation de viande de mouton en 2009.

[Source : Oberzolldirektion, Aussenhandelsstatistik, Bern]

## 2.2 L'altération de la viande sous-vide

### 2.2.1 Conditions de stockage et qualité optimales

La technique d'emballage sous-vide a permis de prolonger notablement la période de conservation de la viande de bœuf (jusqu'à 10-12 semaines) et de mouton (jusqu'à 8-10 semaines). Avec la combinaison des films d'emballage à bas taux de transmission d'oxygène et des basses températures (en dessous de 0 °C), la viande de bœuf peut avoir une durée de conservation qui dépasse les 12 semaines. Si la viande sous-vide emballée est de bonne qualité, si elle se trouve dans des conditions de stockage optimales et si l'emballage n'a pas subi de perforations, la flore dominante de la viande, les bactéries lactiques, poussent très lentement. La production d'odeurs déplaisantes par ces organismes est presque inexistante. Des signes d'altération sont visibles seulement des semaines après avoir atteint la croissance maximale [12].

### 2.2.2 Conditions de stockage et qualité défectueuses

L'altération classique de la viande sous-vide est normalement due à une élévation de la température ou à un pH trop élevé. La conséquence est le développement des bactéries d'altération situées sur la viande, comme *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* et des enterobactéries psychrotrophes. La croissance de ces bactéries nécessite, comme mentionné, une élévation de la température (jusqu'à 5 – 10 °C environ) ou un pH supérieur à 6.0. Les caractéristiques d'une telle altération sont, entre autre, la formation d'odeurs de type sulfureux, due à la formation de H<sub>2</sub>S issu de la dégradation d'acide aminés contenant du soufre [13]. Le sulfure d'hydrogène est également responsable de la formation de sulfmyoglobine qui donne une coloration verte à la viande [14].

### 2.2.3 Altération par les clostridies

Dans le cas des altérations « blown pack » causées par les clostridies psychrophiles, l'interruption de la chaîne du froid ou l'élévation du pH n'en est pas à l'origine. Le facteur déterminant pour une altération des viande sous-vide par ces bactéries est le temps de stockage. Vu la lente croissance des microorganismes en question, plus long temps la viande reste sous-vide, plus la possibilité d'une altération augmente. Dans les dernières années l'amélioration des techniques d'emballage a permis de prolonger de plus en plus les temps de stockage des viandes sous-vide. Ceci donne alors plus de temps pour une éventuelle croissance des bactéries responsables du « blown pack ». Aussi les temps de transport plus longs, liés aux importations depuis des pays toujours plus distants, ont permis l'apparition de ce phénomène [2].

## Fermentation butyrique

La fermentation butyrique est une réaction typique du genre *Clostridium* et comporte la transformation de certaines molécules organiques principalement en acide butyrique, dioxyde de carbone et hydrogène. La fermentation butyrique peut se faire à partir des sucres, des protéines ou d'autres molécules comme l'acide lactique. Ce dernier cas se présente quelque fois dans les fromages, où la bactérie *C. tyrobutyricum* produit du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> à partir de l'acide lactique en gonflant les fromages.



**Réaction 1:** Fermentation butyrique à partir du glucose.

Source : [15]



**Réaction 2:** Fermentation butyrique à partir de l'acide lactique.

Source : [16]

Dans le cas du « blown pack » la formation d'acide butyrique est un signe caractéristique. L'odeur de ce composé est bien perceptible lors de l'ouverture des paquets de viande gonflés. *C. estertheticum* produit de l'acide butyrique soit à partir du glucose, soit à partir de l'acide lactique, mais le glucose est le substrat principal de la bactérie [17].

## 2.3 Caractéristiques de *C. estertheticum*, *C. gasigenes* et d' autres clostridies psychrophiles/psychrotrophes

### 2.3.1 Les termes psychrophiles et psychrotrophes

Les deux termes psychrophile et psychrotrophe sont souvent utilisés comme des synonymes, mais il y a de légères différences entre les deux. Par psychrophile on indique les organismes qui ont un optimum de température autour de 15 °C ou plus bas, une croissance maximale à une température de 20 °C et une croissance minimale à des températures de 0 °C ou moins.

Les organismes psychrotrophes sont similaires, mais ne répondent pas à tous les critères définis pour les psychrophiles. En effet les psychrotrophes sont capables de se développer à des températures supérieures à 20 °C et leur croissance à 5 °C est très lente. De manière générale, les bactéries psychrophiles ont une meilleure croissance à de basses températures, tandis que les psychrotrophes ont des optimums de température plus élevés, mais tolèrent le froid et sont même capables d'y croître [18].

### 2.3.2 Description des bactéries

Actuellement, d'autres bactéries avec des caractéristiques très similaires à *C. estertheticum* ont été identifiées. Dans une publication récente de 2009 la bactérie *C. estertheticum* sp. *laramiense* a été mentionnée [3]. Cette bactérie avait été identifiée en 2000 comme *C. laramiense* [19] ou *C. laramie* [5], mais a été renommé en *C. estertheticum* sp. *laramiense* en raison de sa similarité génétique avec *C. estertheticum* sp. *estertheticum* (ici nommé *C. estertheticum*) précédemment identifiée [20]. En plus, la littérature parle très souvent des organismes *C. estertheticum*-like (en anglais *C. estertheticum*-like organismes). Il s'agit d'organismes avec des caractéristiques similaires à *C. estertheticum*, dont la classification taxonomique n'as pas encore été clarifiée. Ces organismes ont été isolés en Nouvelle-Zélande sur du gibier sous-vide [8]. On les appel aussi « les souches locales de la viande » (en anglais local meat strains) et les souches K21 et K24 décrites dans un article de 2003 en font partie [21].

**Tableau 1:** Description de *C. estertheticum* et *C. gasigenes*.

	<i>C. estertheticum</i>	<i>C. gasigenes</i>
Spores	Ovales en position subterminale, quelque fois en position centrale ou terminale	Subterminales
Croissance optimale [°C]	12-15 ° 10-12 *§ 6-8 +	20-22 §
Description colonie	Circulaires, lisses et légèrement haussées. Couleur crème-blanc jusqu'à grise, semi-transparentes jusqu'à opaques \$	Grises/blanches jusqu'à grises, convexes, circulaires avec marge entière §
β-hémolyse	Non <sup>3</sup>	Oui

° Source : [2], \* Source : [4], § Source : [19], + Source : [8], \$ Source : [3]

3 La souche *C. estertheticum* sp. *laramiense* est β-hémolytique.



Il y beaucoup d'autres clostridies psychrophiles ou psychrotrophes qui ont été associées aux animaux d'abattage et aux viandes emballées sous-vide, mais pas toutes ne sont responsables de l'altération « blown pack » [4]. Pour certaines d'entre elles la relation avec le « blown pack » n'a pas encore été étudiée complètement. Le tableau 2 résume les températures de croissance de quelques clostridies psychrophiles, psychrotrophes.

**Tableau 2:** Températures de croissance minimale, optimale et maximale de quelques clostridies psychrophiles/psychrotrophes

	Température de croissance [°C]		
	Minimale	Optimale	Maximale
<i>C. estertheticum</i> sp. <i>estertheticum</i>		10-12 *+	15 *+
<i>C. estertheticum</i> sp. <i>laramiense</i>		15 *+	20 *+
<i>C. gasigenes</i>	-1.5 +	20-22 +	26 +
<i>C. fridicarnis</i>	3.8 *	30-38.5 *	40.5 *
<i>C. vincentii</i>		12 *+	20 *+
<i>C. fimetarium</i>		20-25 *+	30 *+
<i>C. putrefaciens</i>	lente à 5 °	15-22 *+	<37 *+
<i>C. algidicarnis</i>		25-30 *	37 *
<i>C. arcticum</i>		22-25 *	37 *

\* Source : [4], + Source : [19], ° Source : [22]

## 2.4 Détection de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* par PCR

### 2.4.1 Description de la PCR

L'analyse PCR (réaction de chaîne par polymérase) est une méthode biomoléculaire, par laquelle une séquence spécifique de l'ADN (acide désoxyribonucléique) isolé d'un microorganisme est recopié jusqu'à 100 milliard de fois en quelques heures [23]. L'isolation de l'ADN est faite par lyse des cellules d'intérêt. L'échantillon d'ADN isolé et purifié est ensuite mélangé avec le Mastermix. Le tableau suivant liste tout les composants du Mastermix ainsi que les fonctions de chaque composant.

**Tableau 3:** Composants du Mastermix et leur fonction.

Composant	Fonction
Eau-PCR	Utilisé pour arriver au volume final désiré.
Tampon-PCR	Permet de garder un pH entre 7-9, pH physiologique qui ne dénature pas l'ADN.
BSA	L'albumine sérique bovine, empêche l'adhérence de l'ADN à la paroi du tube de réaction. Ce composant n'est pas indispensable, mais il permet d'avoir un rendement majeur.
MgCl <sub>2</sub>	Les ions Mg <sup>++</sup> sont nécessaire au fonctionnement de la Taq polymérase.
dNTPs	Nucléotides triphosphates, sont les briques pour la construction du nouvel ADN.
Amorces	Elles sont complémentaires à une séquence d'ADN et servent comme point de partance pour la Taq polymérase. Il y a toujours une paire d'amorces, une pour chaque brin d'ADN et leur choix définit le gène qui est copié.
Taq ADN polymérase	L'enzyme responsable pour la synthèse du nouveau brin d'ADN.

Une fois que l'ADN et le Mastermix sont mélangés dans des tubes appropriés, le fragment d'ADN d'intérêt est recopié grâce à une séries de cycles, chaque cycle étant composé de trois étapes de durée et température spécifique : dénaturation, appariement, synthèse. En plus, il y a toujours une étape d'activation de la Taq polymérase et une étape finale de synthèse. Toutes ces étapes ont lieux dans une machine appropriée appelée thermocycleur. Une illustration de la méthode PCR est donné à l'Annexe 2.

A la fin de la PCR, les produits obtenus sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose, une technique qui sépare les fragments d'ADN en fonction de leur poids moléculaire. Le gel utilisé est un gel poreux, dont la grandeur des pores est déterminée par la quantité d'agarose (polymère à base d'agar-agar) ajouté. La partie supérieur du gel contient des petits puits pour insérer les produits de la PCR. Un fois ces puits remplis, un champ électrique est appliqué et les fragments d'ADN, chargés négativement, commencent à migrer. Les fragments plus petits se déplaceront plus rapidement que les gros. L'utilisation d'une échelle, contenant des fragments d'ADN avec une longueur connue permet d'estimer la grandeur des fragments obtenues sur le gel.

## 2.4.2 Le gène 16S rADN

Dans le cadre de l'identification bactérienne, il y a une zone de l'ADN génomique qui est couramment utilisée afin d'établir les degrés de parenté entre des souches. Il s'agit du gène 16S rADN qui codifie pour le 16S rARN, soit une chaîne de ARN (acide ribonucléique) nommé 16S qui fait partie de l'unité mineure des ribosomes bactériens. Les ribosomes sont des organes responsables de la production de protéines dans la cellule. Ils sont composés de protéines et de ARN et chaque ribosome est composé de deux sous-unités (50S et 30S).

Une grosse partie du gène 16S rADN contient des séquences nucléotidiques hautement conservées qui sont restées égales dans la plupart des espèces. Cependant, il y a aussi des zones qui sont caractéristiques à chaque souche bactérienne. L'isolation du gène 16S rADN par la méthode de la PCR est possible grâce à une paire d'amorces appelées universelles, qui peuvent être utilisées pour la presque totalité des bactéries, en raison de la haute conservation de la zone à laquelle les amorces sont appariées.

Une fois que le gène 16S rADN a été amplifié par PCR, il peut être digéré par des enzymes de restriction, qui coupent l'ADN à des endroits spécifiques. La mise sur gel d'agarose de l'ADN isolé digéré avec une ou plusieurs enzymes de restriction donnera lieu à des bandes de différentes tailles en fonction de la souche bactérienne utilisée. La comparaison de l'ensemble des bandes ainsi formées permet de regrouper les souches qui appartiendront à la même classe, famille ou espèce en fonction du degré de similitude.

Cette technique d'identification (nommé « Polymorphisme de longueur des fragments de restriction ») a été décrite dans une étude néozélandaise datant de 2000 dans le but de différencier les différents clostridies psychrophiles liés au phénomène du « blown pack » [24]. Dans ce travail cette technique n'a pas été utilisée, car le développement d'amorces spécifiques pour *C. estertheticum* et *C. gasigenes* a permis à la même équipe néozélandaise de développer en 2003 une méthode plus spécifique pour l'identification de ces deux bactéries, toujours en utilisant le gène 16S rADN [6].

## 2.4.3 Distinction entre *C. estertheticum* et organismes *C. estertheticum*-like

Comme déjà mentionné plus haut, les organismes *C. estertheticum*-like ont des caractéristiques très proches à *C. estertheticum* et leur habilité à gonfler les paquets de viande sous-vide a été montrée. L'analyse du gène 16S rADN s'est avérée une bonne méthode pour l'identification des espèces bactériennes. Par contre cette technique ne semble pas être assez précise pour la différenciation des sous-espèces [25]. Pour résoudre ce problème différents groupes de recherche se sont appuyés sur des autres régions du génome bactérien, les 16S-23S internal transcribed spacer (ITS). Il s'agit de zones qui se trouvent entre les gènes 16S et les gènes 23S, deux gènes qui codifient deux ARN faisant partie des ribosomes bactériens. Ces zones ne sont pas fonctionnelles, mais elles ont un très haut degré de variabilité entre les espèces.

Dans le cadre de la différenciation de *C. estertheticum* et les organismes *C. estertheticum*-like, une paire d'amorces complémentaire à la zone 16S-23S ITS est utilisée. Les souches-like de *C. estertheticum* sont dépourvues de ces fragments au contraire de la souche *C. estertheticum* de référence DSM 8809 [6]. Lors d'une analyse PCR et de la conséquente séparation par électrophorèse sur gel d'agarose, la présence ou l'absence d'une bande correspondant au fragment 16S-23S ITS détermine l'appartenance à l'une ou l'autre souche.

## 2.5 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Le principe de base de la spectrométrie de masse est la ionisation de composés organiques ou inorganique et la conséquente séparation de ces ions selon leur rapport masse sur charge  $m/z$  (en anglais mass-to-charge ratio) [26]. Deux particules avec la même  $m/z$  se déplacent à la même vitesse dans le vide si soumis au même champ électrique et les particules avec une masse plus petite se déplacent plus rapidement.

La spectrométrie de masse à désorption-ionisation laser assistée par matrice à temps de vol (MALDI-TOF), utilisée pendant ce travail, joint la technique d'ionisation douce MALDI (matrix assisted Laser Desorption/Ionisation) avec le spectromètre de masse TOF (time of flight mass spectrometer). La technique douce de ionisation MALDI est adapté à l'analyse des biopolymères, comme par exemple les protéines ou les peptides et se base sur l'utilisation de matrices capables d'ioniser les bio-molécules. En plus, la matrice protège les molécules de l'énergie du laser, étant capable de bien absorber les rayons UV.

Les matrices couramment utilisées sont l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique, l'acide sinapique, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque ou autres dérivés de l'acide benzoïque. L'utilisation de différentes matrices permet de couvrir un large spectre de produits. L'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique est normalement utilisé pour des protéines ou peptides plus petits que 10 kDa, tandis que l'acide sinapique plutôt pour les protéines plus grandes que 10 kDa. A côté des protéines / peptides, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque est aussi apte à l'analyse des carbohydrates ou oligosaccharides [27]. Toute ces molécules sont des aromatiques avec des électrons délocalisés. Un faisceau laser excite les molécules de la matrice en éparpillant les électrons qui vont ioniser les molécules de l'échantillon à analyser, typiquement des cellules issues d'une colonie. Une illustration du fonctionnement de la ionisation MALDI est donné dans l'Annexe 3.

Après l'ionisation, les molécules sont accélérées par un champ électrique de haute intensité dans une trajectoire de longueur connue. Les différents ions sont détectés après un temps de vol qui est proportionnel à leur masse. Pour chaque échantillon analysé un spectre des différentes masses est créé. Il forme une sorte d'empreinte digitale de l'organisme analysé. Un software d'identification compare le spectre obtenu avec une base de données et arrive à identifier le microorganisme en quelques minutes [28]. Pour identifier un organisme la présence de celui ci dans la base de donnée est indispensable.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est devenue une technique très utile lors de l'identification et la classification des microorganismes. Elle trouve aussi une large application dans le domaine du diagnostique clinique, dans la recherche environnementale et taxonomique, mais aussi dans le domaine de la qualité et des contrôles alimentaires [29].

## 3 Matériel et Méthodes

### 3.1 Matériel

#### Cultures de référence

- *C. estertheticum* DSM 8809,  
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne
- *C. gasigenes* DSM 12272,  
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne

#### Milieux

- Clostridien-Differential-Bouillon (DRCM), Merck 1.11699.0500, Lot : VM062099922, Darmstadt, Allemagne
- Columbia Agar + 5 % sheep blood (CBA), bioMérieux 43041, Lot : 840196901, Marcy l'Etoile, France
- Peptone yeast extract glucose starch (PYGS), contenant :
  - Peptone, BACTO™ Peptone, Difco 0118-17, Lot : 139232XA, Brunschwig, Suisse
  - Tryptone, Tryptic digest of casein, Biolife 4123402, Lot : 4123402, Milan, Italie
  - Extrait de levure, Yeast extract, Biolife 4122202, Lot : 76PC19, Milan, Italie
  - Extrait de viande (Beef extract powder, Biolife 411125, Lot : 3F2738, Milan, Italie
  - Glucose
  - Amidon soluble, Souble starch, Difco 0178-17-7
  - Resazurin, Fluka 83560, Buchs, Suisse
  - Cystéine, L-Cysteine, Fluka 30090, Lot : 407972/1, Buchs, Suisse
  - Solution saline A, contenant :
    - CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich 3107, Lot : 8319A
    - MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich
    - NaCl, Sigma-Aldrich 2315983, Lot : SZE81270, Steinheim, Allemagne
  - Solution saline B, contenant :
    - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, , Sigma-Aldrich 04248, Lot : 82730
    - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,
    - NaHCO<sub>3</sub>, Fluka 71630, Lot : 113932430705087

## Machines

- Autoclave, EGRO Quality
- Micro chromatographe en phase gazeuse, 490-GC, Varian
- Colonnes de chromatographie : CP-PoraPLOT U, Varian et Molsieve 5A, Varian
- Machine pour emballage sous-vide, VC999 Inaven Maschinen AG, Herisau, Suisse
- Stomacher, Stomacher® 400 Circulator, Seward, Angleterre
- Pour l'amplification par PCR, T3 Thermocycler, Biometra
- Bloc chauffant, TS-109 Thermoshaker, BIOSAN
- Générateur de tension, BioRad, Power Pac 3000, USA
- Incubateur, Müve cooled Incubator ES 120
- Spectromètre de masse, AXIMA Confidence, Shimadzu Biotech Corp., Kyoto, Japan
- Microscope Olympus, modèle BX40F-3, Japan
- Flux laminaire, ADS Laminaire, No série 9111, Pré-Saint-Gervais, France
- Flux laminaire, ADS Laminaire, No série 762, Pré-Saint-Gervais, France
- Appareil pour photos des gels d'électrophorèse, BioRad, Milan, Italie
- Centrifugeuse, Galaxy 14D, VWR™

## Matériel PCR

- Tubes Eppendorf, Axygen. Inc 311-04-05
- Micro pipettes 5-50 ml, 50-200 ml, 200-1000 ml, Biohit Proline
- Micro pipette 1-10 ml, Socorex
- Pointes pour micro pipettes, Axygen
- Kit d'extraction d'ADN, NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel 740 952.50, Lot : 1004/008, Dürren, Allemagne
- Lysozyme d'activité 24700 U/mg, BioChemia 9001-63-2, Lot : 6B002238
- Eau PCR, Ultra Pure distilled Water, ADNse end arnse free, GIBCO 10977-035, Lot : 404539
- Amorces : 16SEF/16SER, 16SDBF/16SDBR et EISRF/EISRR  
Tous les amorces utilisés proviennent de Microsynth, Balgach, Suisse
- Tampon PCR, 10x PCR Gold Buffer, Roche L00026-01, Lot : JP2807
- MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> Solution, Roche 58002032-01, HO1447
- Taq Polymérase, Ampli Taq Gold®, Roche L8112-01, Lot : KP9772
- Bromure d'éthidium, Sigma 1239-45-8, Lot : 117H8509, Steinheim, Allemagne
- Agarose, SEAKEM, Lot : 708194
- Echellé d'ADN, GeneRuler™, 100bp ADN ladder 0.5 µg/ml, Lot : 00037437, Fermentas

**Matériel pour culture en anaérobie**

- Boite anaérobie, Oxoid
- Anaerocult<sup>®</sup> A, Merck 1.13829.0009, Lot : 72491, Darmstadt, Allemagne
- Indicateurs, Anaerotest<sup>®</sup>, Merck 1.15112.0001, Lot : HC948568, Darmstadt, Allemagne

**Viandes**

- Viande de bœuf, Cher-Mignon SA, No 120061909110, Lot. : L4712
- Steak de cheval, Prodega, 0003495100 (2x)

**Autres**

Sacs Stomacher, BA6041/STR filter bags, Seward

## 3.2 Méthodes

### 3.2.1 Cultures bactériennes de référence

Les deux cultures de référence, reçus sous forme lyophilisée, ont été inoculées dans 20 ml de bouillon DRCM et incubées en anaérobie à 10 °C. Après une semaine 0.1 ml des deux suspensions bactériennes ont été ensemencées sur plaque CBA, pré-réduites dans une atmosphère anaérobie, et incubées à 10 °C pendant 21 jours pour le contrôle de pureté. Pour la mise sur plaque la méthode d'ensemencement en surface a été suivi [30].

En raison d'une suspicion d'une inhibition de la croissance de *C. estertheticum* dans la bouillon DRCM, après un mois d'incubation à 10 °C, 1 ml de la suspension bactérienne de *C. estertheticum* a été centrifugé à 8000 g pendant 5 minutes, le surnageant a été jeté et les cellules récoltées ont été ré-suspendues dans 9 ml de bouillon PYGS qui contenait par litre : 5 g de peptone, 5 g tryptone, 10 g d'extrait de levure, 10 g d'extrait de viande, 5 g de glucose, 1 g d'amidon soluble, 0.001 g de resazurin , 0.34 g de Cystéine , 40 ml de la solution saline A et 40 ml de la solution saline B. La solution saline A contenait par litre : 0.265 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.48 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0 g de NaCl. La solution saline B contenait par litre : 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.76 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10.0 g de  $\text{NaHCO}_3$ . La bouillon a été autoclavé à 121 °C pendant 15 min avant l'utilisation.

### 3.2.2 Analyse du gaz des viandes sous-vide gonflés

La composition du gaz contenu dans les paquets de viande gonflés a été déterminée par micro chromatographie en phase gazeuse avec argon comme gaz de transport et avec détecteur à conductivité thermique ( $\mu$ -TCD). Lors des analyses, deux colonnes de chromatographie différentes ont été utilisées pour couvrir un spectre plus large en molécules détectables. Le tableau suivant montre les paramètres d'analyse de la méthode utilisée pour chaque colonne.

**Tableau 4:** Paramètres de mesure des deux colonnes de chromatographie utilisées pour l'analyse de la composition du gaz des paquets de viande gonflés.

	Colonne	
	CP-PoraPLOT U	CP-Molsieve 5A
Température colonne [°C]	40	80
Température injecteur [°C]	45	85
Temps d'injection [msec]	100	100
Modalité de pression	statique	statique
Pression initiale [kPa]	80	180
Fréquence d'échantillonnage [ $\text{s}^{-1}$ ]	50	50
Temps de traitement [sec]	300	300

Pour aspirer le gaz dans le micro-GC, l'aiguille de la machine a été directement introduite dans les paquets de viande gonflés à l'aide d'un petit carré de scotch<sup>®</sup> double face.



Le résultat de chaque analyse est donné sous forme graphique et montre les pics correspondant à un type de molécule détectée. Chaque pic est caractérisé par le temps de rétention en secondes (axe des abscisses) et par un potentiel en mV (axe des ordonnées). Un tableau contenant le temps de rétention, la hauteur et l'aire du pique pour chaque composant accompagne l'illustration graphique.

La composition du gaz des paquets de viande gonflés a été calculée en comparant l'aire des pics obtenues pour chaque composant avec l'aire des pics du même composant obtenue pour un mélange de gaz à composition connue (Tableau 5). Une règle de trois a été appliquée.

**Tableau 5:** Composition du gaz de référence.

Composition	Quantité [%]
H <sub>2</sub> S	0.00981
O <sub>2</sub>	0.194
H <sub>2</sub>	1.013
N <sub>2</sub>	1.985
CH <sub>4</sub>	50.360
CO <sub>2</sub>	46.43819

Les résultats sont exprimés en pour-cent et représentent la moyenne de trois valeurs. La moyenne est accompagné d'un intervalle de confiance dans lequel se trouvent toutes les valeurs autour de la moyenne avec une probabilité de 95 %. Il se calcule en multipliant la déviation standard par le numéro de student, qui se trouve dans un tableau (Annexe 4) et dépend du degré de liberté (N-1) et du niveau de signification  $\alpha$  voulu (dans ce cas 5 %) [31]:

$$\text{Intervalle de confiance} = \frac{s}{\sqrt{N}} \cdot t_{\alpha, N-1}$$

$s$  = écart tipe

$N$  = numéro des mesures

$t$  = numéro de student

$\alpha$  = niveau de signification

$N - 1$  = degré de liberté

### 3.2.3 Microscopie

Les colonies qui ont poussé sur plaque CBA et les prélèvement des abattoirs enrichit ont été microscopie en phase de contraste afin de voire le degré de sporulation et la forme des bactéries.

### 3.2.4 Analyse des viandes sous-vide gonflés

En tout, trois paquets de viande gonflés emballés sous-vide ont été reçus et analysés : une viande de bœuf et deux steaks de cheval. Le tableau 6 montre les informations détaillées des viandes analysées.

**Tableau 6:** Informations sur les viandes emballés sous-vide gonflés qui ont été analysés.

Viande	Origine Viande	Date d'emballage	Reçu le
Bœuf	Belmont sur Yverdon	03.12.09	08.01.10
Cheval	USA	22.04.10	21.05.10
Cheval	USA	22.04.10	21.05.10

Après avoir fait l'analyse du gaz, chaque paquet a été ouvert de manière stérile et 1 ml de jus a été transféré dans un tube eppendorf pour l'extraction de l'ADN. Soit le jus pur, soit le jus dilué a été utilisé pour l'extraction de l'ADN. Pour la dilution du jus une série de dilution décimale a été appliquée (Annexe 5). Lorsque l'extraction n'a pas été faite tout de suite après le prélèvement du jus, celui-ci a été stocké à 4 °C en attendant l'analyse.

Après chaque ouverture des paquets de viande, les morceaux ont été remis dans un nouveau emballage sous-vide.

### 3.2.5 Prélèvements dans les abattoirs

#### Écouvillonnage

Les prélèvements ont été faits dans 4 abattoirs de la Suisse romande/alémanique et dans l'entreprise Cher-Mignon SA à Chermignon. Les prélèvements ont été fait par écouvillonnage dans les zones sales des abattoirs (peau des animaux, fèces, souillures dans les camion de transport) et dans les zones propres (carcasses, tables de désossage, etc.). Pour les prélèvements des peaux, des carcasses et surfaces de travail, une aire de 10 cm x 10 cm a été prélevée. Pour le prélèvement des fèces et des souillures la pointe de l'écouvillon a été trempée dans l'objectif désiré.

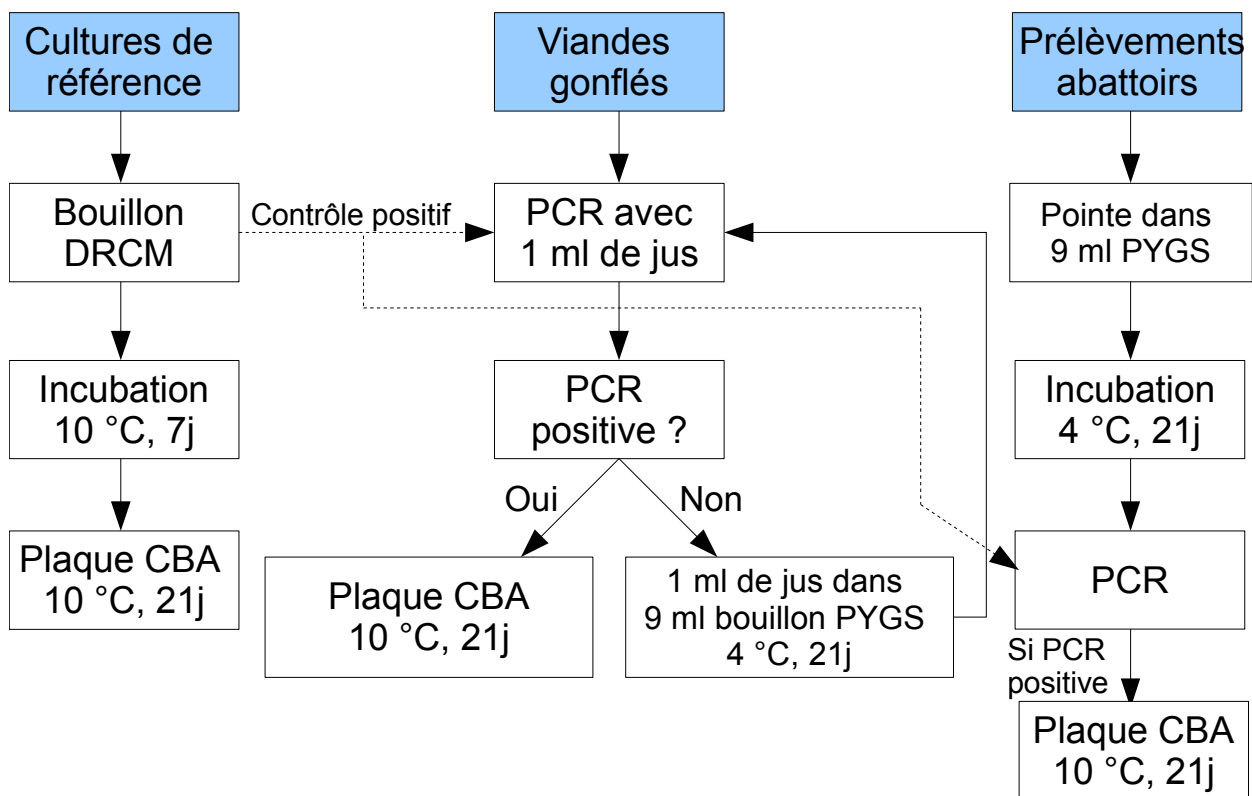
Les pointes de tous les écouvillons ont été coupées dans un tube en verre contenant 9 ml de bouillon PYGS. Les tubes ont ensuite été placés dans une boîte anaérobie, où une atmosphère anaérobie a été créée. Ils ont été incubés à 4 °C pendant 21 jours. La vérification de l'atmosphère anaérobie a été faite à l'aide d'un indicateur.

A la fin de la période d'incubation 1 ml de chaque tube a été transféré dans un tube eppendorf pour l'extraction de l'ADN. Si l'extraction n'a pas été faite tout de suite, la préparation a été stockée à 4 °C en attendant l'analyse.

### Prélèvement des morceaux

Selon la méthode destructive  $4 \times 5 \text{ cm}^2$ , pris dans 4 zones différentes, ont été prélevés de 5 carcasses de bœuf et 5 carcasses de mouton [32]. Les  $20 \text{ cm}^2$  de chaque carcasse ont été mélangés avec 9 parties d'eau physiologique (eau déminéralisée avec 0.85 % de NaCl et 0.1 % de peptone) dans un sac stomacher avec filtre et mélangés pendant 1 min dans un homogénéisateur stomacher. 1 ml du jus de chaque carcasse ainsi obtenue a été ensemencé dans 9 ml de bouillon PYGS et incubé en anaérobiose à  $4 \text{ °C}$  pendant 21 jours. A la fin de la période d'incubation 1 ml a été transféré dans un tube eppendorf pour l'extraction de l'ADN.

A partir d'une carcasse de bœuf, qui a été découpée à Cher-Mignon SA, 5 morceaux différents ont été coupés (entrecôte, araignée, jarret, tranche carré et couvercle). 10 g de chaque morceau ont été mélangés avec 9 parties d'eau physiologique. La même technique a été appliquée pour un morceau de terre présent sur une vache. La figure 8 résume toutes les manipulations faites avec les cultures de référence, les viandes et les prélèvements.



**Figure 8:** Travaux effectués avec les cultures de référence, les viandes et les prélèvements.

**Tableau 7:** *Abattoirs, lieux et méthodes de prélèvement des échantillons.*

<b>Abattoir</b>	<b>n°</b>	<b>Lieux de prélèvement</b>	<b>Méthode</b>
Cheseaux	1	Peau vache (5x)	Écouvillons
	2	Carcasse de mouton (4x)	Écouvillons
	3	Carcasse de mouton (5x)	Destructive
	4	Carcasses de vache (6x)	Écouvillons
	5	Carcasse de bœuf (5x)	Destructive
	6	Carcasses de bœuf (2x)	Écouvillons
	7	Couteau de coupe	Écouvillons
	8	Glissoire pour déchets	Écouvillons
Oensingen	9	Peau bœuf (3x)	Écouvillons
	10	Souillure camion transport (2x)	Écouvillons
	11	Morceau terre sur peau vache	Prélèvement 10 g
	12	Fèces vache	Écouvillons
	13	Sol de décharge	Écouvillons
	14	Carcasses de bœuf (4x)	Écouvillons
	15	Table de désossage	Écouvillons
SBA Schlachtbetrieb Basel AG	16	Peau cochons (3x)	Écouvillons
	17	Souillure étable (3x)	Écouvillons
	18	Crochet sale (2x)	Écouvillons
	19	Crochet nettoyé (2x)	Écouvillons
	20	Carcasses porc (3x)	Écouvillons
	21	Table de travail	Écouvillons
Marmy	22	Carcasses bœuf (4x)	Écouvillons
	23	Carcasses bœuf (2x)	Destructive
<b>Entreprise</b>	<b>n°</b>	<b>Lieux de prélèvement</b>	<b>Méthode</b>
Cher-Mignon SA	24	Carcasses de porc (2x)	Écouvillons
	25	Carcasse de bœuf (5x)	Prélèvement 10 g
	26	Table de travail sale (4x)	Écouvillons
	27	Table de travail nettoyé (5x)	Écouvillons

### 3.2.6 Extraction d'ADN

La même méthode d'extraction a été utilisée pour le jus de viande et pour les prélèvements des abattoirs enrichis. L'extraction de l'ADN génomique a été faite sous le flux laminaire en utilisant un kit d'extraction. Le protocole du fabricant pour l'isolation d'ADN génomique des bactéries gram positives a été suivi. Tous les échantillons ont subi une pré-incubation dans une solution de 20 mM Tris/HCl ; 2 mM EDTA ; 1% Triton X-100 ; pH 8 supplémenté avec 20 mg/ml de lysozyme d'activité 24700 U/mg à 37 °C pour 30 minutes. Après cette première incubation 25 µl de protéinase K ont été ajoutés à tous les échantillons et ils ont été incubés à 56 °C pendant 1 heure. Pour le contrôle positif de l'extraction 1 ml de chaque culture de référence a été utilisé et traité comme décrit ci-dessus. Pour le contrôle négatif la même chose a été faite avec 1 ml d'eau PCR.

L'ADN extrait a été stocké à -20 °C en attendant l'amplification par PCR.

### 3.2.7 Les amorces

Pour la détection de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* par PCR des amorces complémentaires aux zones variables V1 et V6 du gène 16S rARN ont été utilisées. Pour *C. estertheticum* DSM 8809 et les organismes *C. estertheticum*-like présents dans la viande, les amorces 16SEF et 16SER ont été utilisées. La séquence de ces amorces est : 16SEF (avant) 5'-TCG GAA TTT CAC TTT GAG-3' et 16SER (arrière) 5'-AAG GAC TTC ACT CAT CTC TG-3'. Ces amorces donnent des fragments PCR d'une longueur d'environ 790 pb (paire de bases).

Pour la détection de *C. gasigenes* DSM 12272, les amorces 16SDBF et 16SDBR ont été utilisées. La séquence de ces amorces est : 16DBF (avant) 5'-GAG AGG AGT TCT TCG GAA CGA-3' et 16DBR (arrière) 5'-AAG CSA CTT CCC CAA TTA C-3'. Ces amorces donnent des fragments PCR d'une longueur de environ 935 pb.

Un troisième paire d'amorces, EISRF et EISRR, a été utilisée pour différencier entre *C. estertheticum* DSM 8809 et les organismes *C. estertheticum*-like. Ces amorces sont complémentaires au 16S-23S rADN internal transcribed spacer, qui est présent dans *C. estertheticum* DSM 8809, mais absent dans les souches-like. La séquence de ces amorces est : EISRF (avant) 5'-GTA GAT GTA TTG ACT TCG G-3' et EISRR (arrière) 5'-ACC TAT AAC CAC TCT CGT-3'. Ces amorces donnent des fragments PCR d'une longueur d'environ 230 pb.

### 3.2.8 Amplification PCR

Pour l'amplification du gène 16S rADN et du fragment 16S-23S rADN, de l'ADN génomique a été utilisé comme modèle. Le mélange réactionnel de la PCR utilisé a été fait sous flux laminaire et contenait : 2.5 µl de Tampon PCR 10x, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de chaque désoxynucléoside triphosphate, 0.5 µM de chaque amorce, 2.5 U de Taq polymérase et 3 µl d'ADN extrait dans un volume total de 25 µl. Pour arriver au volume final de 25 µl de l'eau PCR a été employée. L'amplification a été réalisée par un thermocycleur avec toit chauffant. Après une dénaturation à 95 °C pendant 5 min, l'ADN a été amplifié en 40 cycles. Chaque cycle consistait d'une dénaturation à 92 °C pendant 30 sec, d'un appariement à 55 °C pendant 30 sec et d'une élongation à 72 °C pendant 1 min. L'élongation finale était à 72 °C pendant 3 min.

Un aliquot de 20  $\mu\text{l}$  de la réaction PCR a été mis sur un gel d'électrophorèse de 1.5 % (w/v), contenant 0.2  $\mu\text{g/ml}$  de bromure d'éthidium, pendant 1h 30 à un voltage de 90 V. Les bandes d'ADN sur le gel ont été visualisées sous un transilluminateur ultraviolet et une échelle a été utilisé pour déterminer la grandeur des bandes obtenues.

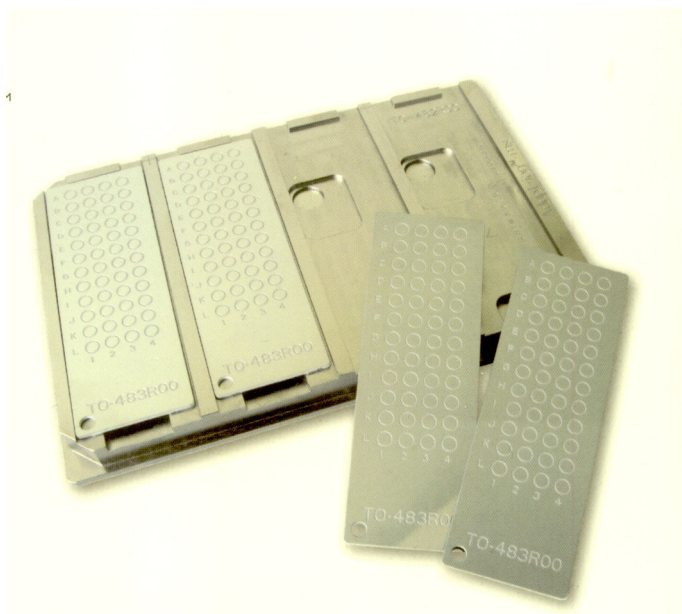
### 3.2.9 Vérification sur plaque

Chaque échantillon qui a donné un résultat PCR positif pour *C. estertheticum* ou/et de *C. gasigenes* a été mis sur plaque CBA, après avoir subi un traitement à l'éthanol pour éliminer tout la flore concurrentielle. 5 ml de chaque échantillon ont été mélangés avec 5 ml d'éthanol pur (entre 96 % - 100 %) et stockés à 4 °C pendant 1h. Après le temps d'incubation 0.1 ml de chaque mélange ont été mis sur plaque CBA, pré-réduites dans une atmosphère anaérobie, et incubés à 10 °C pendant 21 jours. Le traitement à l'éthanol et les plaques CBA pré-réduites n'ont pas été utilisés depuis le début, mais seulement après avoir observé la difficulté de croissance de la souche *C. estertheticum*.

### 3.2.10 Identification des colonies bactériennes par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'identification a été faite par un spectromètre de masse utilisant la technique de désorption-ionisation laser assistée par matrice à temps de vol. Pour la préparation des échantillons des colonies bactériennes sur plaque CBA ont été utilisées. De chaque colonie à analyser, une petite quantité de cellules a été transférée sur une coupelle MALDI (FlexiMass™) en métal conçu pour cet usage (Figure 9).

Une solution saturé, obtenue en dissolvant de l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique dans un mélange d'eau, éthanol et acétonitrile (1:1:1), 25 % d'acide formique et 3 % d'acide trifluoroacétique, a été utilisée comme matrice. Elle a été déposée en guise de goutte sur chaque spot de la coupelle.



**Figure 9:** Coupelle MALDI.

Les paramètres du spectromètre utilisés pour l'analyse sont décrits dans une publication de 2010 [33]. L'identification des colonies analysées a été faite en comparant le spectre obtenue à une base de données (SARAMIS™). Un dendrogramme (graphique qui illustre le degré de parenté entre les bactéries) peut être obtenu.

## 4 Résultats

### 4.1 Composition du gaz des paquets de viande gonflés

L'analyse de l'air ambiant donne une composition de l'air de  $50.40 \pm 0.93$  % d'azote et  $9.60 \pm 0.25$  % d'oxygène avec quelques traces de dioxyde de carbone et d'hydrogène (moyenne  $\pm$  intervalle de confiance à 95 %). Les chiffres obtenus ne sont pas correctes, car l'air contient 78.08 % d'azote, 20.95 % d'oxygène, 0.033 % de dioxyde de carbone et seulement 0.00005 % d'hydrogène [34]. En plus, la composition total n'arrive pas à 100 %.

Le gaz présent dans les deux paquets de viande de cheval gonflés est composé en moyenne de 50 % de dioxyde de carbone, de 1.5 % d'azote et d'hydrogène, de 0.035 % d'oxygène et 0.05 % de sulfure d'hydrogène. Vu l'inexactitude des chiffres obtenus pour la composition de l'air ambiant on ne peut pas être sûr de l'exactitude de la composition du gaz des paquets de viande. Comme pour l'air ambiant, la composition total n'arrive pas à 100 %.

On remarque une forte diminution d'oxygène et d'azote dans les paquets de viande en comparaison avec l'air ambiant, phénomène explicable par l'emballage sous-vide. Par contre le gaz des paquets de viande contient une grande quantité de dioxyde de carbone. L'hydrogène est présent en quantités supérieures en comparaison avec l'air ambiant.

**Tableau 8:** Composition du gaz des paquets de viande gonflés, comparés à l'air ambiant.

	Air ambiant [%]	Gaz des paquets gonflés [%]	
		Viande cheval 1	Viande cheval 2
Oxygène (O <sub>2</sub> )	$9.60 \pm 0.25$	$0.04 \pm 0.001$	$0.03 \pm 0.001$
Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> )	$0.06 \pm 0.20$	$53.16 \pm 0.088$	$47.99 \pm 0.385$
Azote (N <sub>2</sub> )	$50.40 \pm 0.93$	$1.49 \pm 0.002$	$1.32 \pm 0.013$
Hydrogène (H <sub>2</sub> )	0.003	$1.34 \pm 0.358$	$1.81 \pm 0.798$
Sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S)	-	$0.02 \pm 0.002$	$0.08 \pm 0.042$
<b>Total</b>	<b>60.06</b>	<b>56.05</b>	<b>51.23</b>

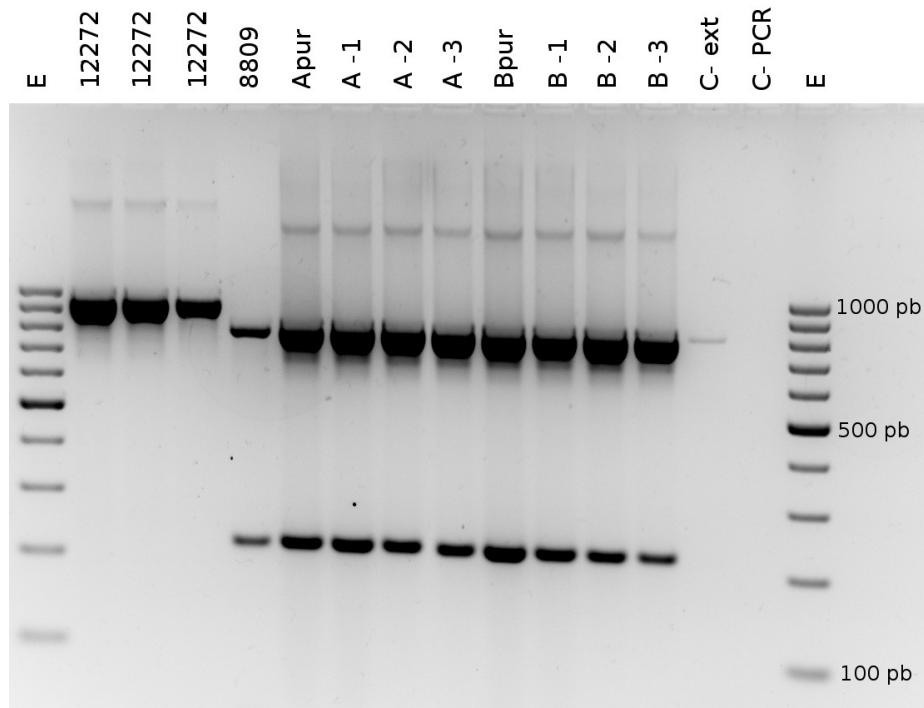
### 4.2 Détection de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* par PCR

#### 4.2.1 Paquets de viande gonflés

L'analyse PCR des deux viandes de cheval confirme la présence de *C. estertheticum*. Il s'agit de la même souche que la référence (DSM 8809). Les deux bandes de 790 pb et de 230 pb, caractéristiques de la souche *C. estertheticum*, sont bien visibles sur le gel d'agarose dans le cas où le jus a été utilisé non dilué (A<sub>pur</sub> et B<sub>pur</sub>) pour l'extraction d'ADN, mais aussi dans le cas où le jus a été dilué 10 (A-1 et B-1), 100 (A-2 et B-2) et 1000 (A-3, B-3) fois.

Selon l'analyse PCR la présence de *C. gasigenes* (DSM 12272) n'a pas été confirmée.

L'analyse PCR du contrôle négatif de l'extraction d'ADN (C-ext) montre une faible bande de dimension proche de 800 pb, mais une contamination des échantillons de viande par le contrôle positif (culture de référence DSM 8809) lors de l'extraction d'ADN peut être exclue, car les bandes sont beaucoup plus foncées pour les échantillons de viande que pour le contrôle positif (Figure 10). Le contrôle négatif de la PCR (C-PCR) résulte négatif. Les deux échelles (E) montrent des bandes qui vont de 100 pb jusqu'à 1000 pb.



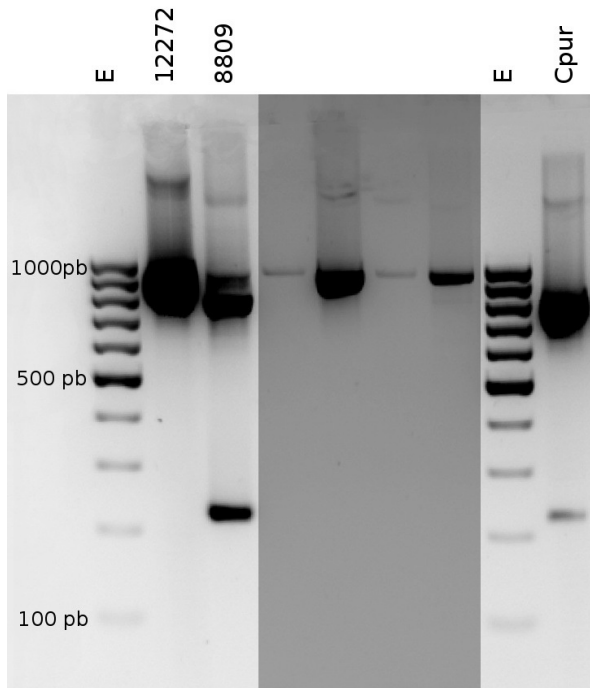
**Figure 10:** Analyse PCR des deux viandes de cheval issues d'emballages gonflés.

L'analyse de la viande de bœuf issu de l'emballage gonflé confirme la présence de *C. estertheticum*. L'analyse obtenue par l'extraction d'ADN du jus pur (Cpur) montre deux bandes de 790 pb et 230 pb et confirme la présence de la souche *C. estertheticum* de référence (DSM 8809) (Figure 11). L'analyse du même jus dilué 10 fois (C-1) montre seulement une bande de 790 pb (Figure 12).

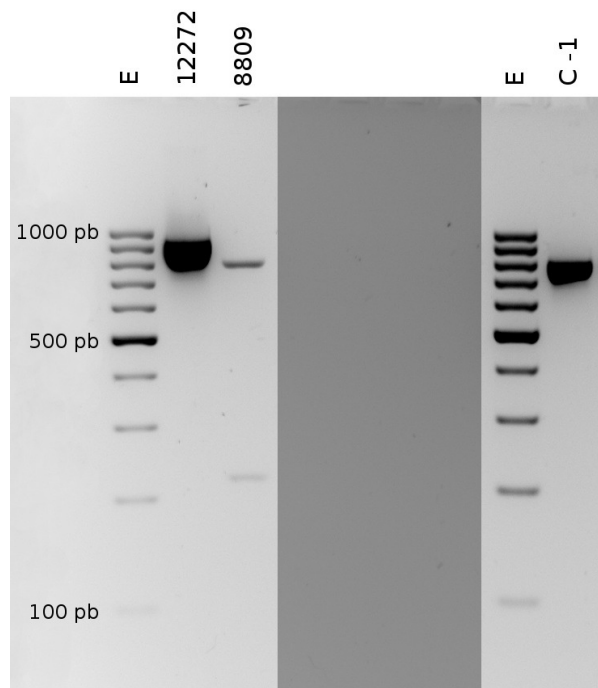
La migration de *C. estertheticum* DSM 8809 montre une troisième bande d'environ 900 pb, qui correspond à la longueur caractéristique de la bande de *C. gasigenes*. Une contamination lors de l'extraction d'ADN est la cause la plus probable.

Les contrôles négatifs de la PCR des deux extractions (jus pur et dilué) sont négatifs (résultats non communiqués). Le contrôle négatif de l'extraction du jus pur est positif pour *C. estertheticum* (une seule bande de 790 pb), mais une contamination de l'échantillon de viande par la souche de référence utilisée comme contrôle positif est à exclure, car la bande de ce dernier est moins foncée que celle de la viande. Le contrôle négatif de l'extraction du jus dilué est négatif (résultats non communiqués).



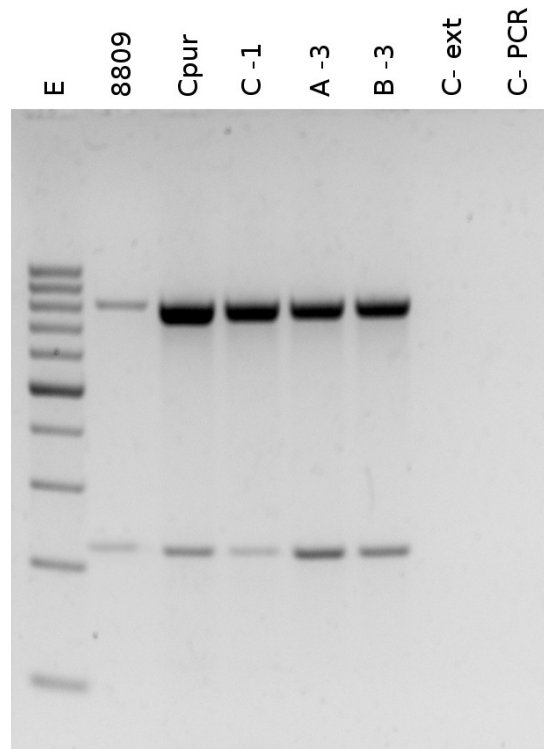


**Figure 11:** Analyse de la viande de bœuf issu d'un paquet gonflé.



**Figure 12:** Analyse PCR de la viande de bœuf issu d'un paquet gonflé.

Une deuxième analyse PCR des trois viandes issus d'emballages gonflés confirme les résultats obtenus lors de la première analyse (Figures 10, 11 et 12). Les trois viandes sont positives à la présence de *C. estertheticum*. Les contrôles de l'extraction et de la PCR sont négatifs (Figure 13).

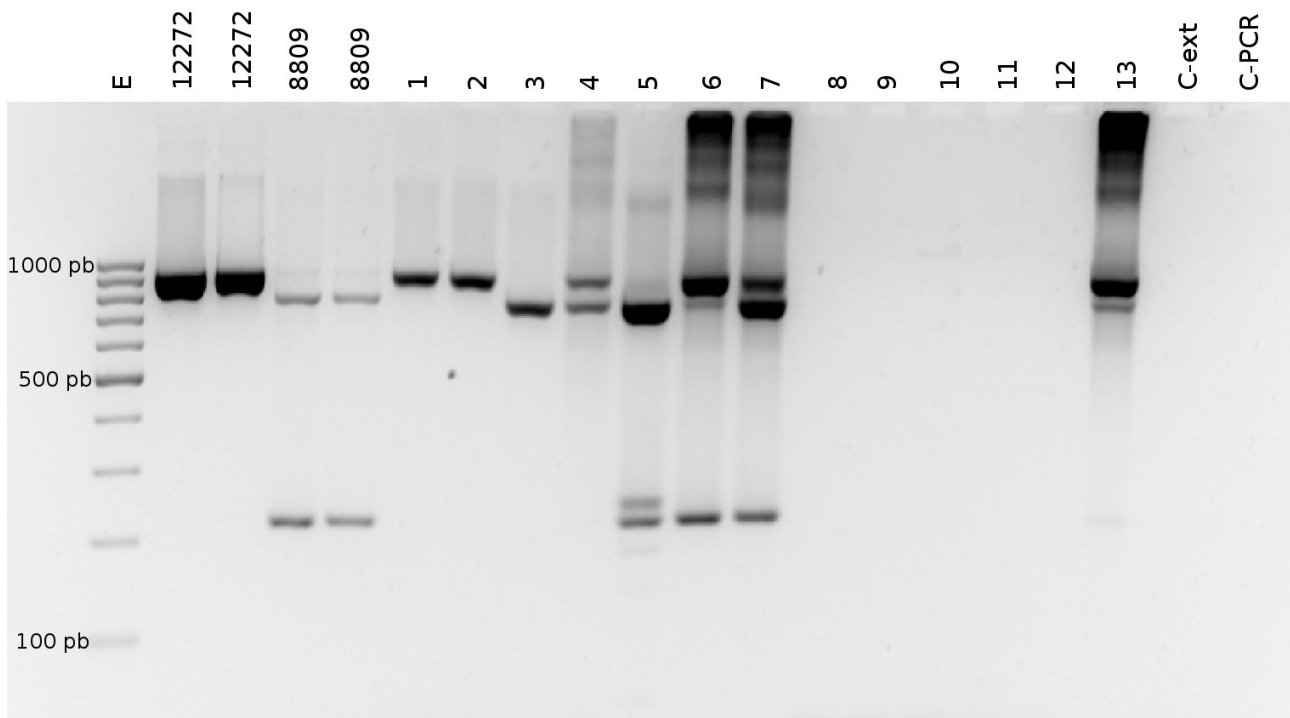


**Figure 13:** Analyse PCR de la viande de bœuf et des deux viandes de cheval.

#### 4.2.2 Prélèvements des abattoirs

La présence de *C. estertheticum* et de *C. gasigenes* a été confirmée dans différents endroits de la partie sale de l'abattoir d'Oensingen. Sur la peau des vaches vivantes se trouvent *C. gasigenes* (1 et 2) et *C. estertheticum*-like organismes (3). Les prélèvements des souillures dans le camion de transport se sont révélés positif à *C. gasigenes* et *C. estertheticum*-like organismes (4), les souillures sur le sol où les animaux sont déchargés sont positives à *C. gasigenes* et *C. estertheticum* (6 et 7). Aussi dans les fèces, la souche *C. estertheticum* de référence et probablement aussi les souches-like sont présentes (5) et une bande, qui n'appartient ni à *C. gasigenes*, ni à *C. estertheticum* est aussi visible dans cette colonne. Un morceau de terre présent sur la peau de l'un des animaux est positif *C. gasigenes* pour *C. gasigenes* et *C. estertheticum* (13). Il n'est pas possible de confirmer avec certitude de quelle souche de *C. estertheticum* il s'agit, car la bande de 230 pb, qui différencie *C. estertheticum* des organismes *C. estertheticum*-like, est très faible. Une contamination pourrait en être à l'origine.

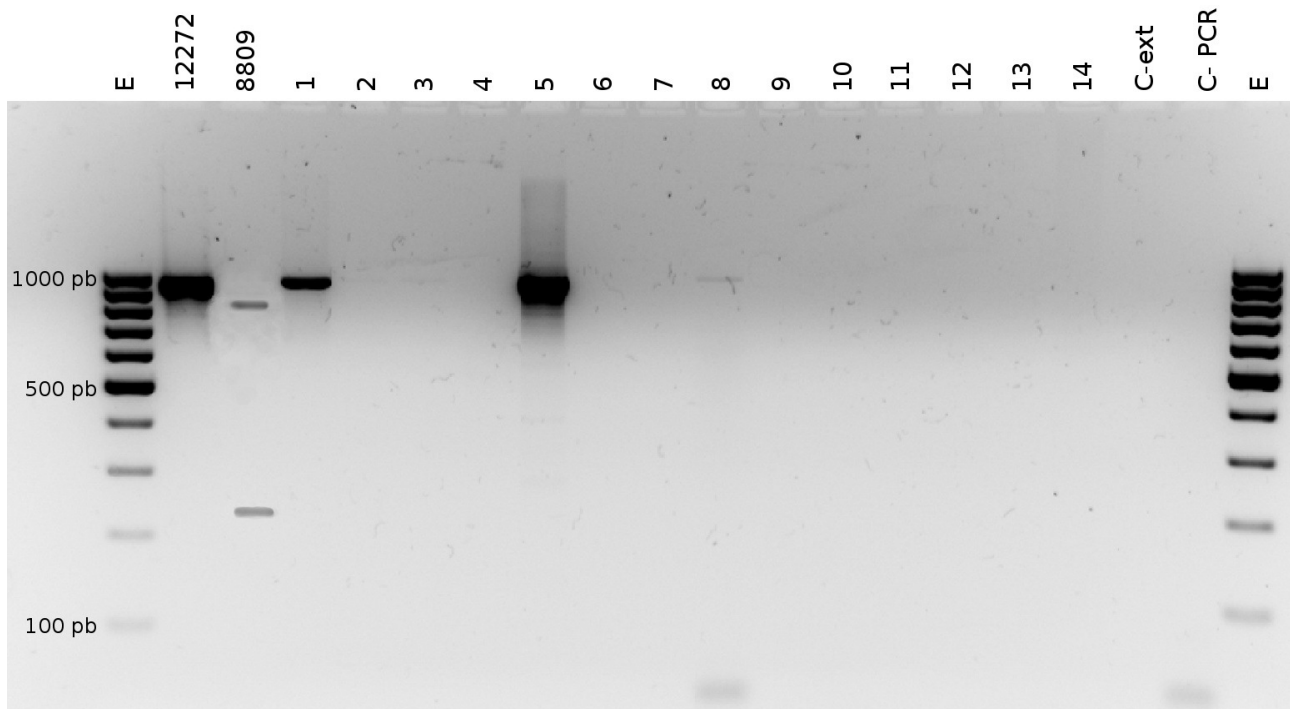
Pour ce qui concerne les prélèvements pris dans la partie propre de l'abattoir, sur les carcasses (8 - 11) et la table de désossage (12), les bactéries responsables du phénomène « blown pack » n'ont pas été trouvées (Figure 14).



**Figure 14:** Analyse PCR des prélèvements de l'abattoir d'Oensingen.

Dans les prélèvements de l'abattoir de Cheseaux seulement deux échantillons se sont révélés positifs aux bactéries recherchées. Un prélèvement de la peau d'une vache s'est montré positif à *C. gasigenes* (1). Le deuxième prélèvement positif, la peau d'une autre vache, est aussi positif à *C. gasigenes* (5). La présence d'une bande de 790 pb, donc d'organismes *C. estertheticum*-like, ne peut pas être exclue. Les prélèvements de la peau de vaches vivantes (2, 3, 4) n'ont pas donné des signaux positifs pour les bactéries recherchées.

Les prélèvements des carcasses de mouton (6 - 9) et des carcasses de bœuf (10 - 15) n'ont pas donné des signaux positifs pour *C. gasigenes* et *C. estertheticum* (Figure 15).



**Figure 15:** Analyse PCR des prélèvements de l'abattoir de Cheseaux.

Tous les prélèvements de l'abattoir de Bâle ont donné un résultats négatif pour la présence de *C. gasigenes* et *C. estertheticum* (résultats non communiqués). Également, tous les morceaux de viande prélevés par la méthode destructive depuis les abattoirs de Marmy et Cheseaux et les écouvillons pris dans l'entreprise Cher-Mignon SA, se sont relevés négatifs à la présence de ces deux bactéries. Un résumé des résultats PCR est présenté dans le tableau 9.

Tableau 9: Résumé de toutes les analyses PCR.

Abattoir	Lieux	Résultat analyse PCR				
		<i>C. gasigenes</i>	<i>C. estertheticum</i>	<i>C. estertheticum</i> -like		
Cheseaux	Peau vache (5x)	+	(2x)	-	(?)	
	Carcasse de mouton (4x)	-	-	-	-	
	Carcasse de mouton (5x)	-	-	-	-	
	Carcasses de vache (6x)	-	-	-	-	
	Carcasse de bœuf (5x)	-	-	-	-	
	Carcasses de bœuf (2x)	-	-	-	-	
	Couteau de coupe	-	-	-	-	
	Glissoire pour déchets	-	-	-	-	
Oensingen	Peau bœuf (3x)	+	(2x)	-	+	(1x)
	Souillure camion transport	+	-	-	+	-
	Morceau terre sur peau vache	+	-	-	+	-
	Fèces vache	-	-	+	-	-
	Sol de décharge	+	-	-	+	-
	Carcasses de bœuf (4x)	-	-	-	-	-
	Table de désossage	-	-	-	-	-
SBA Basel	Peau cochons (3x)	(?)	-	(?)	-	-
	Souillure étable (3x)	-	-	-	-	-
	Crochet sale (2x)	-	-	-	-	-
	Crochet nettoyé (2x)	-	-	-	-	-
	Carcasses de porc (3x)	-	-	-	-	-
	Table de travail	-	-	-	-	-
Marmy	Carcasses de bœuf (4x)	-	-	-	-	-
	Carcasses de bœuf (2x)	-	-	-	-	-
Cher-Mignon SA	Carcasses de porc (2x)	-	-	-	-	-
	Carcasse de bœuf (5x)	-	-	-	-	-
	Table de travail sale (4x)	-	-	-	-	-
	Table travail nettoyé (5x)	-	-	-	-	-

(?) : Présence pas certaine, + : présence, - : absence

### 4.3 Croissance de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* sur plaque CBA

La croissance de la culture de référence de *C. estertheticum* s'est montrée plus difficile que celle de *C. gasigenes*. Cette dernière pousse sans problèmes dans la bouillon DRCM et la croissance sur plaque CBA est possible soit sur milieu pré-réduit, soit sur milieu non pré-réduit. Pour *C. estertheticum* il n'y a pas eu de croissance sur plaque CBA jusqu'à que la souche de référence ait été transférée du bouillon DRCM au bouillon PYGS.

Pour ce qui concerne les viandes issus des paquets gonflés, une différence entre croissance sur plaque pré-réduite et non pré-réduite a été remarquée. En effet, un type de colonie a poussé seulement dans le cas des plaques pré-réduites. Toutes les colonies qui ont poussé sur les plaques non réduites ont poussé aussi sur celles pré-réduites. Sur les plaques des « viandes gonflés » aucune colonie avec phénotype similaire à *C. estertheticum* n'a poussé. Il y avait des colonies similaires à celles de *C. gasigenes*, mais l'analyse PCR, l'analyse par MALDI-TOF et la microscopie de ces colonies n'ont pas confirmé l'appartenance à la souche de *C. gasigenes*. Ce résultat est compréhensible, car la présence de cette bactérie n'a pas été confirmée par les analyses PCR des trois viandes issus des paquets gonflés.

Le traitement à l'éthanol des échantillons avant la mise sur plaque a été fait pour inactiver la flore concurrentielle et favoriser la croissance des spores de *C. estertheticum* présents sur les viandes. Aucune croissance n'a été observée sur ces plaques.

La mise sur plaque (pré-réduites et après traitement à l'éthanol) des prélèvements des abattoirs enrichis qui ont obtenus un résultat positif à la présence de *C. estertheticum* et/ou *C. gasigenes*, a montré une croissance. Par contre aucune des colonies ne présente une similitude avec les colonies de *C. estertheticum*. La caractéristique de presque toutes les colonies est un halo rose autour de la colonie, phénomène qui ne s'est jamais vérifié pour les viandes gonflées ou les autres échantillons. Quelques colonies ressemblent à celles de *C. gasigenes*, qui par contre ne présentent pas le halo rose.

**Tableau 10:** Description des colonies sur plaque CBA.

Description des échantillons	Description des colonies
Culture de référence DSM 8809 *°	Pas de croissance.
Culture de référence DSM 12272 *°	Colonies gris-blanches un peu opaques, diamètre de 1-4 mm, transparentes vers l'extérieur, convexes, bords légèrement ondulés, $\beta$ -hémolyse légère.
Viande de bœuf +°	Petites colonies blanches (1-2 mm), brillantes, bords lisses, convexes. Colonies gris-blanches (2-4 mm), légèrement transparentes et opaques. Colonies de 1-2 mm blanc-jaunes, brillantes et convexes, avec $\beta$ -hémolyse.
Prélèvements Cheseaux (n° 6, 7, 8) <sup>1</sup> +°	Petites colonies blanches avec $\beta$ -hémolyse (1-2 mm) ou gris-transparentes (sans hémolyse), convexes et brillantes, bords lisses.

Description des échantillons	Description des colonies
Viandes de cheval +°	Petites colonies blanches (1-2 mm), brillantes, bords lisses, convexes. Colonies gris-blanches, brillantes, légèrement transparentes (2-4 mm). Colonies de 1-2 mm blanc-jaunes, brillantes et convexes, avec $\beta$ -hémolyse.
Culture de référence DSM 8809 *§	Pas de croissance
Viandes de bœuf et de cheval +§	Petites colonies blanches (1-2 mm), brillantes, bords lisses, convexes. Colonies gris-blanches (2-4 mm), légèrement transparentes et opaques. Colonies de 1-2 mm blanc-jaunes, brillantes et convexes, avec $\beta$ -hémolyse. Petites colonies (1-2 mm) grises presque transparentes, brillantes, convexes, bord lisse, avec $\alpha$ -hémolyse.
Viande gonflé de bœuf £§	Pas de croissance.
Viandes gonflés de Cheval £§	Pas de croissance.
Culture de référence DSM 8809 ¢§	Petites colonies (~ 1 mm) blancs, brillantes, bords lisses, convexes.
Prélèvements Oensingen (n° 9, 2x) £§	Sur une plaque pas de croissance. Sur l'autre 2 colonies (4-5 mm) gris-blancs, transparents vers les bords, lisses et convexes, avec halo rose.
Prélèvements Oensingen (n° 10, 1x) £§	Petit colonies (1-2 mm) gris-blancs brillantes, bords légèrement ondulés, convexes, avec halo rose. Grandes colonies (3-4 mm) jaune-blancs, lisses, brillantes. Colonie blanc-transparent, lisse, avec $\beta$ -hémolyse.
Prélèvements Bâle (n° 16, 1x) £§	Pas de croissance.
Prélèvements Bâle (n° 17, 1x) £§	Petites colonies (1-2 mm) gris-blancs, légèrement opaques, convexes, bords lisses, avec halo rose.
Prélèvements Cheseaux (n° 1, 3x) £§	Sur 2 des 3 plaques pas de croissance. Sur 1 plaque une colonie convexe gris-blanc au centre et plus transparente autour du bord, qui est un peu ondulé.

1: Les numéros entre parenthèse font référence au tableau 7

\* : Cultures de référence dans bouillon DRCM

¢ : Cultures de référence dans bouillon PYGS

+ : Mise sur plaque sans aucun type de traitement de l'échantillon

£ : Mise sur plaque après traitement à l'éthanol des échantillons

° : Mise sur plaques pas pré-réduites

§ : Mise sur plaques pré-réduites

## 4.4 Identification des colonies bactériennes par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Comme le montre le dendrogramme (Figure 16) les colonies bactériennes cultivées sur plaque CBA à partir du jus des viandes et des prélèvements des abattoirs n'ont été identifiées avec aucune des deux cultures de référence *C. estertheticum* DSM 8809 et *C. gasigenes* DSM 12272. La comparaison du spectre issu des colonies de référence de *C. gasigenes* n'a rencontré aucune similarité avec la base des données. Cela était prévisible, vu l'absence de cette bactérie dans la base de données utilisée. Aucune autre colonie n'a montré un spectre similaire à celui de *C. gasigenes*. Dans le cas de *C. estertheticum* les colonies de références ayant poussé sur plaque CBA ont été identifiées avec *Pediococcus pentosaceus* au 88.4 %. Aucune autre colonie analysée n'a été identifiée avec cette bactérie, donc avec la prétendue colonie de référence *C. estertheticum*.

Parmi les colonies des viandes gonflées et des prélèvements, une colonie issue du camion de transport de l'abattoir d'Oensingen a été identifiée comme *Bacillus cereus* avec un pourcentage de 99.9 et 99 % (analyse à double). Deux colonies issues de la viande de bœuf ont été identifiées avec *Lactococcus lactis* avec un pourcentage de 99.9 % (analyse à double) et le genre *Lactococcus* avec un pourcentage de 87.2 et 84.1 % (analyse à double).

**Tableau 11:** Origine des colonies utilisées pour la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Nr.◇	Origine de la colonie	Nr.◇	Origine de la colonie
1, 2	Culture de référence DSM 12272 *°	19, 20	Viande gonflé de bœuf +°
3, 4	Prélèvement carcasse abattoir Cheseaux +°	21, 22	Viande gonflé de bœuf +°
5, 6	Prélèvement carcasse abattoir Cheseaux +°	23, 24	Culture de référence DSM 12272 ç§
7, 8	Prélèvement carcasse abattoir Cheseaux +°	25, 26	Prélèvement souillure camion de transport Oensingen £§
9, 10	Viande gonflé de bœuf +°	27, 28	Prélèvement peau vache Oensingen £§
11, 12	Viande gonflé de bœuf +°	29, 30	Viande gonflé de bœuf £§
13, 14	Viande gonflé de bœuf +°	31, 32	Viande de cheval gonflé £§
15, 16	Viande gonflé de bœuf +°	33, 34	Viande de cheval gonflé £§
17, 18	Viande gonflé de bœuf +°		

◇ : Les numéros font référence au dendrogramme

\* : Cultures de référence dans bouillon DRCM

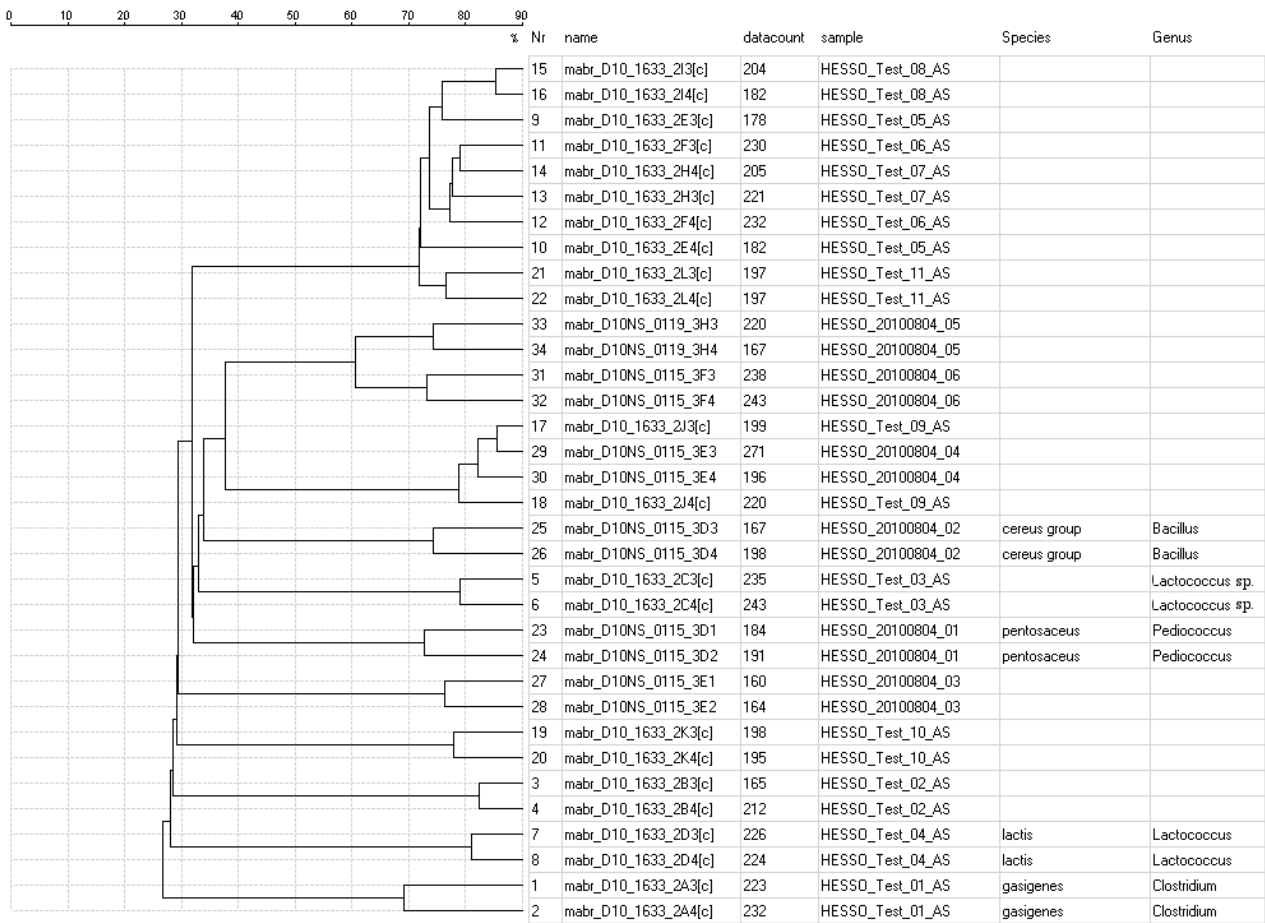
ç : Cultures de référence dans bouillon PYGS

+ : Mise sur plaque sans aucun type de traitement de l'échantillon

£ : Mise sur plaque après traitement à l'éthanol des échantillons

° : Mise sur plaques pas pré-réduites

§ : Mise sur plaques pré-réduites



**Filter:**  
 Error (%): 0,08  
 Absolute Intensity >= 0  
 Relative Intensity >= 0  
 Massrange from 2000 to 20000  
 Select Exclusion list:

**Figure 16:** Dendrogramme issu de l'analyse des colonies cultivées à partir du jus des viandes gonflés, des prélèvements des abattoirs et des cultures de référence.



## 4.5 Étude sur les cas de « blown pack » en Suisse

Le but de cette étude était d'analyser singulièrement les cas de « blown pack » apparus en Suisse ces dernières années afin de trouver des similitudes ou des détails communs. L'idée étant de pouvoir créer un lien entre les cas et, par conséquent trouver des explications plus concrètes pour le problème « blown pack » ainsi que des moyens pour l'éviter. Pour ce faire quatre sources en contact avec ce problème ont été questionnées : L'entreprise Cher-Mignon SA, une source confidentielle (source 2), le laboratoire indépendant « Swiss Quality Testing Services » (SQTS) et une coopérative d'importation (source 4). Les informations collectées étaient :

1. Le nombre des cas
2. La période de découverte de l'altération
3. La durée nécessaire après la mise sous-vide qui a été nécessaire à la découverte de l'altération
4. Le type de viande (animaux et partie)
5. L'origine de la viande

**Tableau 12:** Informations récoltées depuis quatre sources sur les cas de "blown pack" en Suisse.

		Source d'information			
		Cher-Mignon SA	Source 2	SQTS	Source 4
1	1 cas en 2010 2-3 cas en 2008		3 cas en 2010	Une douzaine dans les derniers années	1 cas en 2010
2	Janvier Octobre-novembre		Mai et juillet	Toutes les saisons	Mai
3	3 semaines après la mise sous-vide		-	-	-
4	Bœuf (surtout les parties nobles)		Cheval	Gibier, mouton, cheval	Bœuf
5	Suisse		Importé depuis U.S.A	Importé (Brésil, Asie, Australie, NZ, et autres)	Importé

Les informations sur les cas de « blown pack » en Suisse sont lacuneuses et peu précises, d'un côté par l'inexistence d'une traçabilité sur les viandes altérées et de l'autre sur l'impossibilité de certaines sources à révéler certaines informations.

De manière globale, dans l'année en cours 5 cas de viandes altérées par des clostridies psychrophiles sont connus. En plus, la plupart des cas sont liés à des produits importés. Dans ces cas, les viandes sont très rarement du bœuf, viande très peu importée en Suisse (chapitre 2.1.2). Sur la période de l'altération, il semble n'y avoir aucune tendance, dans toutes les saisons une altération « blown pack » est possible.

## 5 Discussion

### 5.1 Composition du gaz des paquets de viande gonflés

Selon un étude de 2009 sur 5 échantillons de viande gonflés la composition du gaz présent dans les paquets était de  $68.08 \pm 6.19$  % de  $\text{CO}_2$ ,  $26.17 \pm 3.19$  % de  $\text{H}_2$ ,  $4.18 \pm 3.64$  % de  $\text{N}_2$  et  $0.57 \pm 1.19$  % de  $\text{O}_2$  [2]. Un résultat similaire a aussi été obtenu lors d'une étude plus ancienne datant de 1989 [35]. Ces valeurs montrent une très forte augmentation de dioxyde de carbone et d'hydrogène par rapport à l'air ambiant.

Les chiffres obtenus pour les deux viandes de cheval ne correspondent pas tout à fait aux valeur des deux études mentionnées ci-dessus. En effet, avec une moyenne de 50 % pour le  $\text{CO}_2$  et de 1.5 % pour l'azote, le contenu de ces deux composants est notablement plus faible. La plus grosse différence concerne la quantité d'hydrogène, gaz retenu comme signe caractéristique de l'altération « blown pack ». Dans les paquets de viande de cheval, la quantité de  $\text{H}_2$  monte à seulement 1.34 % pour l'une et à 1.81 % pour l'autre. Ces valeurs sont vraiment basses en comparaison aux 26 % trouvés lors d'études précédentes. Dans ce cas ci, la quantité d'hydrogène dans les paquets ne serait donc pas caractéristique d'une altération « blown pack ».

Également l'analyse de l'air ambiant n'a pas donné la composition attendue, par conséquent, les résultats de la composition gazeuse des viandes est probablement aussi incorrecte. Cependant il est difficile d'identifier le type d'erreur qui s'est produit et d'estimer le marge d'erreur pour la composition gazeuse des paquets de viande.

Laissant à coté l'étrange valeur obtenue pour l'hydrogène, on remarque les mêmes tendances pour le dioxyde de carbone, l'azote et oxygène. La baisse d'oxygène et d'azote et la hausse du dioxyde de carbone ont été observé lors de ce travaux comme lors des études précédentes sus-mentionnés.

## 5.2 Détection de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* par PCR

### 5.2.1 Paquets de viande gonflés

Pour les échantillons de viande les bandes de 790 pb sont beaucoup plus larges que les bandes de 230 pb. Dans le cas de la culture de référence, la différence entre les deux bandes n'est, dans la plupart des cas, pas si marquée. Une possible explication est que la bande de 790 pb soit plus large à cause de la présence d'organismes *C. estertheticum*-like, qui donnent la même bande de 790 pb mais pas celle de 230 pb. Vu que la bande de 790 pb est toujours plus épais que celle de 230 pb pour les viandes, les échantillons de viande analysés contenait avec haut probabilité *C. estertheticum* et les souches *C. estertheticum*-like.

Comme pour les viandes de cheval, la viande de bœuf c'est avéré également positive à *C. estertheticum*. Par contre on ne peut pas dire à 100 % s'il s'agit de *C. estertheticum* ou des souches *C. estertheticum*-like. Dans un premier essai, l'analyse du jus non dilué montre les deux bandes caractéristiques de *C. estertheticum*, mais avec une dilution de 10 fois seulement la bande de 790 pb est visible (Figure 11 et 12). Vu la faiblesse de la bande 230 pb il est tout a fait possible qu'avec la dilution, la quantité de cellules de *C. estertheticum* n'était plus suffisante. Dans un deuxième essai d'analyse du jus de la viande de bœuf, le résultat est plus clair, car soit le jus pur, soit la dilution 10 fois, montrent les deux bandes caractéristiques de *C. estertheticum*.

### 5.2.2 Prélèvements des abattoirs

Les prélèvements dans l'abattoir d'Oensingen ont montrés que les deux bactéries responsables pour le « blown pack » se trouvent dans la partie sale de l'abattoir, dans la zone de décharge des animaux et sur leur peau (seulement les vaches ont été testées). On remarque une forte présence de *C. gasigenes*, les trois quarts des échantillons positifs aux clostridies psychrophiles sont positifs à *C. gasigenes* (Figure 14). Par contre cette bactérie n'as pas été détectée lors de l'analyse des trois échantillons de viande gonflés. Il pourrait s'agir d'un cas isolé, comme il pourrait y avoir une explication scientifique. La composition des deux bactéries pourrait être différente, surtout la surface, et de conséquence la capacité de s'accrocher sur l'une ou l'autre surface pourrait être privilégiée par l'une des bactéries. Dans le cas présent, on pourrait imaginer une adhérence réduite au tissu musculaire par *C. gasigenes* qui pourrait facilement être enlevée par frottement lors du découpage, ou en générale lors de l'élaboration des carcasses. Cette théorie pourrait être étudiée plus en détails afin de connaître les facteurs qui sont responsables de la persistance des spores des clostridies psychrophiles sur la viande. En les connaissant, des mesures de précaution pourrait être prises pour éviter ou diminuer l'accrochement des spores sur les carcasses. Pour confirmer la tendance observée, il faudrait prélever beaucoup plus d'échantillons des abattoirs et avoir beaucoup plus d'échantillons de viande gonflés, pour pouvoir exclure la coïncidence des résultats.

Les résultats obtenues avec les prélèvements d'Oensingen semblent confirmer la théorie selon laquelle la source principale de contamination est la peau des animaux. Pour mieux gérer les aspects hygiéniques lors de l'abattage une sélection des animaux en fonction du degré de saleté pourrait être fait. La séparation des animaux en classes allant de « propre » à « très sale » a d'ailleurs déjà été proposé en Irlande [36].

Dans la partie propre de l'abattoir d'Oensingen aucune trace des bactéries « blown pack » n'a été trouvée. Si des spores étaient présents sur les carcasses, ils le seraient en nombre beaucoup moindre que sur la peau des animaux vivants. C'est pour cela qu'un résultat négatif ne signifie pas que des spores ne se trouvent pas sur les carcasses, mais que simplement ils n'ont pas été répertoriés. Une autre possibilité serait que le temps utilisé pour l'enrichissement ne soit pas suffisant pour la reproduction d'une seule spore afin d'atteindre la seuil de détection pour la PCR. Un étude faite en Nouvelle-Zélande a montré que le seuil de détection pour *C. estertheticum* et *C. gasigenes* avec la méthode PCR pour les échantillons enrichit est de 10 cellules par ml [6]. Un autre étude fait sur les niveaux de contamination qui amènent à une altération de type « blown pack », a montré que avec une seule spore de *C. estertheticum*, inoculé dans une viande de bœuf de 200 cm<sup>2</sup> et stockée à -1.5 °C, le paquet commence à gonfler après 72 jours [37]. Il serait intéressant de connaître le nombre de cellules à partir duquel le phénomène « blown pack » commence à être visible.

Pour ce qui concerne les prélèvements dans l'abattoir de Cheseaux, seulement 2 échantillons sur 5 (peau des vaches vivantes) pris dans la partie sale de l'abattoir se sont révélés positifs aux bactéries recherchées. Les deux échantillons sont positifs à *C. gasigenes*. L'un des deux pourrait également être positif à *C. estertheticum* (Figure 15). Comme déjà mentionné, le résultat négatif des trois autres prélèvements ne signifie pas forcément l'absence des spores bactériennes des clostridies psychrophiles sur la peau de ces animaux. La peau des vaches est très souvent couverte de terre et de bourbe, surtout dans la partie postérieure. Il est imaginable que dans les régions sales de la peau, les spores soient plus nombreux par rapport aux parties propres. Ceci pourrait indiquer que la source des spores est effectivement la terre et le sol, et non pas la peau elle-même. Autrement dit, les spores ne feraient pas partie de la flore naturelle de la peau des vaches.

Aucun échantillon pris dans l'abattoir de Bâle n'a donné un résultat positif à l'une des deux clostridies, même pas ceux pris dans la partie sale de l'abattoir. La peau de trois cochons et le sol sale de l'écurie dans trois endroits différents ont été prélevés. En comparaison de la peau des vaches, celles des cochons de l'abattoir de Bâle était très propre. Aucune zone excessivement recouverte de terre n'était visible. La même conclusion décrite ci-dessus pour les vaches peut s'appliquer aux cochons. Les clostridies psychrophiles n'appartiennent pas à la flore naturelle de la peau, mais se trouvent dans la terre. La problématique du « blown pack » n'est presque pas apparue en relation avec la viande de porc et l'état de leur peau en pourrait être la cause. Une autre explication à la presque absence du phénomène « blown pack » avec la viande de porc est la différence de traitement lors de l'abattage. Premièrement la peau des cochons n'est pas enlevée comme pour les vaches. Deuxièmement, avant la découpe de la carcasse, le corps des porcs est flambé, procédure qui a comme but de brûler les poils présents sur la peau. Cette opération n'élimine pas seulement les poils, mais aussi la flore bactérienne présente. En fonction de la température atteinte, les spores bactériennes peuvent être réduites ou éliminées. Une troisième explication pour l'improbabilité d'une viande de porc altérée par des clostridies psychrophiles est le temps de stockage de la viande sous-vide. La viande de porc a besoin de temps de maturation plus courts par rapport à la viande de bœuf. Par conséquent, elle ne reste normalement pas stockée plus long temps que 3 semaines. Cette durée correspond au temps minimum à partir duquel le phénomène du « blown pack » commence à apparaître, en fonction de la température de stockage. Selon un étude de 2002, sur les changements de la viande de porc sous-vide, les premiers signes d'altération apparaissent après 35 jours environ [38].

Si l'absence de résultats positifs pour *C. estertheticum* et *C. gasigenes* sur la peau des cochons peut être expliquée par l'absence de terre et boue, les résultats négatifs des prélèvements des souillures du sol sont difficilement explicables. Comme déjà mentionné précédemment, les résultats négatifs n'indiquent pas forcément l'absence des clostridies psychrophiles dans la boue prélevée. Par contre, si on reprend les résultats de l'abattoir d'Oensingen, chaque prélèvement des souillures a donné un résultat positif et le numéro des prélèvement n'était pas supérieur aux prélèvements effectués à Bâle. Une grosse différence entre les deux abattoirs, était la présence des fèces de vache un peu partout sur le sol dans le cas d'Oensingen. La distinction entre souillure normale (terre, boue) et fèces n'était pas nette. Il est donc possible que tous les prélèvement des souillures à Oensingen étaient en réalité des mélanges avec les fèces. A Bâle ceci n'était pas le cas, l'écurie d'où les prélèvement ont été effectués, était assez propre par rapport à Oensingen et les souillures n'étaient clairement pas mélangés avec les fèces. Le vraie source de contamination pourrait donc être les fèces, et non pas la terre, les clostridies psychrophiles faisant partie de la flore intestinale des vaches. Cette affirmation est contraposée aux résultats d'un étude qui a montré la présence de *C. estertheticum* dans le sol [21].

Il se pourrait également que la différence de composition de la terre des différentes régions du pays ait une influence sur la présence des spores de *C. estertheticum* et *C. gasigenes*. Ceci pourrait expliquer l'absence de spores dans le cas de Bâle et la présence dans la cas d'Oensingen. Vu la résistance des spores à beaucoup des facteurs, cette explication est à vérifier.

## 5.3 Croissance de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* sur plaque CBA

### 5.3.1 *C. estertheticum*

La croissance de ce *Clostridium* s'est avéré difficile et a mis en évidence la sensibilité de la bactérie aux facteurs environnementaux. L'incapacité de croître sur les plaques CBA a premièrement été attribuée à l'absence de chambres anaérobies lors du transfert du bouillon au milieu solide. Les cellules végétatives sont sensibles à l'oxygène. Cela peut même être léthal. Les spores, par contre, résistent à l'exposition à l'oxygène, mais les bactéries ne sont pas capables de sporuler en présence de ce gaz [39]. Selon cette affirmation, une complète absence de spores dans la culture de référence, expliquerait l'absence de croissance sur plaque CBA. En effet l'analyse sous microscope de la culture de référence de *C. estertheticum* montrait très peu de spores. Selon une étude allemande de 2009, la mise sur plaque de *C. estertheticum* serait possible que à partir d'une suspension de spores et pas à partir de cellules végétatifs [8]. La problématique lié au transfert depuis le milieu liquide vers milieu solide a déjà été mentionnée dans la littérature et serait liée en générale aux clostridies psychrophiles [5][21]. Un article datant de 2005 sur l'adaptation des clostridies au stress oxydatif, affirme l'opposé, soit que l'oxygène n'aurait pas un effet léthal irréversible sur la croissance des clostridies [40]. Une complète absence de croissance serait, selon ce point de vue, pas tout à fait explicable, car l'oxygène ne tuerait pas les *Clostridium* anaérobies, donc une fois retourné à un environnement anaérobie, la croissance devrait être possible.

L'impossibilité de travailler sous des conditions strictement anaérobies n'a pas permis de remédier à ce problème. Par conséquent, d'autres solutions ont été testées. Selon le manuel Difco™ et BBL™ [41] l'emploi du Columbia blood agar + 5 % sang de mouton (CBA) se fait après une incubation à température ambiante durant 18-24 h en conditions anaérobies, afin de réduire le potentiel redox du milieu et favoriser la croissance des bactéries anaérobies.

Toutes les plaques ont donc été incubées en conditions anaérobies avant l'utilisation. Même avec cette précaution supplémentaire, aucune colonie de *C. estertheticum* était présente après 21 jours d'incubation. Bien que la présence d'un milieu avec bas potentiel redox soit nécessaire à la croissance de cette bactérie, un autre facteur inhibait sa croissance.

Selon un article de 2008 [42] la présence de bactéries lactiques pourrait inhiber la croissance d'un grand nombre de clostridies psychrophiles. Un groupe de substances parmi celles produites par ces bactéries, les bactériocines, a été identifié comme à l'origine de la non-croissance de *C. estertheticum* [43]. La capacité de retarder le gonflement des paquets de viande de bœuf sous-vide grâce à la présence de trois souches de *Lactobacillus sakei* a été démontrée dans une étude de 2009 [44]. Aussi dans un article plus vieux datant de 1979, la flore concurrentielle est inhibée grâce à la formation d'un agent antimicrobien produit par les lactobacilles [13]. Cette explication, ou de manière plus générale la présence de la flore concurrentielle, pourrait être plausible, vu le type d'échantillons utilisés. En effet, les bactéries lactiques font partie de la flore naturelle de la viande et elles peuvent aussi pousser sous conditions anaérobies. Un traitement à l'éthanol a donc été appliqué à tous les échantillons avant la mise sur plaque. Les résultats montrent une divergence par rapport à la théorie susmentionnée, car aucune colonie similaire à *C. estertheticum* n'a été trouvée sur l'une des plaques, ni sur celles des viandes, ni sur celles des prélèvements des abattoirs. Par contre il y avait des colonies. Il serait possible que d'autres spores psychrophiles, qui ont poussé plus rapidement que les spores de *C. estertheticum*, se trouvaient sur les viandes et sur les lieux des prélèvements. Leur croissance aurait ainsi inhibé la croissance de la bactérie en question. Une autre possibilité est que les spores prélevés dans les abattoirs n'étaient pas actives, donc plus capables de se reproduire. Ceci devrait vouloir dire qu'une quantité suffisante pour l'analyse PCR devait déjà être présente avant l'enrichissement, donc environ 1000 cellules par ml. Par contre, dans le cas des viandes, ceci est impossible, car la production de gaz qui a donné l'origine au « blown pack », est signe d'une croissance et par conséquent de la présence d'organismes vivants. L'absence de colonies sur les plaques issues du jus des viandes traité à l'éthanol pourrait donc être explicable soit par la présence d'autres spores qui ont inhibé la croissance de *C. estertheticum*, soit par la présence de bactéries végétatives seulement. Dans ce dernier cas, les plaques vides sont explicables, vu que les bactéries végétatives de *C. estertheticum* sont sensibles à l'éthanol comme chaque bactérie.

Si la présence et la croissance d'autres clostridies psychrophiles pourrait expliquer l'absence d'une croissance de *C. estertheticum* dans le cas des viandes et des prélèvements, ceci n'est pas valable dans le cas de la culture pure de référence DSM 8809. Après avoir exclu le potentiel redox et la flore concurrentielle comme cause de l'incapacité de croissance de *C. estertheticum* sur plaque CBA, l'attention a été dirigée vers le milieu DRCM utilisé pour resuspendre la culture de référence lyophilisée. Le sulfite de sodium présent dans le milieu DRCM est réduit par les clostridies en sulfure qui réagit avec le citrate de fer (aussi présent dans le milieu) pour former sulfure de fer [45]. Ce composé a une couleur noire et est utilisé comme indicateur pour les organismes réducteurs de sulfites, caractéristique propre à beaucoup de clostridies [22]. Hors, il s'avère que les sulfites sont des substances inhibitrices de la croissance de beaucoup de clostridies psychrophiles [5]. En général, l'action inhibitrice de certaines substances sélectives utilisées dans les milieux sélectifs a déjà été mentionnée lors d'une étude sur le développement des clostridies dans le fromage en 1985 [46]. En centrifugeant la suspension de référence, enlevant le milieu DRCM et en ré-suspendant les cellules dans du milieu PYGS, exempt de sulfites, la croissance sur plaque CBA s'est montrée positive. Malheureusement les colonies qui ont poussé n'ont pas été identifiées comme étant de *C. estertheticum* par la méthode MALDI-TOF. L'explication la plus probable pour l'absence de croissance sur plaque CBA reste donc la présence d'oxygène lors du transfert sur plaque depuis milieu liquide.

### 5.3.2 *C. gasigenes*

Cette bactérie à l'air d'être beaucoup moins sensible que *C. estertheticum*, en tout les cas en ce qui concerne la présence des sulfites, car ces substances n'inhibent pas sa croissance. Aussi la culture sur des plaques non pré-réduites ne semblent pas poser de difficultés à ce *Clostridium*. Cela pourrait sembler étrange, car la croissances de bactéries anaérobies exige normalement un potentiel redox réduit. L'idée d'une possible contamination a donc aussi été prise en compte, en raison des légères différences morphologiques entre les cellules cultivées et la description dans la littérature [3][19]. Selon celles-ci, les colonies sont circulaires avec un marge entière. Les colonies sur plaque CBA issues de la culture de référence avaient les bords légèrement ondulés. Il est a noter que dans l'une des deux études, l'isolation de *C. gasigenes* c'est faite sur CBA avec 5 % de sang de cheval et non pas de mouton comme dans ce travail. De plus, des plaques fraîchement préparées ont été utilisées, détail qui est mentionné aussi dans d'autres articles. Ceci n'était pas le cas pour cette étude. Il est possible que ces deux détails aient eu une influence sur la croissance de *C. gasigenes*, car l'aspect d'une même souche peut être différent si le milieu de croissance n'est pas le même [47]. La légère différence morphologique pourrait donc être expliquée par une différence entre les milieux utilisés et non pas par une contamination. La mise sur plaque de la culture de référence a été faite plusieurs fois et la morphologie des bactéries obtenues étaient toujours le même. S'il s'agissait vraiment d'une contamination, elle aurait pu survenir lors de la préparation de la culture de référence, donc lors de la dissolution des cellules lyophilisés dans le bouillon DRCM. Dans ce cas, la vérification n'est pas évidente.

Pour ce qui concerne les viandes, la présence de la bactérie n'a pas été confirmée par PCR, donc l'absence de colonies de *C. gasigenes* sur les plaques CBA était prévisible.

Dans les cas des prélèvements des abattoirs sa présence a été confirmée avec la méthode biomoléculaire. Néanmoins aucune des colonies retrouvées sur ces plaques ne correspondaient à celles de référence. Certaines colonies étaient assez similaires, mais par l'analyse de spectrométrie de masse l'identification de ces colonies avec *C. gasigenes* a pu être exclue (voire chapitre 5.4 ). Les possibles explications sont les mêmes que celles exprimées pour le cas de *C. estertheticum*. Les échantillons étant traités avec l'éthanol avant la mise sur plaque, il pourrait s'agir d'une autre bactérie sporulante qui en croissant plus vite pourrait inhiber la croissance de *C. gasigenes*. Une deuxième hypothèse serait que les bactéries présentes n'étaient plus actives, raison pour laquelle la PCR a montré un résultat positif, mais aucune colonie c'est formée sur plaque. Pour vérifier cette théorie une analyse PCR aurait du être faite aussi avant l'enrichissement, pour vérifier la présence d'un nombre de cellules (pas vivantes dans ce cas) assez élevé.

## 5.4 Identifications des colonies bactériennes par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les analyses effectuées par la spectrométrie de masse ont confirmé les résultats obtenus par l'observation des colonies sur plaque CBA. La morphologie d'aucune colonie n'était similaire aux deux souches de référence *C. estertheticum* et *C. gasigenes*. La comparaison des spectres n'a pas identifié de colonies comme appartenant aux souches de référence.

L'identification de la colonie de référence *C. estertheticum* avec *Pediococcus pentosaceus* indique une probable contamination des plaques CBA. Pour affirmer avec certitude une bonne identification, la correspondance entre les spectres d'une colonie analysée et une bactérie présente dans la base de données, devrait se trouver en dessus de 90 %. Dans le cas présent la colonie supposé être *C. estertheticum* a été identifiée comme *Pediococcus pentosaceus* seulement à 88.4 %. Néanmoins, selon l'expérience de l'entreprise Mabritec AG qui a effectué les analyses, cette identification n'est pas sans équivoque, mais très sûre. De plus, l'entreprise affirme que la probabilité qu'il s'agisse d'une bactérie du genre *Clostridium* est très faible, donc la probabilité qu'il s'agisse de *C. estertheticum* l'est encore plus. Vu la difficulté à cultiver cette bactérie, comme décrit dans le chapitre précédent, ceci pourrait bien être possible. Le *Pediococcus pentosaceus* fait partie de la famille des Lactobacillaceae qui se trouve dans une série de produits fermentés comme le produits laitiers ou les produits à base de poisson ou de viande [48]. Une autre point qui pourrait jouer en faveur de la théorie d'une contamination est l'aspect des présumées colonies de *C. estertheticum*. En effet la description morphologique de la bactérie dans une publication de 2009 [3] ne coïncide pas à 100 % avec celle observée, surtout en ce qui concerne le bord et la couleur (Tableau 10). Pour avoir une plus grande certitude il faudrait faire des études biochimiques ou utiliser des techniques bio-moléculaires.

Aussi *C. gasigenes* n'as pas été retrouvée sur les plaques CBA par l'analyse de spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le fait que la colonie de référence n'ait pas pu être identifiée, montre que la bactérie n'était pas présente dans la base de données comme précédemment annoncé par l'entreprise Mabritec AG. Comme pour *C. estertheticum*, l'analyse par spectrométrie confirme les observations faites pour la croissance sur plaque CBA. Cependant, certaines colonies ressemblaient à *C. gasigenes* sur les plaques issues des prélèvement des abattoirs qui se sont montrés positifs à cette bactérie lors de l'analyse PCR. La spectrométrie MALDI-TOF a par contre enlevé les doutes, car ces types de bactéries n'avaient aucune similitude avec la culture de référence.



## 5.5 Étude sur les cas de « blown pack » en Suisse

Selon l'expérience de l'entreprise Cher-Mignon SA, l'altération des viandes de bœuf sous-vide se manifeste surtout sur les parties de viandes plus nobles. Ce phénomène a été remarqué aussi par un groupe de recherche allemand [49]. La manifestations du « blown pack » sur ces parties de viande de bœuf peut être expliquée par la plus longue maturation de ces parties [2]. Les cas qui se sont présentés en Suisse avec la viande de production interne sont apparus, pour le moment, uniquement sur la viande de bœuf. Les autres types de viande de production interne, qui nécessitent une maturation plus courte, n'ont pas montré des cas de « blown pack » jusqu'à présent. Comme le montre le tableau 12, la majorité des cas connus en Suisse sont liés à l'importation depuis des pays distants comme le Brésil, l'Australie et la Nouvelle-Zélande. Cette théorie a été avancée dans plusieurs publications [2][49].

En ce qui concerne la période de découverte des paquets de viande altérés, aucun logique ne semble régner. Cher-Mignon SA a eu des cas pendant la période de la chasse en octobre-novembre et un en janvier. Si on considère que l'emballage sous-vide a été fait 2 à 4 semaines avant, l'abattage de l'animal a du être fait dans les mois de septembre-octobre et décembre respectivement [50]. Dans le cas où l'altération est apparue en mai, l'abattage a du être fait en avril-mai et dans le cas de juillet l'abattage a du être fait autour de juin.

Dans une étude sur la présence de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* dans différents abattoirs irlandais, faite sur une année entière, il a été montré que dans le mois de mai un pourcentage plus élevé de prélèvements ont réagit positivement à ces deux bactérie lors d'une analyse PCR [3]. Selon cette affirmation les carcasses abattues en mai devraient avoir une probabilité plus haute d'être contaminées par les spores bactériennes des clostridies psychrophiles et par conséquent de subir un altération du type « blown pack ». Si on considère le temps de stockage de 2-4 semaines après la mise sous-vide les altérations les plus fréquentes devraient apparaître au courant des mois de mai-juin. Le résultat obtenu par l'étude irlandaise indique seulement une présence majeure de ces organismes dans le mois de mai, mais pas leur absence dans les autres mois. La possibilité d'avoir un échantillon de viande gonflé est donc possible dans n'importe quel mois, comme le montre l'enquête faite lors de ce travail. Pour pouvoir affirmer avec certitude que la plupart des cas « blown pack » apparaissent en mai-juin, beaucoup plus des cas devraient être connus. Néanmoins, l'information donnée par l'étude irlandaise a son importance, car avec une telle information, on peut agir de manière telle a prêter une précaution particulière dans la période de l'année la plus sensible. Il serait également intéressant de conduire un étude similaire dans d'autres pays afin de vérifier si les résultats sont reproductibles partout dans le monde.

Concernant le nombre de cas, les informations sont peu précises. Avec sureté on peut dire que depuis le début de l'année 2010, déjà 5 cas sont connus en Suisse, 1 cas issu de viande Suisse (bœuf) et 4 cas issus de viandes importées (cheval et bœuf). Ce phénomène ne semble donc pas être sporadique, comme initialement pensé. Si ce problème prenait plus d'ampleur, les conséquences économiques seraient encore plus sévères. Selon Cher-Mignon SA, déjà avec 1 ou 2 cas de « blown pack », l'économie d'une entreprise peut souffrir, surtout parce que bien souvent il s'agit de gros morceaux de viande noble qui vont monter à plus de 500 Fr. Aussi selon un article d'Irlande la perte estimée d'un cas de « blown pack » peut monter à 375 €, soit 506 Fr (taux de change de 1.35). De plus, si ce phénomène arrive chez le client, il y a une perte de confiance vers l'entreprise.

## 6 Conclusions et perspectives

Lors de ce travail la méthode bio-moléculaire de la PCR a été testée sur des échantillons de viande de bœuf et de cheval gonflés en utilisant des amorces spécifiques pour deux bactéries responsables du « blown pack » *C. estertheticum* et *C. gasigenes*. La méthode s'est avérée bien adaptée à l'analyse des viandes altérées, car la présence de *C. estertheticum* a été montrée aussi bien pour les échantillons issus du jus de viande pur que pour les échantillons de jus dilué. Aussi les deux cultures de référence utilisées pour le contrôle positif de la PCR ont pu être identifiées par cette méthode. Une rapide identification et confirmation des cas de « blown pack » est donc possible si les amorces appropriées sont utilisées.

Les prélèvements dans différents abattoirs ont montrés que les spores de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* s'y trouvent dans la partie sale, c'est à dire sur la peau des vaches, dans les fèces des vaches et dans les souillures présentes dans les camions de transport. Par contre, aucun prélèvement de la partie propre n'a donné de résultats positifs pour ces deux bactéries. La théorie avancée par plusieurs sources, qui attribue à la peau des animaux la majeure source de contamination, a été confirmée lors de cette étude. Encore une fois, la méthode de la PCR utilisée pour l'analyse des prélèvements dans les abattoirs s'est montrée efficace.

L'isolation des colonies de *C. estertheticum* et *C. gasigenes* n'a pas fourni de résultats satisfaisants, surtout en ce qui concerne la croissance de la culture de référence de *C. estertheticum*. Des chambres pour les manipulations en conditions anaérobies ainsi que des appareils pour la préparation des milieux nutritifs en absence d'oxygène semblent être la clé pour une bonne réussite de l'isolation de cette bactérie anaérobie.

Concernant la méthode utilisée pour l'analyse du gaz présent dans les paquets de viande gonflés, elle doit être revue. En effet, elle n'était pas spécifique pour ce type d'analyse et l'exactitude des résultats obtenus est insuffisante. Une méthode pour l'analyse des échantillons gonflés a été développée par la station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux, mais n'a pas encore rendue publique. Pour ce travail, il n'a pas été possible de s'appuyer sur une méthode connue et adaptée. En plus l'analyse des acides organiques volatiles aurait également du être faite, car la formation d'acide butyrique est caractéristique de l'altération « blown pack ». Pour des raisons de disponibilité cette analyse n'a pas pu être faite.

La technique d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF n'a pas vraiment pu être appliquée. D'une part à cause de l'absence de croissance de *C. estertheticum* sur plaque et d'autre part en raison de l'absence de croissance de *C. gasigenes* sur les plaques issues des prélèvements des abattoirs qui ont donné un résultat positif lors de l'analyse PCR. L'utilisation de cette technique ne semble pas être de grande aide lors de la problématique des paquets de viande gonflés. En effet cette technique exige d'avoir des colonies, donc d'utiliser les techniques d'isolation classiques de microbiologie, très longues et difficiles pour les clostridies psychrophiles, raison pour laquelle une méthode de détection bio-moléculaire a été développée. Par contre le MALDI-TOF pourrait être utile lors de la distinction de souches bactériennes très proches, par exemple les souches *C. estertheticum*-like, qui sont indistinguables sous le microscope.

Une étude sur différents cas de « blown pack » apparus en Suisse n'a pas permis de trouver des similitudes et des répétitions. Ce type d'altération peut apparaître tout au long de l'année sur différents types de viande emballés sous-vide, rouge ou blanche, cru ou cuite. Le seul facteur en commun semble être une longue période de stockage, soit du aux longs temps d'importations, soit du aux plus longs temps de maturation des morceaux nobles de la viande de bœuf.

## 7 Bibliographie

- [1] Berger K. R., reviewed by Welt B., A brief history of packaging, University of Florida, Institut of Food and Agricultural Sciences, ABE31, (2002), 4-5
- [2] Hadorn R., Schlüchter S., Collomb M., Badertscher R., Hummerjohann J., Gas formation in vacuum-packed beef - a new - old phenomenon?, International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen, Denmark, (2009), 16-21 August
- [3] Moschonas G., Bolton D. J., Sheridan J. J., McDoewll D. A., Isolation and sources of "blown pack" spoilage clostridia in beef abattoirs, *Journal of Applied Microbiology*, 107, (2009), 616-624
- [4] Broda D. M., Lawson P. A., Bell R. G., Musgrave D. R., *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with "blown pack" spoilage of vacuum-packed meats, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, (1999), 1539-1550
- [5] Broda D. M., De Lacy K. M., Bell R. G., Influence of culture media on the recovery of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of vacuum-packed chilled meats, *International Journal of Food Microbiology*, 39, (1998), 69-78
- [6] Broda D. M., Boerema J. A., Bell R.G., PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing "blown pack" spoilage of vacuum-packed chilled meats, *Journal of Applied Microbiology*, 94, (2003), 515-522
- [7] Ingham S. C., Hassler J. R., Tsai Ya-Wen, Ingham B. H., Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolated from milk , *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 43, No. 3, (1998), 173-183
- [8] Ziegler E., Untersuchung zum Nachweis und zum Vorkommen von *Clostridium estertheticum* in Vakuumverpacktem Rindfleisch, Inaugurale-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 2009
- [9] Lesetipp: Schweizer Fleischwirtschaft 2009, Auszug aus "Der Fleischmarkt im Ueberblick 2009" (03.08.10) [http://www.foodaktuell.ch/flash\\_fleisch.php?id=483](http://www.foodaktuell.ch/flash_fleisch.php?id=483)
- [10] Swiss-meat International (02.08.10) <http://www.swiss-meat.com/statistics/consumption>
- [11] Kennel R., Fleischproduktion-Fleischimporte, *Fleisch Information*, 4, (2004), 1-4
- [12] Food Science Australia, Meat & Livestock, AMPC, CSIRO, Afis, Vacuum-packed meat: storage life and spoilage, November 2003
- [13] Gill C. O., Newton K. G., Spoilage of vacuum-packed dark, firm, dry meat at chill temperatures, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.37, No.3, (1979), 362-364
- [14] Nicol D. J., Shaw M. K., Ledward D. A., Hydrogen sulfide production by bacteria and sulfmyoglobin formation in prepacked chilled beef, *Applied Microbiology*, 19, (1970), 937-939
- [15] Basic stoichiometries of reactions in food materials (12.08.2010) [www.foodengineering.info](http://www.foodengineering.info)

- [16] Jakob E., Buttersäureblähung-noch immer aktuell, Agroscope Liebefeld-Posieux, 20 d, (2005), 1-18
- [17] Yang X., Balamurugan S., Gill C. O., Substrate utilization by *Clostridium estertheticum* cultivated in meat juice medium, International Journal of Food Microbiology, 128, (2009), 501-505
- [18] Gow J. A., Mills F. H. J., Pragmatic criteria to distinguish psychrophiles and psychrotrophs in ecological systems, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 47, No. 1, (1984), 213-215
- [19] Broda D. M., Saul D. J., Lawson P. A., Bell R. G., Musgrave D., *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, (2000), 107-118
- [20] Spring S., Merkhoffer B., Weiss N., Kroppenstedt R. M., Hippe H., Stackebrandt E., Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov., and *Clostridium psychrophilum* sp. nov., and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. , International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, (2003), 1019-1029
- [21] Boerema J. A., Broda D. M., Bell R. G., Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures, Letters in Applied Microbiology, 36, (2003), 406-411
- [22] Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2, Williams & Wilkins (1986), 1142
- [23] Campbell N. A., Mitchell L. G., Reece J. B., Immagini della biologia A+B, Zanichelli (2000), B90
- [24] Broda D. M., Musgrave D. R., Bell R. G., Use of restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate strains of psychrophilic and psychrotrophic clostridia associated with "blown pack" spoilage of vacuum-packed meats, Journal of Applied Microbiology, 88, (2000), 107-116
- [25] Boyer S. L., Flechtner V. R., Johansen J. R., Is the 16S–23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria , Molecular Biology and Evolution, 18, (2001), 1057-1069
- [26] Gross J. H. , Mass spectrometra, A text book, Springer (2004), 3
- [27] ProteoChem, Crosslinking Protein Biology & Chemistry (06.08.2010)  
<http://www.proteochem.com>
- [28] Explication Sheet, Axima@Saramis, Workflow and Technology, Fast and easy identification of Microorganisms, SEG-A-080
- [29] Maier T., Klepel S., Renner U., Kostrzewa M., Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification, Bruker Daltonics Application Note, 2006
- [30] "Procédure pour la méthode d'ensemencement en surface"; méthode DI8107, édition 1 du 04.11.2004 . HES-SO/Valais, Sion
- [31] Grogg A., Angewandte Statistik, support de cours HES-SO Valais (2007)

- [32] Office vétérinaire Fédéral, Instructions relatives à l'exécution des analyses microbiologiques dans le cadre de l'autocontrôle des abattoirs, 3 Octobre 2006, Berne
- [33] Stephan R., Ziegler D., Pflüger V., Vogel G., Lehner A., Rapid genus and species identification of *Cronobacter* spp. by MALDI-TOF Mass spectrometry, Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty University of Zurich, (2010), 1-18
- [34] CRC Handbook of chemistry and physics, 58th Edition, CRC Press (1977-1978), F-210
- [35] Dainty R. H., Edwards R. A., Hibbard C. M., Spoilage of vacuum-packed beef by *Clostridium* sp., Journal of the Science of Food and Agriculture, 49, (1989), 473-486
- [36] McEvoy J. M., Doherty A. M., Sheridan J. J., McGuire L., Contamination of beef carcasses during hide removal and use of a test bacterial decontamination system on beef hide, The National Food Centre, Dublin, 25, (2000), 1-20
- [37] Clemens R. M., Adam K.H., Brightwell G., Contamination levels of *Clostridium estertheticum* spores that result in gaseous spoilage of vacuum-packaged chilled beef and lamb meat, Letters in Applied Microbiology, 50, (2010), 591-596
- [38] Napravnikova E., Vorlova L., Malota L., Changes in Hygienic Quality of Vacuum-packed pork during storage, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Czech Republic, 71, (2002), 255-262
- [39] Yang W., Fast viability assessment of *Clostridium* spores-survival in extreme environments, In partial fulfillments of the requirements for the degree of doctor of philosophy, California Institute of Technology, Pasadena, California, 2010
- [40] Kawasaki S., Watamura Y., Ono M., Watanabe T., Takeda K., Niimura Y., Adaptive responses to oxygen stress in obligatory anaerobes *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium aminovalericum*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 71, No. 12, (2005), 8442-8450
- [41] Becton, Dickinson and Company (02. 08. 2010)  
<http://www.bd.com/ds/technicalCenter/index.asp>
- [42] Jones R. J., Hussein H. M., Zagorec M., Brightwell G., Tagg J. R., Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat, Food Microbiology, 25, (2008), 228-234
- [43] Kalchayanand N., Dunne C. P., Sikes A., Ray B., Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 5, (2004), 277-283
- [44] Jones R. J., Zagorec M., Brightwell G., Tagg J. R., Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage, Food Microbiology, 26, (2009), 876-881
- [45] Scharlau, Handbook of Microbiological Culture Media, edition 10 (12.08.10)  
<http://www.scharlau.com/soporte-catalogo.php>
- [46] Bühler N. B., *Clostridium* in Silage, Dung, Milch und Käse - Spätblähung im Käse, Abhandlung zur Erlangung des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, Zürich, 1985

- [47] Stackebrandt E., The richness of prokaryotic diversity: there must be a species somewhere, *Food Technology and Biotechnology*, 41, (2003), 17-22
- [48] Tanasupawat S., Okada S., Kozaki M., Komagata K., Characterization of *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* strains and replacement of the Type strain of *P. acidilactici* with the proposed neotype DSM 20284, *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 43, No. 4, (1993), 860-863
- [49] Ziegler E., Hechelmann H., Pichner R., Gareis M., Keime die aus der Kälte kommen: *Clostridium estertheticum* in vakuumverpacktem Rindfleisch, *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach*, 181, (2008)
- [50] Boltin D. J., Moschonas G., Sheridan J. J., Control of blown pack spoilage in vacuum packaged meat, *Ashtown Food Research Centre*, 101, (2009), 1-12

# **Annexes**

*Annexe 1: Chiffres des exportations et importations suisses en 2009*

	Rind		Kalb		Schwein	
	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)
2007	16'265	3'129	988	11	11'495	801
2008	20'255	3'237	787	0	20'414	827
2009	16'112	3'447	507	158	13'075	778

	Schaf		Geflügel <sup>1</sup>		Pferd	
	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)
2007	5'847	0	40'122	151	4'864	0
2008	5'765	5	44'359	55	4'958	-
2009	5'574	4	43'506	82	4'745	0

	Ziege		Kaninchen		Wild	
	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)
2007	349	-	2'103	-	3'860	28
2008	301	-	1'713	0	3'933	40
2009	267	-	1'221	0	3'341	27

	Total Fleisch		Fisch und Krustentiere		Total	
	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)	Import (Tonnen VG)	Export (Tonnen VG)
2007	85'894	4'120	63'389	262	149'283	4'381
2008	102'486	4'165	65'631	314	168'116	4'480
2009	88'348	4'496	68'087	368	156'435	4'863

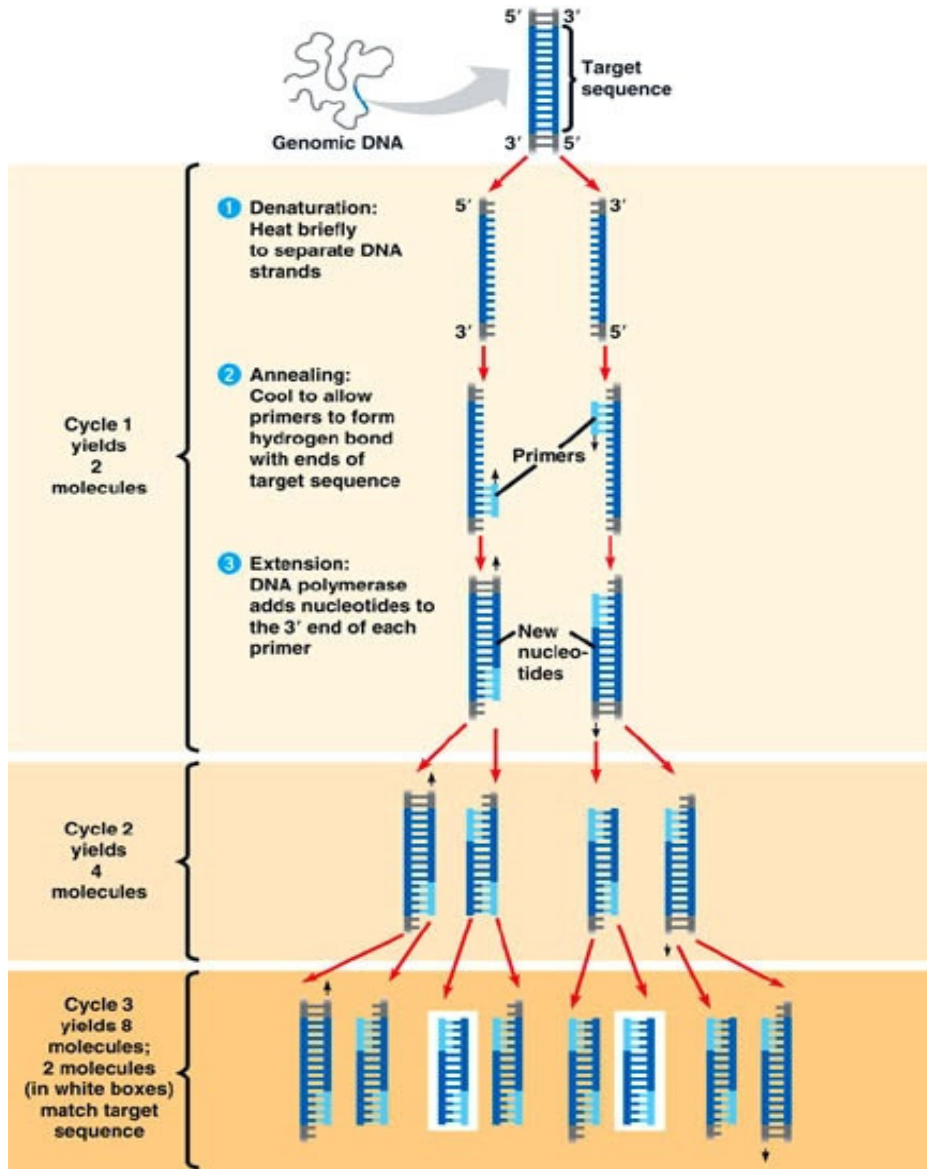
<sup>1</sup> Methodenänderung ab 2007: Zunahme des Anteils "Verwertbares Fleisch"

VG : poids de vente

Source : Oberzolldirektion, Aussenhandelsstatistik, Bern

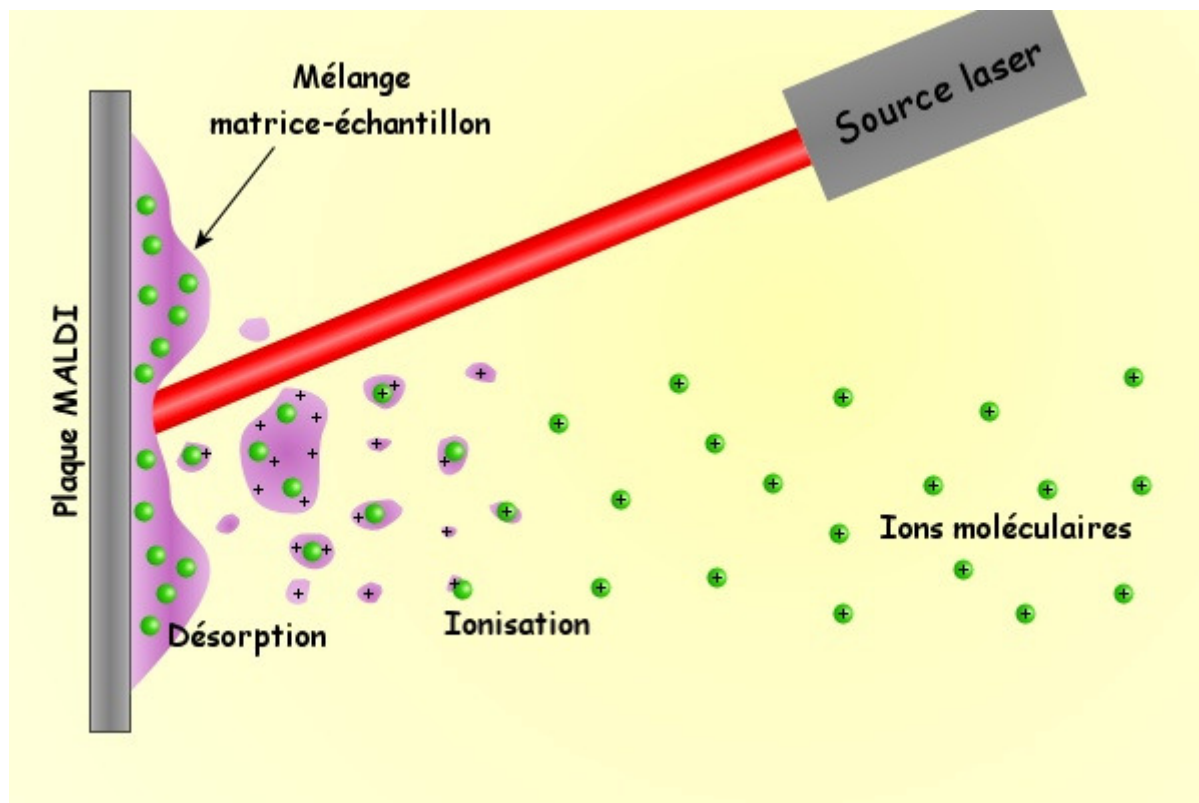


*Annexe 2: Illustration d'une PRC, du génome jusqu'au fragment désirée.*



[Source : <http://www.foodsafetywatch.com/public/1050.cfm>]

### Annexe 3: Mode de fonctionnement de la méthode de ionisation MALDI



L'échantillon (en vert) est ionisé par les électrons provenant de la matrice (en violet) qui a été excitée par un faisceau laser.

[Source : <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6f/Maldi.png>]

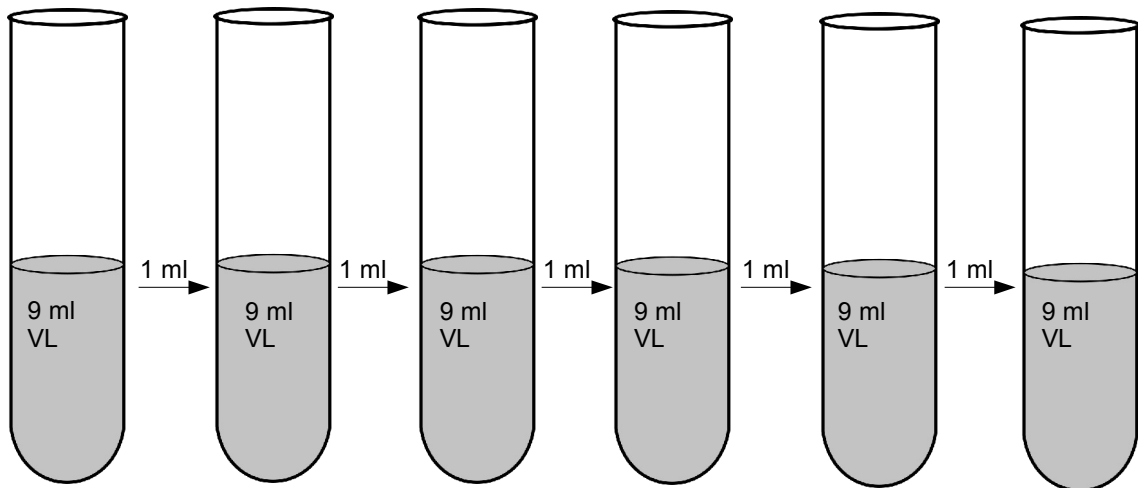
**Annexe 4: Distribution de Student avec niveau de signification  $\alpha$  et degré de liberté  $\phi$**

$\phi$	Signifikanzniveau $\alpha$										
	0,9	0,8	0,6	0,5	0,4	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	0,325	0,727	1,000	1,376	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,62
2	0,142	0,289	0,617	0,816	1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,277	0,584	0,765	0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,271	0,569	0,741	0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,267	0,559	0,727	0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,265	0,553	0,718	0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,263	0,549	0,711	0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,129	0,262	0,546	0,706	0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,543	0,703	0,883	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,542	0,700	0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,540	0,697	0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,539	0,695	0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,538	0,694	0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,537	0,692	0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,536	0,691	0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,535	0,690	0,865	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,534	0,689	0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,257	0,534	0,688	0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,533	0,688	0,861	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,533	0,687	0,860	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,532	0,686	0,859	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,532	0,686	0,858	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,532	0,685	0,858	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,531	0,685	0,857	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,531	0,684	0,856	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,256	0,531	0,684	0,856	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,531	0,684	0,855	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,256	0,530	0,683	0,855	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,256	0,530	0,683	0,854	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,256	0,530	0,683	0,854	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
$Z_{\alpha} =$	0,126	0,253	0,524	0,674	0,842	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

Source : [Fisher & Yates : « Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research : 6<sup>th</sup> ed. », Longman, London (1963) 47]

*Annexe 5: Dilution décimale utilisé pour diluer le jus des viandes*

1 ml de jus  
de viande



Dilution :  $10^{-1}$

$10^{-2}$

$10^{-3}$

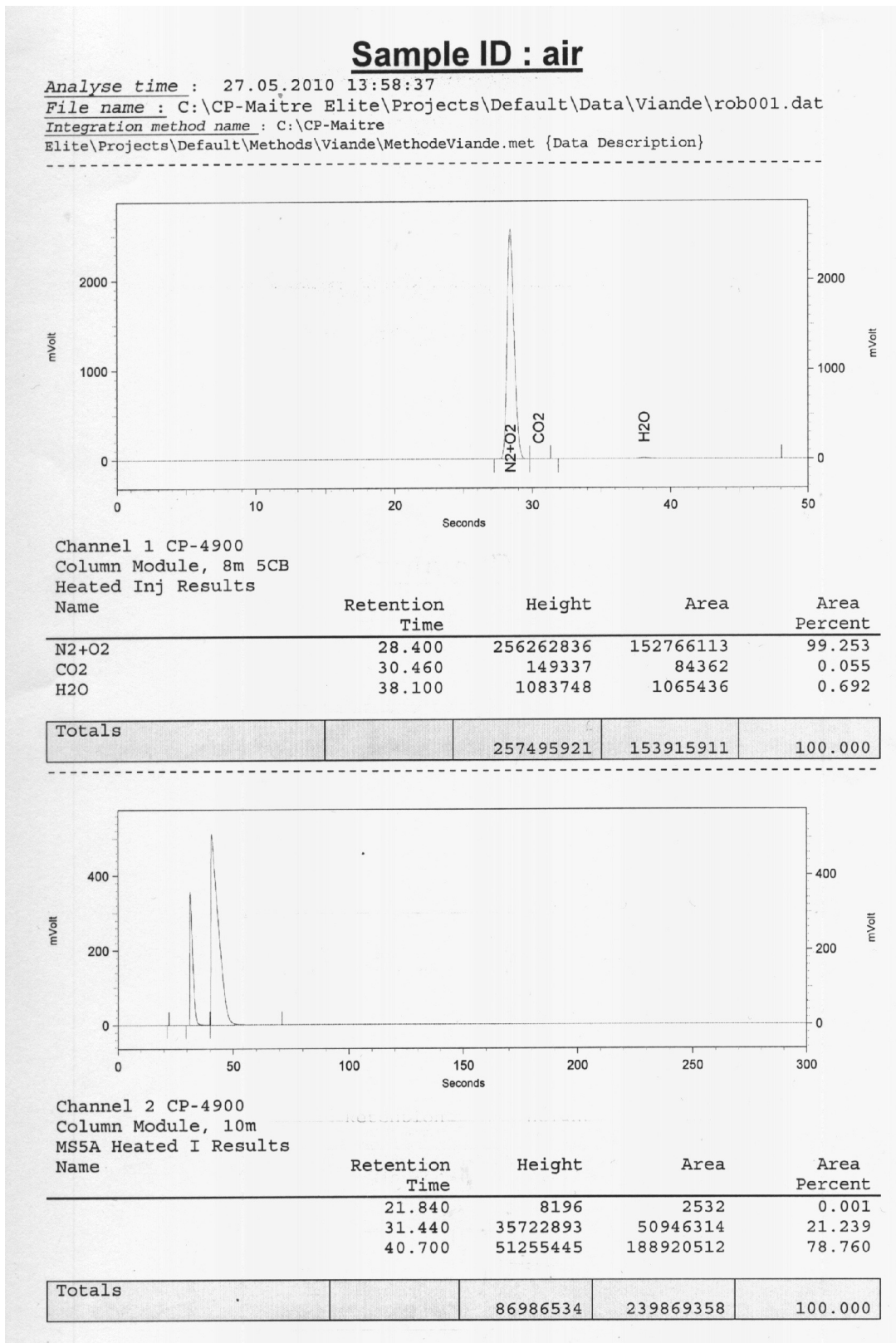
$10^{-4}$

$10^{-5}$

$10^{-6}$

VL : Eau physiologique

**Annexe 6: Résultats brutes de l'analyse de gaz des paquets de viande gonflés**

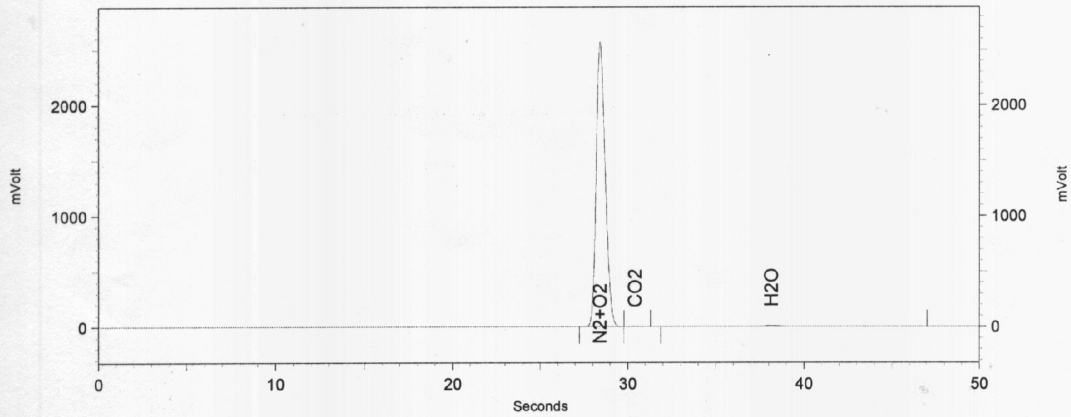


### Sample ID : air

Analyse time : 27.05.2010 15:18:59

File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob008.dat

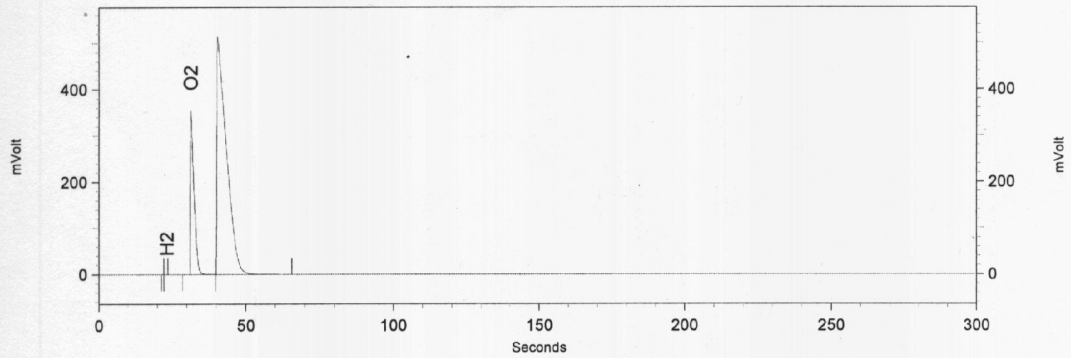
Integration method name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met



Channel 1 CP-4900  
Column Module, 8m 5CB  
Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
N2+O2	28.400	256650723	153277068	99.316
CO2	30.400	243772	142389	0.092
H2O	38.140	925029	913134	0.592

Totals		257819524	154332591	100.000
--------	--	-----------	-----------	---------



Channel 2 CP-4900  
Column Module, 10m  
MS5A Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
H2	21.820	8325	2599	0.001
H2	23.280	166	147	0.000
O2	31.380	35689745	51159206	21.260
O2	40.500	51340206	189470509	78.739

Totals		87038442	240632461	100.000
--------	--	----------	-----------	---------

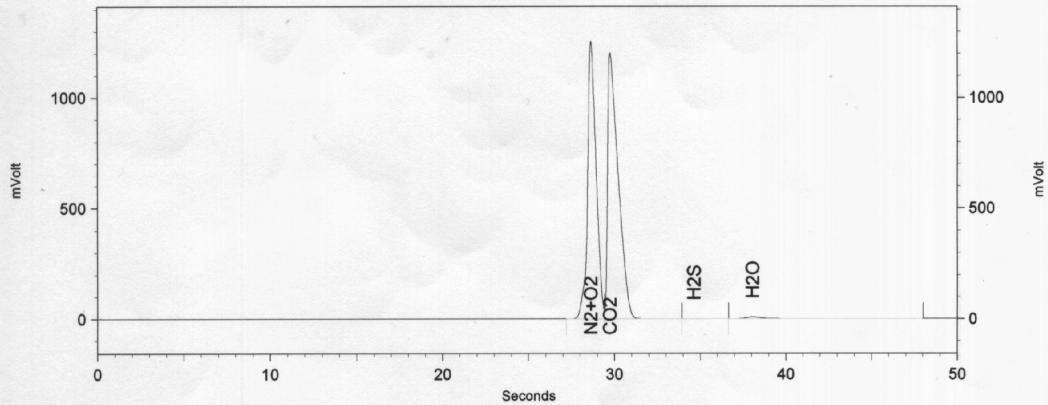
### Sample ID : standard

Analyse time : 27.05.2010 14:18:54

File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob002.dat

Integration method name : C:\CP-Maitre

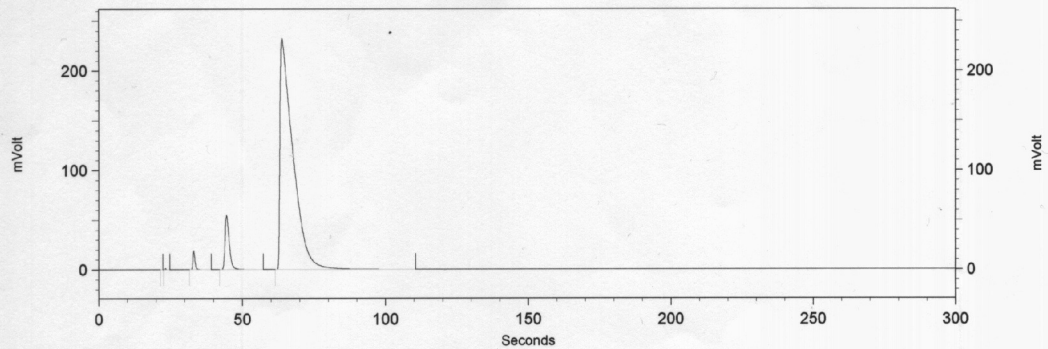
Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met



Channel 1 CP-4900  
Column Module, 8m 5CB  
Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
N2+O2	28.620	125722196	72575775	45.768
CO2	29.740	120416650	85243667	53.757
H2S	34.640	7292	8919	0.006
H2O	38.060	736792	744307	0.469

Totals		246882930	158572668	100.000
--------	--	-----------	-----------	---------



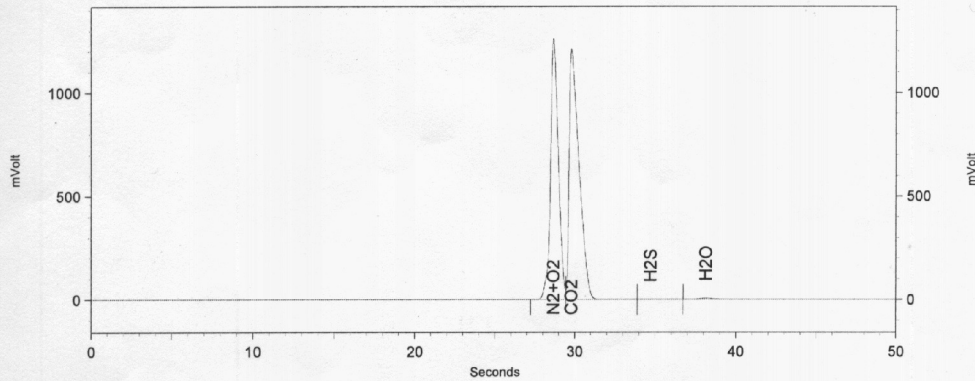
Channel 2 CP-4900  
Column Module, 10m  
MS5A Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
	21.820	172	50	0.000
	23.220	99305	41932	0.032
	33.080	1885955	1565160	1.188
	44.500	5478279	9302839	7.062
	63.760	23259753	120825523	91.718

Totals		30723464	131735504	100.000
--------	--	----------	-----------	---------

### Sample ID : standard

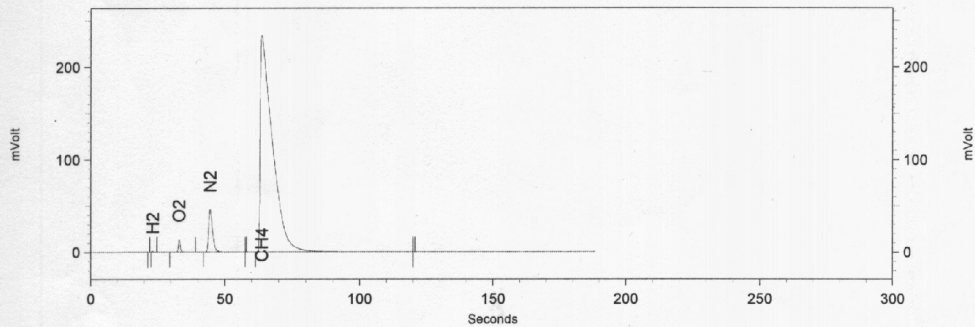
Analyse time : 27.05.2010 14:28:18  
 File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob003.dat  
 Integration method name : C:\CP-Maitre  
 Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met H2S 98.1 ppm  
 O2 0.194 %  
 H2 1.013 %  
 N2 1.986 %  
 CH4 50.36 %  
 CO2 reste



Channel 1 CP-4900  
 Column Module, 8m 5CB  
 Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
N2+O2	28.660	125993003	71873270	45.288
CO2	29.780	121211393	86221607	54.329
H2S	34.700	12699	14225	0.009
H2O	38.140	566237	592895	0.374

Totals		247783332	158701997	100.000
--------	--	-----------	-----------	---------



Channel 2 CP-4900  
 Column Module, 10m  
 MS5A Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
H2	21.840	96	30	0.000
H2	23.240	99735	42241	0.032
O2	33.100	1342672	1113137	0.851
N2	44.560	4587454	7741017	5.918
N2	57.620	54	10	0.000
CH4	63.720	23394509	121918452	93.199
CH4	120.100	97	34	0.000

Totals		29424617	130814921	100.000
--------	--	----------	-----------	---------



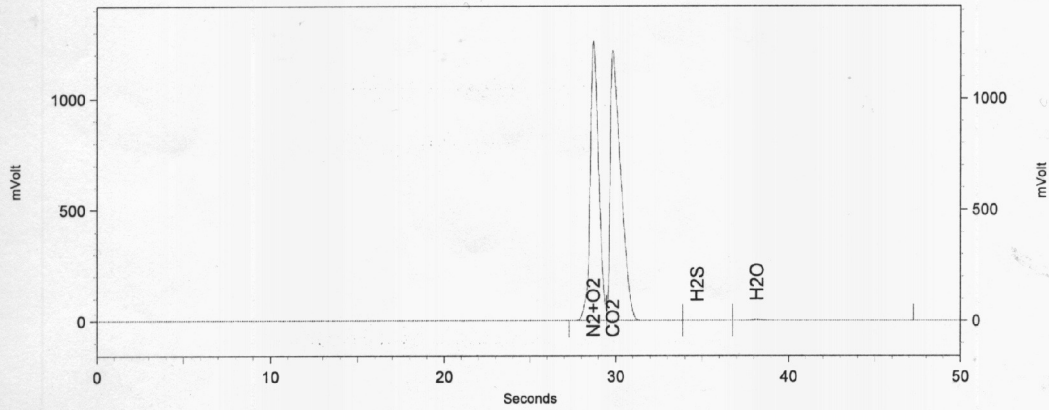
### Sample ID : standard ✓

Analyse time : 27.05.2010 14:34:33

File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob004.dat

Integration method name : C:\CP-Maitre

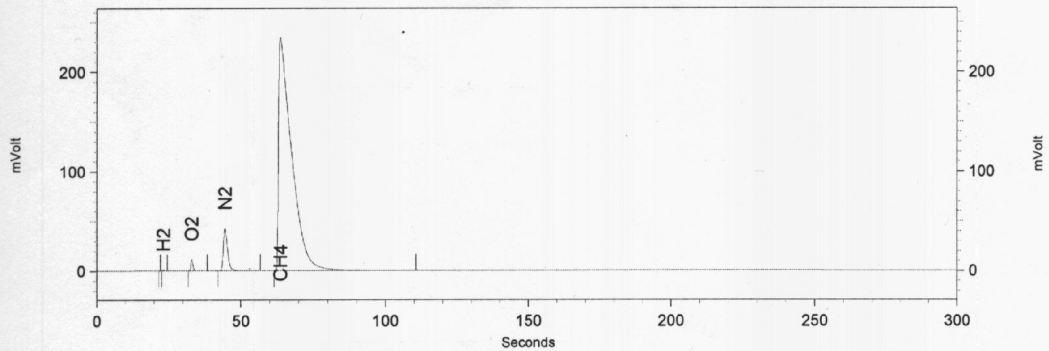
Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met



Channel 1 CP-4900  
Column Module, 8m 5CB  
Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
N2+O2	28.700	126142907	71747831	45.175
CO2	29.820	121546327	86547063	54.493
H2S	34.720	12780	12429	0.008
H2O	38.180	501138	514953	0.324

<b>Totals</b>		248203152	158822276	100.000
---------------	--	-----------	-----------	---------



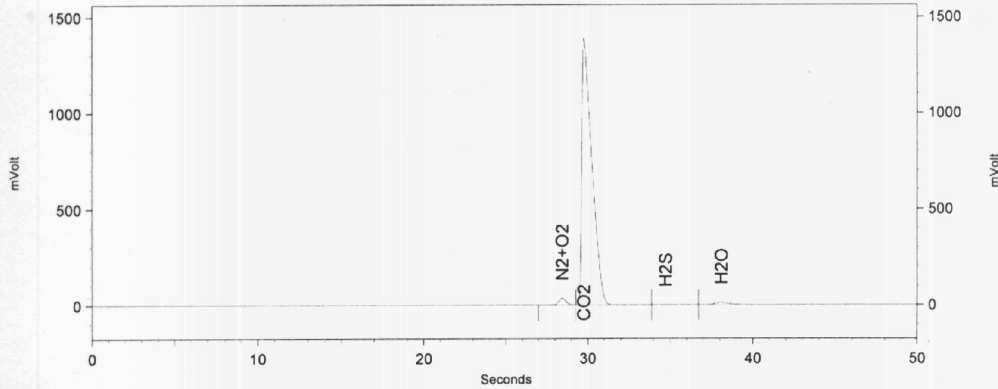
Channel 2 CP-4900  
Column Module, 10m  
MS5A Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
H2	21.800	62	15	0.000
O2	23.240	99936	42274	0.032
O2	33.100	1152557	954461	0.732
N2	44.560	4268145	7183443	5.506
CH4	63.680	23457707	122291856	93.730

<b>Totals</b>		28978407	130472049	100.000
---------------	--	----------	-----------	---------

### Sample ID : VaiandeA

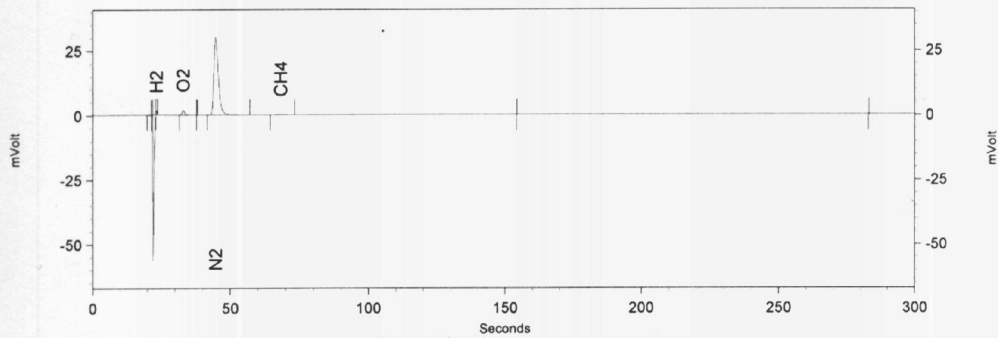
Analyse time : 27.05.2010 14:55:52  
 File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob005.dat  
 Integration method name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met



Channel 1 CP-4900  
 Column Module, 8m 5CB  
 Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
N2+O2	28.440	3475281	1829303	1.794
CO2	29.760	139068392	98848820	96.965
H2S	34.720	24322	22746	0.022
H2O	38.100	1234134	1241555	1.218

Totals		143802129	101942424	100.000
--------	--	-----------	-----------	---------



Channel 2 CP-4900  
 Column Module, 10m  
 MS5A Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
	21.380	20361	16677	0.196
	21.860	27956	11521	0.135
	22.060	5675382	2615815	30.718
H2	23.340	137475	50172	0.589
O2	33.080	189203	199271	2.340
	37.920	42	6	0.000
N2	44.800	2991086	5606614	65.839
CH4	68.240	4312	15613	0.183
	154.240	84	7	0.000
	282.940	66	7	0.000

Totals		9045967	8515703	100.000
--------	--	---------	---------	---------

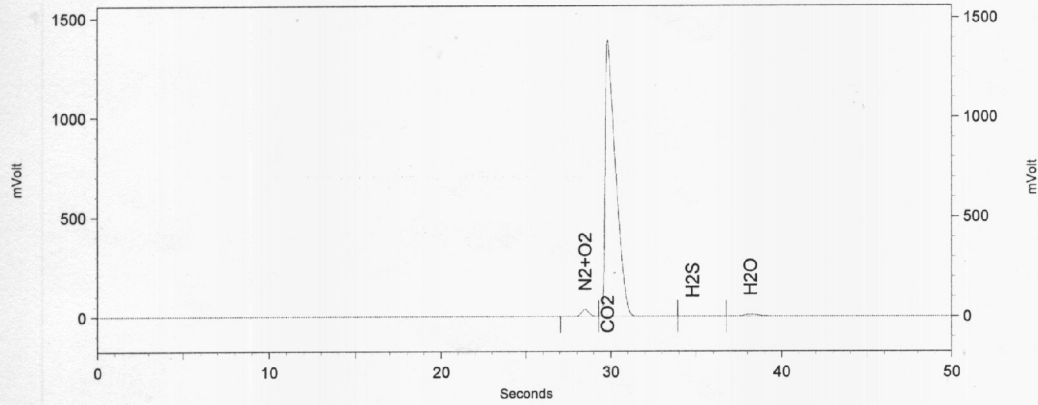
## Sample ID : VaiandeA 2

Analyse time : 27.05.2010 15:03:08

File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob006.dat

Integration method name : C:\CP-Maitre

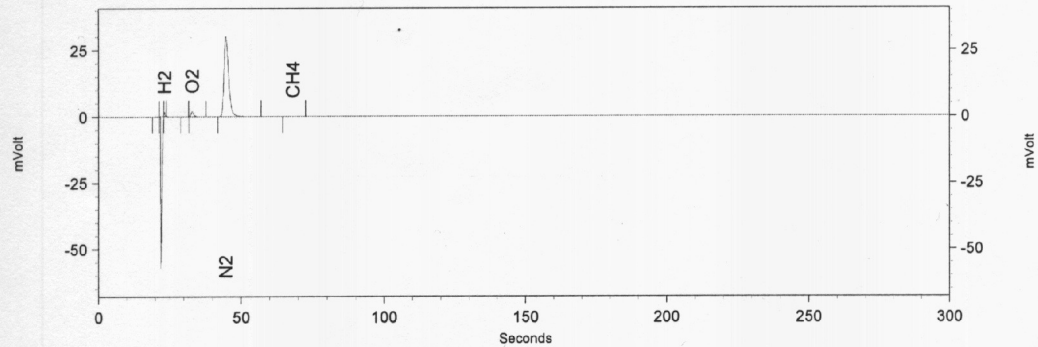
Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met



Channel 1 CP-4900  
Column Module, 8m 5CB  
Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
N2+O2	28.480	3447945	1800975	1.773
CO2	29.800	138853726	98837958	97.284
H2S	34.780	23818	21071	0.021
H2O	38.180	925161	937130	0.922

Totals		143250650	101597134	100.000
--------	--	-----------	-----------	---------



Channel 2 CP-4900  
Column Module, 10m  
MS5A Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
	21.380	14304	16461	0.192
	22.060	5721616	2663133	31.115
H2	23.360	154628	62180	0.726
	31.440	447	755	0.009
O2	33.100	187551	196984	2.301
N2	44.800	2993707	5613334	65.584
CH4	68.140	1734	6104	0.071

Totals		9073987	8558951	100.000
--------	--	---------	---------	---------

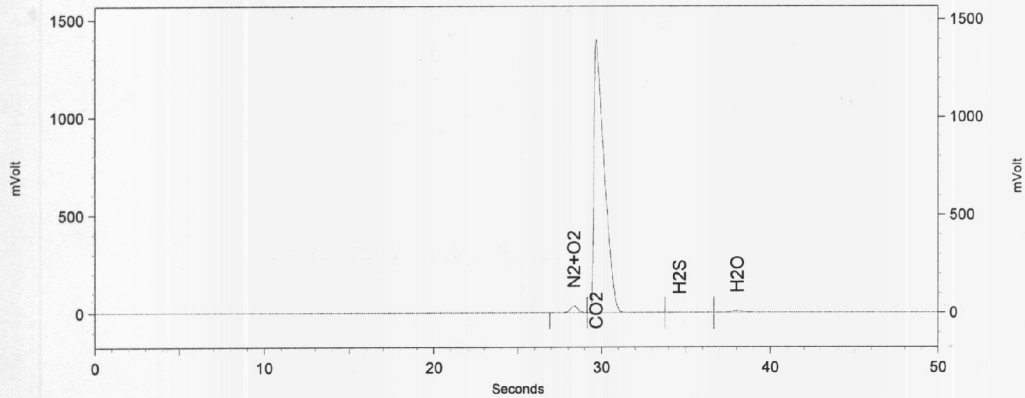
### Sample ID : VaiandeA 3

Analyse time : 27.05.2010 15:09:45

File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob007.dat

Integration method name : C:\CP-Maitre

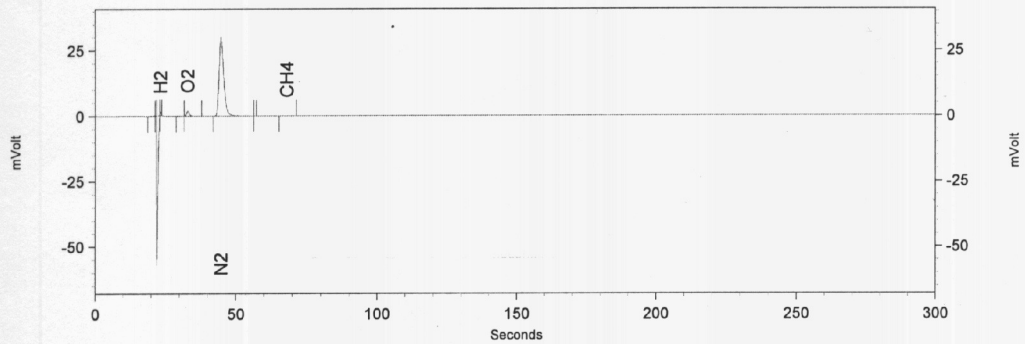
Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met



Channel 1 CP-4900  
Column Module, 8m 5CB  
Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
N2+O2	28.360	3452500	1790015	1.761
CO2	29.680	139486363	98957796	97.381
H2S	34.620	24560	22659	0.022
H2O	38.040	833187	849244	0.836

Totals		143796610	101619714	100.000
--------	--	-----------	-----------	---------



Channel 2 CP-4900  
Column Module, 10m  
MS5A Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
	21.380	20658	26297	0.307
	21.880	26039	10924	0.128
	22.060	5732341	2648886	30.966
H2	23.340	145555	55418	0.648
	31.200	432	800	0.009
O2	33.080	186980	196725	2.300
N2	44.760	2993442	5612154	65.607
	56.460	110	48	0.001
CH4	68.040	971	3006	0.035

Totals		9106528	8554258	100.000
--------	--	---------	---------	---------

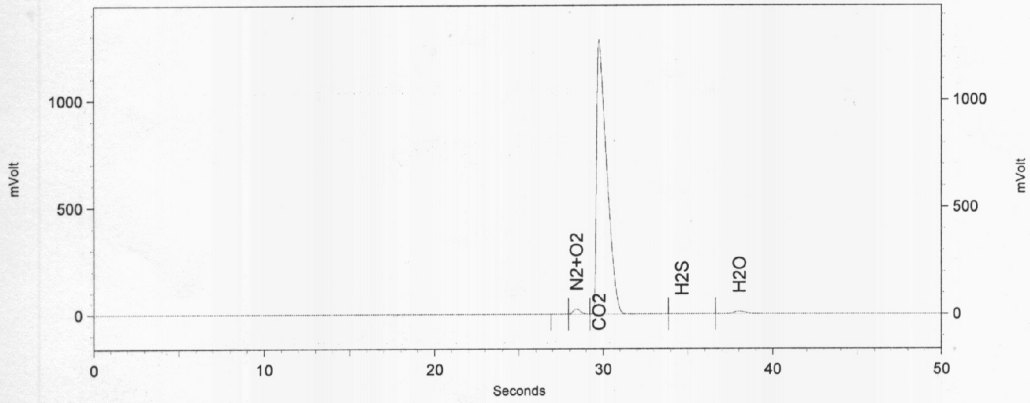
## Sample ID : ViandeB 1

Analyse time : 27.05.2010 15:30:41

File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob009.dat

Integration method name : C:\CP-Maitre

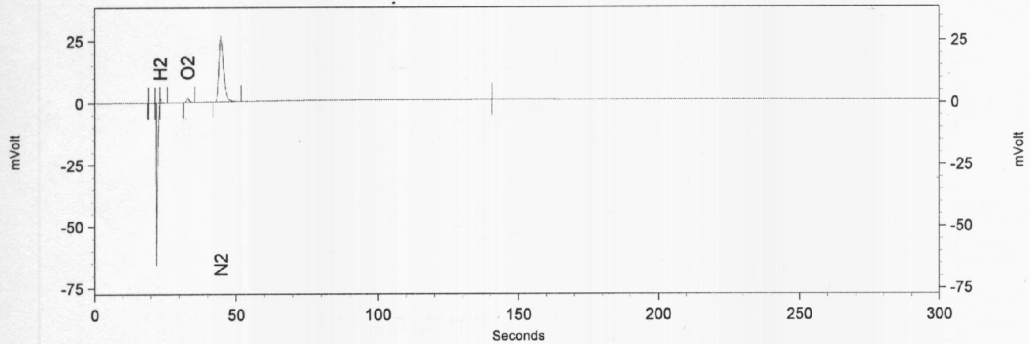
Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met



Channel 1 CP-4900  
Column Module, 8m 5CB  
Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
N2+O2	27.700	86820	33823	0.037
CO2	28.420	2433664	1207720	1.318
CO2	29.760	128353165	88959317	97.101
H2S	34.660	38985	79453	0.087
H2O	38.040	1193499	1335120	1.457

Totals		132106133	91615433	100.000
--------	--	-----------	----------	---------



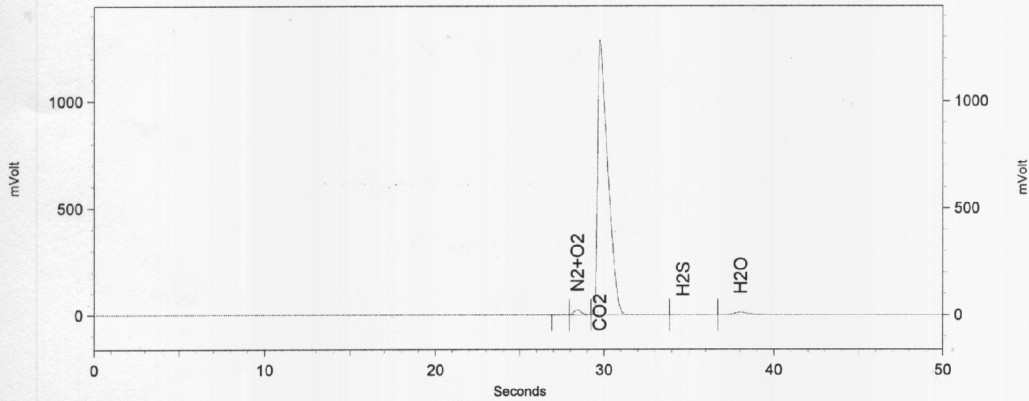
Channel 2 CP-4900  
Column Module, 10m  
MSSA Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
	18.940	41	8	0.000
	21.280	5398	5916	0.070
	21.960	6598537	3260801	38.425
H2	23.340	172249	86912	1.024
O2	33.040	174313	183571	2.163
N2	44.740	2641059	4948888	58.318
	140.540	55	5	0.000

Totals		9591652	8486101	100.000
--------	--	---------	---------	---------

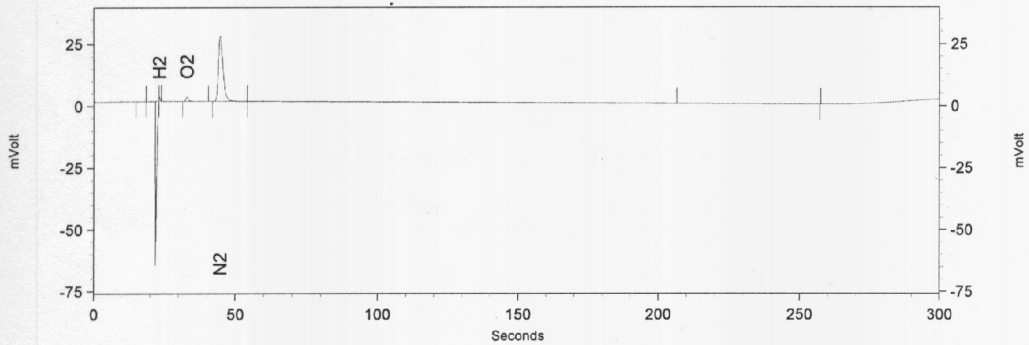
### Sample ID : ViandeB 2

Analyse time : 27.05.2010 15:37:30  
 File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob010.dat  
 Integration method name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met



Channel 1 CP-4900  
 Column Module, 8m 5CB  
 Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
	27.680	100724	42371	0.046
N2+O2	28.420	2394656	1194671	1.299
CO2	29.740	128635066	89306541	97.089
H2S	34.660	53097	118756	0.129
H2O	38.040	1124022	1322078	1.437
<b>Totals</b>		<b>132307565</b>	<b>91984417</b>	<b>100.000</b>

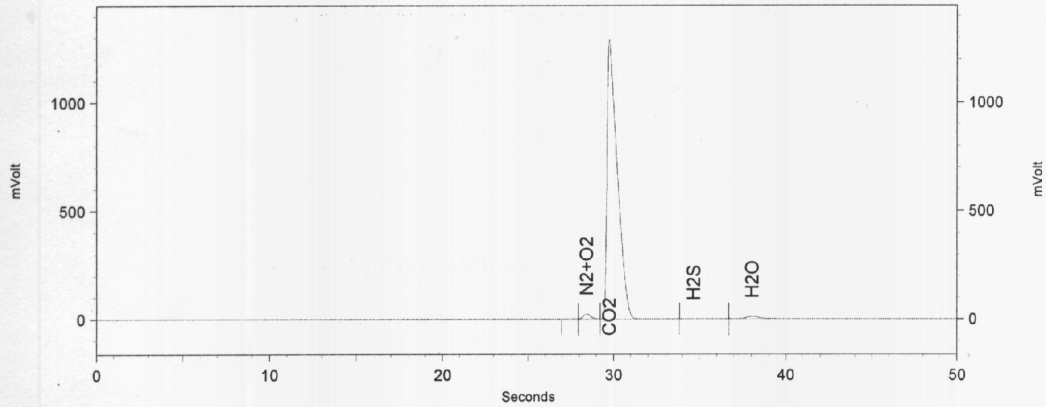


Channel 2 CP-4900  
 Column Module, 10m  
 MS5A Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
	17.900	289	918	0.010
	21.960	6637294	3295520	36.029
H2	23.340	149629	60654	0.663
O2	33.040	168909	183233	2.003
N2	44.720	2627757	4963996	54.270
	54.340	5432	642612	7.025
	257.260	15	2	0.000
<b>Totals</b>		<b>9589325</b>	<b>9146935</b>	<b>100.000</b>

### Sample ID : ViandeB 3

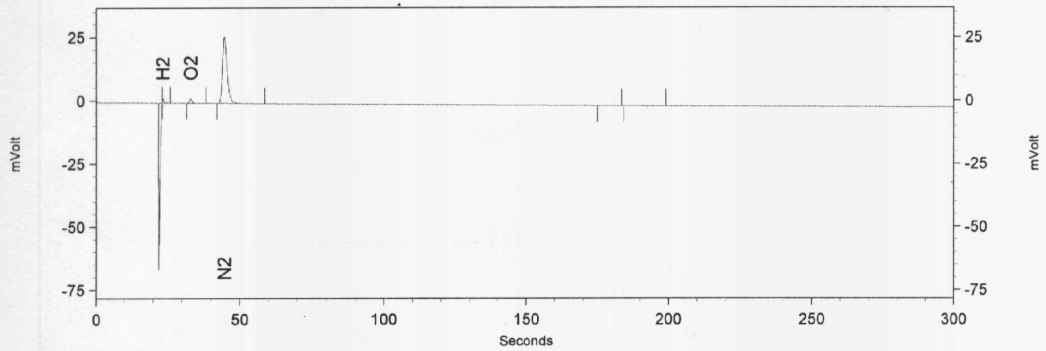
Analyse time : 27.05.2010 15:45:00  
 File name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Data\Viande\rob011.dat  
 Integration method name : C:\CP-Maitre Elite\Projects\Default\Methods\Viande\MethodeViande.met



Channel 1 CP-4900  
 Column Module, 8m 5CB  
 Heated Inj Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
	27.680	99215	40767	0.044
N2+O2	28.420	2395059	1194599	1.295
CO2	29.740	128899145	89532471	97.092
H2S	34.660	53376	120493	0.131
H2O	38.040	1098765	1325754	1.438

Totals		132545560	92214084	100.000
--------	--	-----------	----------	---------



Channel 2 CP-4900  
 Column Module, 10m  
 MSSA Heated I Results

Name	Retention Time	Height	Area	Area Percent
	21.960	6609485	3290929	38.822
H2	23.340	162075	78406	0.925
O2	33.020	167466	180158	2.125
N2	44.680	2624138	4924868	58.098
	175.140	353	1321	0.016
	184.360	172	1207	0.014

Totals		9563689	8476889	100.000
--------	--	---------	---------	---------

**Annexe 7: Résultats de l'identification par MALDI-TOF livrés par Mabritec AG**

**Resultate der Untersuchung von Proben HES\_SO / 17. Juni 2010**

Proben Nr.	Labornummer Kunde	Identifizierung mit SSp	% ID	Identifizierung mit Compare	Bewertung Mabritec AG / Bemerkungen
1	Test_01	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank Referenz: <i>Clostridium gasigenes</i>
2	Test_02	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank
3	Test_03	<i>Lactococcus sp.</i>	87.2	<i>Lactococcus sp.</i>	<b><i>Lactococcus sp.</i></b>
4	Test_04	<i>Lactococcus sp.</i>	84.1	<i>Lactococcus sp.</i>	<b><i>Lactococcus lactis</i></b>
5	Test_05	<i>Lactococcus lactis</i>	99.9	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank gleich wie 6,7,8 und 11
6	Test_06	<i>Lactococcus lactis</i>	99.9	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank gleich wie 5,7,8 und 11
7	Test_07	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank gleich wie 5,6,8 und 11
8	Test_08	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank gleich wie 5,6,7 und 11
9	Test_09	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank
10	Test_10	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank
11	Test_11	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank gleich wie 5,6,7 und 8

Mabritec AG, Lörracherstrasse 50, Postfach 320, CH-4125 Riehen 1, Tel. +41 (0)61 631 28 46, www.mabritec.com



Resultate der Untersuchung von Proben HES\_SO / 4. August 2010

Proben Nr.	Labornummer Kunde	Identifizierung mit SSp	% ID	Identifizierung mit Compare	Bewertung Mabritec AG / Bemerkungen
1	01 markierte Kolonie	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	88.4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<b><i>Pediococcus pentosaceus</i></b>
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	88.4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
2	02 markierte Kolonie	<i>Bacillus cereus</i> group ( <i>cereus/mycooides/pseudomycooides/thuringiensis</i> )	99.9	-	<b><i>Bacillus cereus</i> group</b>
		<i>Bacillus cereus</i> group ( <i>cereus/mycooides/pseudomycooides/thuringiensis</i> )	99.	-	
3	03 markierte Kolonie	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Bisher nicht in der Datenbank
4	04 markierte Kolonie	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Am ähnlichsten zur Probe Test_09 siehe Dendrogramm
5	05 markierte Kolonie	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim am ähnlichsten zur Probe 06
6	06 markierte Kolonie	-	-	-	Nicht identifizierbarer Keim Am ähnlichsten zur Probe 05

Mabritec AG, Lörracherstrasse 50, Postfach 320, CH-4125 Riehen 1, Tel. +41 (0)61 631 28 46, www.mabritec.com