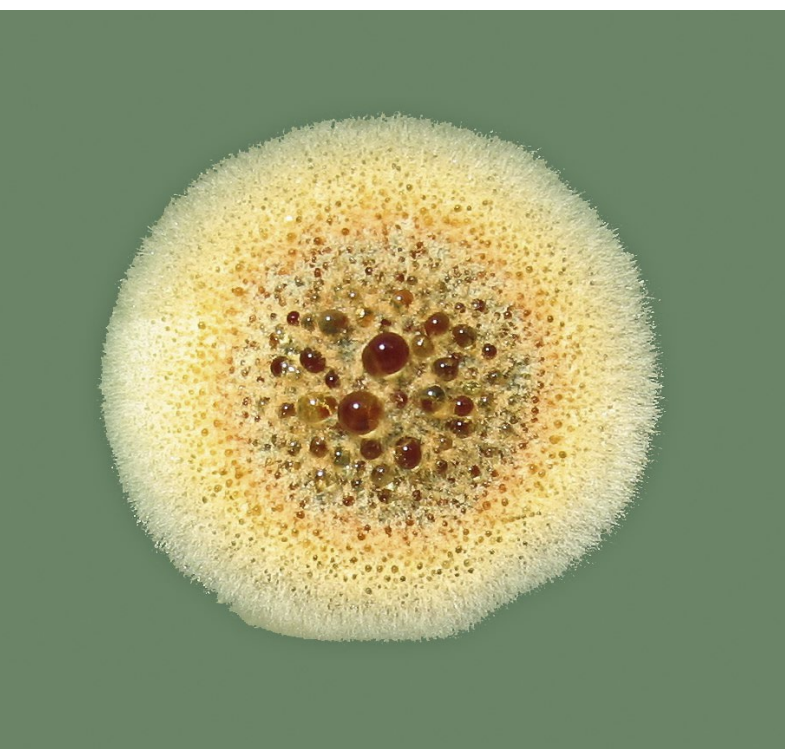


La qualité microbiologique des aliments pour animaux

Jean-Louis Gafner, Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, 1725 Posieux

Renseignements: Jean-Louis Gafner, e-mail: jean-louis.gafner@alp.admin.ch, tél. +41 26 407 72 16



En culture, les colonies de moisissures (par exemple *Penicillium chrysogenum*) sont très esthétiques, mais leur développement incontrôlé dans des aliments pour animaux peut avoir des effets indésirables. (Photo ALP-Haras)

Introduction

Depuis 1950 environ, des microbiologistes se sont intéressés à une meilleure évaluation de la qualité microbiologique des aliments et des matières premières destinées aux animaux. On doit entre autres à H.-L. Schmidt (1926–2011), de Speyer, l'approche de la signification écologique des micro-organismes présents dans ces aliments. Alors que pour les denrées alimentaires, les critères choisis pour cette évaluation se sont concentrés principalement sur la bactériologie, les pionniers de la microbiologie des céréales et des aliments pour animaux ont saisi le rôle important que jouaient les moisissures dans le choix des paramètres à vérifier. Dès 1960, après plusieurs épisodes de toxicité aigüe dans les élevages,

accompagnés d'innombrables morts d'animaux, la responsabilité des moisissures dans la production de substances toxiques a été établie. On a compris que des moisissures du genre *Aspergillus* étaient en cause dans ces intoxications et les aflatoxines (Wyllie *et al.* 1978) ont été découvertes. Ces substances hautement toxiques, les mycotoxines, ont fait dès lors l'objet de nombreuses études et des centaines d'autres mycotoxines ont été découvertes, isolées et décrites.

Dans un groupe de travail de microbiologistes des aliments pour animaux, constitué dans le cadre du VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchung- und Forschungsanstalten), ouvert aux spécialistes d'autres pays germanophones, un concept d'évaluation basé sur les teneurs en micro-organismes a progressivement pris forme. Au niveau international, d'abord au sein de l'IAG (Internationale Arbeitsgemeinschaft für Futtermitteluntersuchung), puis dans l'organisation EFMO (European Feed Microbiology Organisation, www.efmo.org), un vaste programme d'échange d'informations, de méthodes, d'actualités et surtout l'organisation d'analyses en chaîne destinées à valider le concept élaboré ont ainsi été disponibles.

«Un aliment moisi ne devrait pas être donné à des animaux!» (fig.1). Cette règle simple est appliquée avec le bon sens que chaque détenteur d'animaux de rente se doit de suivre. Pour permettre des performances optimales dans un élevage et pour assurer une bonne santé aux animaux, il faut réunir les meilleures conditions possibles dans leur garde, leur alimentation et la prévention des maladies qui peuvent les affecter. L'hygiène alimentaire a une influence importante sur la santé et les performances de l'animal, mais différents facteurs, pas toujours mesurables, peuvent se combiner et engendrer des troubles.

Une marchandise avariée est en général facilement détectable. Son odeur et son aspect donnent souvent des indices suffisants pour douter de son état. Cette appréciation sommaire manque toutefois de consistance et de reproductibilité. Le besoin de disposer d'une méthode quantitative normalisée de détermination des teneurs en micro-organismes, en unités formant colonie



Figure 1 | Échantillon d'ensilage de maïs envahi par des moisissures d'altération. (Photo Olivier Bloch, ALP-Haras)

par gramme (UFC/g) a été le premier élément d'un concept reproductible. Une telle méthode a été disponible et publiée en 1981 par Schmidt *et al.*

Valeurs d'orientation

A cette époque, des valeurs d'orientation commencent à circuler dans les milieux intéressés (les tableaux de Schmidt). Les valeurs d'orientation se définissent comme étant les limites supérieures acceptables des teneurs en moisissures, levures et bactéries aérobies mésophiles qualifiant de normale la qualité microbiologique d'un aliment. On estimait alors empiriquement que sur une population d'échantillons de même type prélevés au hasard, non associés à des cas de dommages, les 2/3 pouvaient être classés dans le degré I (bonne qualité); un quart des échantillons pouvaient être classés dans le degré II (qualité amoindrie) et le solde (environ 10%) pouvait être classé dans le degré III (qualité altérée, voire moisie). En termes mathématiques, la valeur limite dite «normale» équivaut à la valeur du percentile le plus proche de 66,67%.

Au milieu des années 1990, grâce à des contributions importantes de l'industrie des aliments pour animaux en Allemagne, une vaste étude portant sur l'analyse de plus de 3200 échantillons a pu être menée dans les différents Länder allemands. Une méthode plus complète avait alors été rédigée par le groupe d'experts du VDLUFA (Fachgruppe VI Mikrobiologie des VDLUFA). Cette méthode détaille les teneurs de 7 groupes de micro-organismes indicateurs présents dans les aliments. L'objectif de cette étude pilote était d'obtenir des valeurs d'orientation pour les aliments destinés aux animaux de rente les plus importants de même que pour les granulés. Ces valeurs d'orientation ont aussi été établies pour les matières premières les plus courantes. Ainsi les aliments pour volaille, poules, porcelets, porcs, veaux, vaches laitières et bovins, de même que les

Résumé

La qualité d'un aliment pour animaux n'est pas uniquement définie par les différentes teneurs en nutriments qu'il contient, ni par sa composition en matières premières ou sa digestibilité et son appétence, ni même par son apparence ou ses caractéristiques sensorielles, mais aussi et surtout par son état hygiénique.

Cet article présente la manière d'évaluer la qualité microbiologique d'un aliment, de même que l'histoire de sa mise en place en Europe, en particulier dans les pays germaniques. Il décrit la méthode utilisée et la dynamique des populations de micro-organismes présents dans un aliment, de la récolte des matières premières au stockage. Des espèces indicatrices servent de repères dans cette évaluation. Des valeurs d'orientation ont été établies pour ces micro-organismes indicateurs dans les aliments et les matières premières les plus utilisées.

L'article présente un travail d'équipe initié par les LUFA (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalten) allemandes dans plusieurs pays d'Europe, dont la Suisse.

céréales, les tourteaux et différents sous-produits ont été testés et les résultats évalués statistiquement (Bucher *et al.* 2002).

Aucun modèle mathématique ne peut toutefois s'appliquer à tous les cas de figure. Ces valeurs d'orientation sont empiriques et doivent se comprendre comme étant des repères pour l'interprétation de la qualité microbiologique; leur crédit n'est pas celui d'une norme contraignante. L'expert doit pouvoir baser son jugement sur ces repères et sur l'ensemble des observations réalisables dans un aliment.

Les tableaux des valeurs d'orientation sont disponibles dans les documents VDLUFA actuellement en vigueur cités dans la littérature. Ils sont régulièrement mis à jour et complétés. Il est également possible de les consulter sur le site internet d'Agroscope.

A titre d'exemple, les valeurs d'orientation en vigueur pour les aliments pour porcs se trouvent dans le tableau 1.

Dans tous les cas, si la teneur (même pour un seul des 7 groupes de micro-organismes) est supérieure à 10 fois sa valeur d'orientation, le degré de qualité IV lui est attribué: cet aliment est moisi, n'est plus commercialisable et ne devrait plus être affourragé (tabl. 2). Cette valeur pourrait être celle que les législations européennes et suisses décrivent comme suit dans l'Ordonnance du DFE concernant l'hygiène dans la production primaire (RS 916.020.1, Art. 2, §8):

Tableau 1 | Exemple de valeurs d'orientation (aliments pour porcs)

Micro-organismes	Bactéries aérobies mésophiles (mio UFC/g)			Moisissures et Dématiacées (x 10 ³ UFC/g)			Levures (x 10 ³ UFC/g)
	Typiques du produit	Indicatrices de l'altération		Typiques du produit	Indicatrices de l'altération		Typiques du produit et indic. de l'altération
Groupe de micro-organismes	1	2	3	4	5	6	7
B. pigmentées en jaune, <i>Pseudomonas/Enterobacteriaceae</i> , autres (p.e. bactéries corynéformes)	6	1	0,1	50	50	5	80
<i>Bacillus, Staphylococcus</i> (coagulase-négatives) / <i>Micrococcus</i>	1	0,5	0,05	5	10	1	5
Streptomycètes							
Dématiacées; <i>Acremonium, Verticillium, Fusarium, Aureobasidium</i> , autres							
<i>Aspergillus, Penicillium, Scopulariopsis, Wallemia sebi</i> , autres							
Mucorales							
Levures (tous genres)							

«Les aliments pour animaux et l'eau d'abreuvement ne doivent altérer ni la santé des animaux ni la qualité des denrées alimentaires qui en sont issues. On ne distribuera que des aliments pour animaux propres, irréprochables du point de vue de l'hygiène et non avariés.»

Une charge massive de micro-organismes typiques du produit (matière première entrant dans la composition d'un aliment mélangé) est toutefois présente dans les céréales et les végétaux fraîchement récoltés. Dans ce cas, la marchandise ne peut pas être qualifiée de «moisie», mais on estime que l'introduction d'un grand nombre de micro-organismes vivants dans le système digestif d'un animal peut provoquer des troubles. La pratique sait que les récoltes de céréales et de foin par exemple doivent subir une période de «maturation» de quelques mois avant d'être affourragées. Durant cette période, la charge microbienne diminue fortement.

Cette approche de l'appréciation de la qualité microbiologique est la seule au monde à notre connaissance. La quantification des micro-organismes et les déduc-

tions de qualité qui en découlent constituent un outil appréciable en routine, bien qu'elle nécessite une expertise par un spécialiste dans son application.

Le nombre de micro-organismes par gramme d'aliment est une mesure qu'il faut toutefois relativiser: certaines espèces à grande prolifération de spores peuvent fausser le résultat quantitatif par rapport à d'autres espèces plus pauvres en spores ou plus lentes dans leur développement. Cette exception est prise en compte lors de l'évaluation du groupe des Mucorales, dont les cellules mycéliennes coenocytiques produisent proportionnellement moins de colonies que les autres moisissures.

Méthode

La méthode utilisée pour cette évaluation se compose de 4 documents. Ces documents figurent dans le «Methodenbuch» du VDLUFA et sont référencés dans la bibliographie. Le premier document (Méthode 28.1.1) décrit les règles générales pour la détermination des teneurs en micro-organismes. Il est accompagné de la méthode décrivant la détermination des bactéries, moisissures et levures (Méthode 28.1.2) et d'un document servant à l'identification des micro-organismes (Méthode 28.1.3). Enfin il est complété par une directive indiquant la marche à suivre pour effectuer une évaluation de la qualité microbiologique (Méthode 28.1.4).

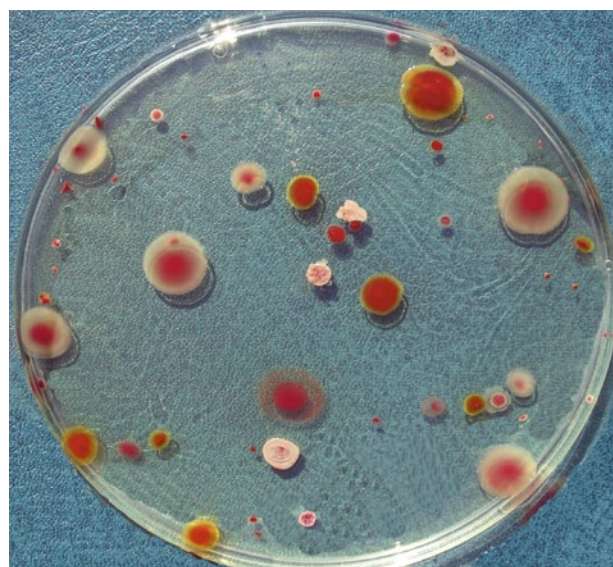


Figure 2 | Bactéries typiques du produit (aliment pour porcs degré de qualité I) sur agar au tryptose additionné de CTT. La couleur orangée de certaines colonies de bactéries est due au mélange de la pigmentation naturelle (jaune) avec le formazan (rouge) produit par réduction du CTT. (Photo: ALP-Haras)

Tableau 2 | Interprétation générale

Rapport teneur trouvée / valeur d'orientation	Degrés de qualité	Evaluation
≤ 1x	I	qualité normale
>1x à ≤ 5x	II	qualité amoindrie
>5x à ≤ 10x	III	qualité fortement amoindrie
>10x	IV	moisi, altéré, plus commercialisable

Le dénombrement des bactéries aérobies mésophiles s'effectue avec de l'agar au tryptose additionné de chlorure de triphényle-tétrazolium (CTT; fig. 2)

Pour les moisissures, la méthode VDLUFA se distingue des méthodes ISO 21527-1 (2008) et 21527-2 (2008) par le fait qu'elle utilise systématiquement 2 milieux de culture, quelle que soit la valeur d'activité en eau (*aw*) de l'échantillon. ISO prévoit un seul milieu de culture si cette valeur *aw* est inférieure à 0,95, ce qui est le cas des aliments mélangés et des céréales après récolte. Nous utilisons, comme dans la norme ISO, le milieu DG18 (fig. 3) pour l'analyse de nos échantillons, mais avons conservé un milieu standard au Rose de Bengale (fig. 4) pour mettre en évidence des moisissures typiques au produit comme par exemple les *Aureobasidium pullulans*.

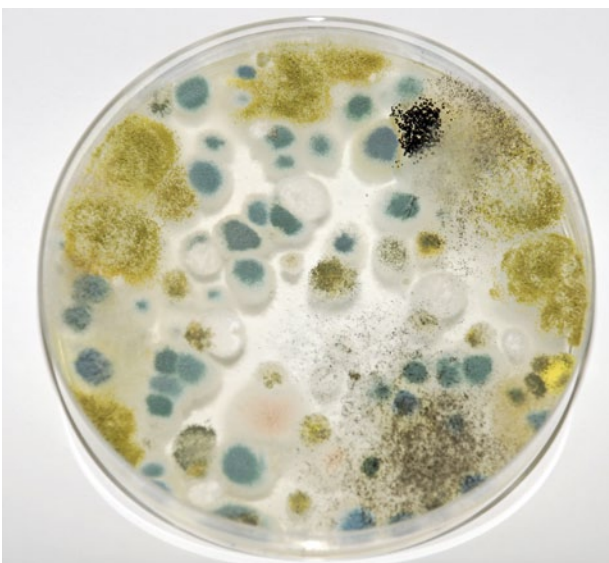


Figure 3 | Moisissures de l'altération sur agar DG18.
(Photo ALP-Haras)

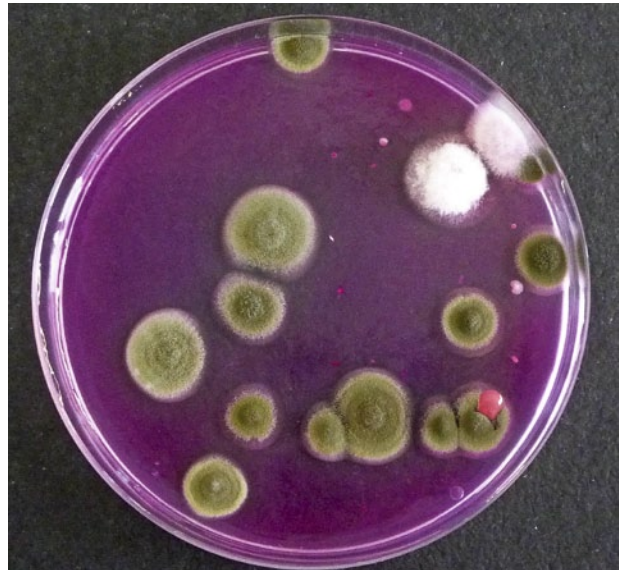


Figure 4 | Moisissures typiques du produit sur agar au Rose de Bengale; ce milieu permet aussi la croissance des levures.
(Photo ALP-Haras)

Le tableau 3 résume les principaux genres de micro-organismes rencontrés dans les aliments (selon VDLUFA, Méthode 28.1.3)

La flore primaire des produits d'origine végétale est caractérisée par des épiphytes et des saprophytes des plantes. On trouve parmi les bactéries aérobies mésophiles principalement des genres typiques du produit: *Erwinia* sp. (syn. *Rhanelia*) et *Enterobacter* sp. (syn. *Pantoea*), des *Pseudomonas* et des bactéries corynéformes. Lors du stockage se développent progressivement dans une dynamique des populations, des genres indiquant l'altération comme *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*. L'altération avancée est accompagnée par le groupe bactérien des sporo-actinomycètes (streptomycètes).

Les moisissures se succèdent également dans une dynamique: leur cortège commence par des espèces typiques du produit comme les Dématiées (*Acremonium*, *Verticillium*), *Fusarium*, *Aureobasidium*, qui disparaissent pendant le stockage en raison de la réduction de l'*aw*. Elles sont remplacées par des espèces du stockage, qui en cas de prolifération constituent la flore d'altération (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Wallemia*), des mucorales et des levures. Ces dernières peuvent être typiques du produit ou indicatrices de l'altération.

Discussion

Pour pratiquer cette méthode, la connaissance de ces groupes de micro-organismes indicateurs, mis en évidence par culture classique sur milieu gélosé, est néces- ➤

Tableau 3 | Classification de genres de micro-organismes indicateurs en groupes et leur signification (selon VDLUFA, Méthode 28.1.3)

Groupe	Signification	Groupe de micro-organismes	Indicateurs
Bactéries aérobies mésophiles	Typiques du produit (flore primaire)	1	Bactéries pigm. jaunes
			<i>Pseudomonas/Enterobacteriaceae</i>
	Indicatrices de l'altération	2	<i>Bacillus spp.</i>
<i>Staphylococcus/Micrococcus</i>			
Moisissures	Typiques du produit (flore primaire)	4	Streptomycetes
			Dématiacées (noires)
			<i>Verticillium spp.</i>
			<i>Acremonium spp.</i>
			<i>Fusarium spp.</i>
	Indicatrices de l'altération	5	<i>Aureobasidium spp.</i>
			Autres moisissures typiques
			<i>Aspergillus spp.</i>
			<i>Penicillium spp.</i>
			<i>Scopulariopsis spp.</i>
Indicatrices de l'altération	6	<i>Wallemia spp.</i>	
		Autres moisissures d'altération	
Levures	Typiques du produit ou indicatrices de l'altération	7	Mucorales
			Tous genres

saire. Cette connaissance provient de son application routinière et elle est renforcée par la coopération entre les laboratoires ayant choisi cette option. Pour le laboratoire de la Station fédérale de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras, cette coopération est assurée par des séances de travail régulières avec les collègues des LUFA allemandes, les congrès de EFMO, lors desquels des workshops sont consacrés aux différents types de micro-organismes, de même que du travail comparatif obtenu lors d'analyses en chaîne. La méthode est en cours de validation.

La plupart des demandes transmises au laboratoire d'Agroscope proviennent d'exploitations dans lesquelles des problèmes ou des dommages sont signalés. Il n'existe pas de méthode simple, reconnue et fiable pour expliquer un cas de dommage. Les investigations sont souvent secondaires ou tardives et l'aliment suspect peut avoir déjà été consommé. De plus, les symptômes observés manquent souvent de précision et le contexte de l'exploitation n'est connu que de manière fragmentaire. Pour participer à la clarification des causes de ces dérangements, à défaut d'avoir tous les éléments pouvant expliquer le dommage, ce qu'un spécialiste du terrain pourrait examiner, l'échantillon reçu doit être analysé. Son aspect, son odeur, éventuellement sa composition peuvent donner des renseignements valables. C'est ici que la connaissance de sa qualité microbiologique peut s'avérer utile.

Une autre catégorie de clients est constituée par les exploitants voulant vérifier que leurs animaux sont nourris avec des aliments irréprochables.

Le contrôle officiel des aliments pour animaux effectuée également de manière ponctuelle une évaluation de la qualité des aliments prélevés dans le cadre de son programme.

Conclusions

- Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras dispose à Posieux, dans son laboratoire de microbiologie, d'un outil bien rôdé dans le service offert aux détenteurs d'animaux, aux fabricants et importateurs d'aliments, aux vétérinaires et autres spécialistes intervenant dans la santé des animaux et dans leur alimentation.
- Les résultats des dénombrements obtenus sont expliqués au client dans le contexte des valeurs d'orientation, de la signification des micro-organismes présents, par le biais d'un commentaire détaillé.
- La méthode est régulièrement mise à l'épreuve au moyen d'analyses en chaîne.
- Un échange d'informations analytiques est disponible au niveau d'une organisation internationale (EFMO). ■

Riassunto ■ La qualità microbiologica degli alimenti per animali

La qualità di un alimento per animali non è definita solo dai diversi tenori in sostanze nutritive che contiene, né dalla composizione in materie prime o dalla sua digeribilità e appetibilità, dall'aspetto o dalle sue caratteristiche sensoriali, ma anche e soprattutto dal suo stato igienico.

Questo articolo presenta un metodo per valutare la qualità microbiologica degli alimenti animali la così come la sua attuazione in Europa, mettendo il baricentro sui paesi germanofoni. Egli analizza anche lo sviluppo delle popolazioni di microorganismi presenti nell'alimento, partendo dalla raccolta allo stoccaggio. In questo studio alcuni germi (indicatori) servono come riferimento. Per questi microorganismi che servono quali indicatori sono stati stabiliti valori di riferimento negli alimenti e nelle materie prime più utilizzate.

L'articolo presenta i risultati di un progetto di collaborazione che è stato avviato su iniziativa delle LUFA tedesche (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt) con partner in diversi paesi europei, tra cui la Svizzera.

Summary ■ The microbiological quality of feedstuffs

The quality of a feedstuff is not only defined by the various nutrient contents, or by its composition in terms of raw materials, or its digestibility or its palatability, nor even by its appearance or sensory characteristics, but also by its hygienic status.

This article presents a way of assessing the microbiological quality of feedstuff, as well as the history of how it became established in Europe, in particular in German-speaking countries. It describes the method used and the populations of micro-organisms present in the evolution of a feedstuff, from harvest to storage. Indicator micro-organisms act as a reference point in this assessment and orientation values were established for these indicator micro-organisms in the feedstuffs and raw materials which are used most.

The article presents the results of a joint project initiated by the German Agricultural Analytic and Research Institutes (LUFA) with partners in several European countries including Switzerland.

Key words: microbiological quality evaluation, feedstuffs, feed ingredients, aerobic mesophilic bacteria, mould, yeasts, counts, indicator micro-organisms, orientation values.

Bibliographie

- Wyllie T. D. & Morehouse L.G., 1978. Mycotoxin Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses - An Encyclopedic Handbook. Vol. 1, 2, et 3. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Schmidt H.-L. *et al.*, 1981. Keimgehaltbestimmung von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen in Futtermitteln. Nährböden und Methodik. *Landwirtschaftliche Forschung* 34 (4).
- Bucher E. *et al.* Orientierungswertschema zur Auswertung der Ergebnisse mikrobiologischer Untersuchungen zwecks Beurteilung von Futtermitteln nach § 7 Futtermittelgesetz. Publication interne de groupe de travail Futtermittelmikrobiologie der fachgruppe VI (Futtermittel) du VDLUFA (2002).
- Methode 28.1.1 Allgemeine Verfahrensanweisung zur Bestimmung von Keimgehalten mittels fester Nährmedien. VDLUFA Methodenbuch 2007.
- Methode 28.1.2 Bestimmung der Keimgehalte an Bakterien, Hefen, Schimmel- und Schwärzepilzen. VDLUFA Methodenbuch 2007.
- Methode 28.1.3 Verfahrensanweisung zur Identifizierung von Bakterien, Hefen, Schimmel- und Schwärzepilzen als produkttypische oder verderb-anzeigende Indikatorkeime. VDLUFA Methodenbuch 2007.
- Methode 28.1.4 Verfahrensanweisung zur mikrobiologischen Qualitätsbeurteilung. VDLUFA Methodenbuch 2007.
- ISO 21527–1:2008. Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et des moisissures viables présentes dans les produits destinés à la consommation par l'homme ou à l'alimentation des animaux, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95.
- ISO 21527–2:2008. Méthode horizontale de dénombrement des levures osmophiles et des moisissures xérophiles dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation des animaux dont l'activité de l'eau est inférieure ou égale à 0,95.
- Anonyme: Valeurs d'orientation sur le site internet d'Agroscope ALP-Haras (<http://www.agroscope.admin.ch/org/00274/01914/05275/index.html?lang=fr>).