

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE POUR L'OBTENTION DE DIPLOME D'INGENIEUR D'ETAT EN
SCIENCES DE LA MER
Option : AQUACULTURE

Sujet :

**Evaluation de la qualité microbiologique de filets
congelés du Panga (*Pangasius hypophthalmus*)**

Présenté par

BOUALILI Djouher

BOUKHLEF Hanane

Soutenu le 08 /07 /2013 devant le jury suivant :

D^r SEFIANE O.

Maître de conférences B (ENSSMAL)

Président

D^r BOUAZIZ A.

Maître de conférences A (Université d'Alger)

Examinateur

D^r ZOUAKH D.E.

Maître de conférences A (ENSSMAL)

Examinateur

D^r DJEGHRI HOCINE B.

Professeur (ENSSMAL)

Promotrice

Promotion : 2012-2013

Je dédie ce modeste travail :

✚ *A mes très, très chers parents,
pour m'avoir mis sur le banc de
l'école.*

✚ *A mon cher cousin Sherif et
sa femme Fadhila qui m'ont
toujours encouragé et aidé.*

✚ *A mes trois anges Sarah,
Ouali, Zyade que j'adore
beaucoup*

✚ *A tous les gens que j'aime.*

DJOU DJOU

Je dédie ce travail :

- ☉ *A ma très chère famille.*
- ☉ *A ma belle-famille.*
- ☉ *A mon mari pour sa patience.*
- ☉ *Surtout A Djoudjou et a
Amine qui sont toujours présent
pour moi.*
- ☉ *A mes amis*
et
- ☉ *A tous les aquatiques !!*

HANANE

REMERCIEMENTS

C'est un plaisir autant qu'un devoir d'exprimer nos gratitude à toutes les personnes ayant contribué, chacune à sa manière, pour le bon déroulement de notre formation, et la réalisation de ce modeste mémoire.

On tient à remercier madame DJEGHRI B. qui a encadré ce travail, pour sa présence continue, son aide, ses conseils et ses recommandations.

Nos remerciements s'adressent également à :

Monsieur SEFIANE O. qui a bien voulu présider ce jury. On est honoré de lui exprimer nos plus vifs remerciements.

Monsieur BOUAZIZ A. et Monsieur ZOUAKH D.E., qui ont bien voulu examiner ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de nos remerciements les plus sincères.

Nos remerciements vont également aux ingénieurs et aux techniciens de l'ENSSMAL en particulier M^{me} REFES N., Mr MATOUK Y., qui n'ont pas ménagé leurs efforts pour la bonne marche de la présente étude.

On tient par ailleurs à exprimer notre haute considération et sincères remerciements à l'ensemble des travailleurs de l'ENSSMAL en particulier Cherif.

On tient à exprimer nos vives gratitude à tous nos enseignants, depuis la première année fondamentale, jusqu'à la cinquième année universitaire.

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

AFNOR : Association Française de la Normalisation.

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire : aliment, environnement, travail.

A_w : activité de l'eau.

BRV : bouillon Rappaport Vassiliadis.

BSC : bouillon au sélénite et à la cystéine.

C. perfringens : *Clostridium perfringens*.

C.botulinum : *Clostridium botulinum*.

cm : centimètre.

E. coli : *Escherichia coli*.

EHEC : Enterohemorrhagic *E. coli* (*E. coli* entérohémorragique)

ENSSMAL : Ecole National Supérieure des sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral.

EPI : Eau peptonée exempte d'indole.

EPT : Eau peptonée tamponnée.

EPSA : Eau peptonée saline alcaline.

FAO: Food and Agriculture Organization of United Nations.

FMAT: Flore mésophile aérobie totale

g: gramme

Gram- : Gram négatif

Gram+: Gram positif

ISO: International Organization for Standardization

kg: kilogramme

ml: millilitre

mn: minute

NPP: Nombre le plus probable.

Ox : Oxydase.

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

PCA: Plate Count Agar.

pH: Le potentiel d'Hydrogène.

Sec: seconde

SS: Gélose Salmonella-Shigella.

TCBS: Gélose au Thiosulfate au Citrate, à la Bile et au Saccharose.

TDH: Thermostable Direct Hemolysin.

TRH: Tdh-Related Hemolysin.

UFC: Unité formant colonies.

VF: Gélose viande-foie.

V. paraheamolyticus: *Vibrio paraheamolyticus*

VBL: Bouillon lactosé bilié au vert brillant.

Liste des tableaux

Tableau 01 : La durée de conservation de certains produits de la mer	09
Tableau 02 : Caractéristiques de la Salmonellose	12
Tableau 03 : Caractéristiques de la listériose	13
Tableau 04 : Caractéristiques de la vibriose	14
Tableau 05 : Caractéristiques de l'intoxication causé par <i>C. perfringens</i> et <i>C. botulinum</i>	15
Tableau 06 : Caractéristiques de l'intoxication causé par <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Tableau 07 : Caractéristiques de l'intoxication causé par <i>E. coli</i>	18
Tableau 08 : Résultats de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale	43
Tableau 09 : Résultats de la recherche de <i>salmonella</i>	44
Tableau 10 : Résultats de recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	46
Tableau 11 : Résultats de la recherche et du dénombrement de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	47
Tableau12 : Résultats de la recherche et du dénombrement des anaérobies sulfite-reducteurs	48
Tableau 13 : Résultats de la recherche et du dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Tableau 14 : Résultats de la recherche et du dénombrement d' <i>Escherichia coli</i>	51
Tableau 15 : Résultats de la recherche et du dénombrement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Tableau 16 : Résultats de la recherche et du dénombrement de la flore fongique	53

Liste des figures :

Figure 01: <i>Pangasius hypophthalmus</i> .	04
Figure 02 : Action de la température sur la multiplication et la toxinogénèse des micro-organismes de contamination des denrées alimentaires.	07
Figure 03: Diagramme de fabrication de filet de poisson congelé.	10
Figure 04: Diagramme de cause à effet des contaminations des aliments.	13
Figure 05: Technique de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale.	27
Figure 06: Technique de la recherche de <i>Salmonella</i> .	29
Figure 07: Technique de la recherche de <i>Listeria monocytogenes</i> .	31
Figure 08 : Technique de la recherche et du dénombrement de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	32
Figure 09 : Technique de la recherche et du dénombrement des germes sulfite-réducteurs.	30
Figure 10 : Technique de la recherche et du dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> .	35
Figure 11a : Technique de la recherche et du dénombrement des coliformes et d' <i>E. coli</i> par la méthode NPP : Test présomptif.	37
Figure 11b : Technique de la recherche et du dénombrement des coliformes et d' <i>E. coli</i> : Test confirmatif.	38
Figure 12 : Technique de la recherche et du dénombrement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	39
Figure 13: Technique de la recherche et du dénombrement des levures et moisissures	40
Figure 14 : Résultat positif et négatif de la coagulase.	43
Figure 15 : Galerie API 20 ^E .	45
Figure 16 : Identification par galerie API 20 ^E .	49

SOMMAIRE



Introduction	01
Première partie: Synthèse bibliographique	
1. <i>Pangasius hypophthalmus</i>	04
1.1. Systématique	04
1.2. Caractéristiques biologiques du Panga	04
2. Congélation des poissons	05
2.1. Définitions	05
2.2. Action de la température sur les microorganismes	05
2.3. L'influence de la congélation sur les aliments	08
2.4. Les différentes étapes de la congélation de poisson	09
2.5. Qualité du poisson congelé	11
3. Microbiologie des poissons	12
3.1. Contamination endogène ou primaire	12
3.2. Contamination exogène ou secondaire	13
4. Présentation des germes recherchés	14
4.1. <i>Salmonella</i>	14
4.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	15
4.3. <i>Vibrio paraheamolyticus</i>	16
4.4. <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs	17
4.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
4.6. <i>Escherichia coli</i>	20
4.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
4.8. La flore fongique	22
Deuxième partie: Matériels et méthodes	
1. Cadre de l'étude	24
2. Echantillons	24
3. Préparation de la suspension mère et les dilutions	24
4. Dénombrement en milieu solide	25
5. Dénombrement en milieu liquide	26
6. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale	26
7. Recherche de <i>salmonella</i>	28
8. Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	30
9. Recherche et dénombrement de <i>Vibrio paraheamolyticus</i>	30
10. Recherche et dénombrement des anaérobies sulfitoréducteurs	33
11. Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
12. Recherche et dénombrement des coliformes et d' <i>Escherichia coli</i>	36
13. Recherche et dénombrement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
14. Recherche et dénombrement de la flore fongique	40
15. Techniques d'identification bactérienne	41
15.1. Technique de la coloration de Gram	41
15.2. Recherche de l'oxydase	41
15.3. Recherche de la catalase	42
15.4. Recherche de la coagulase	43

15.5. Test d'identification par la galerie API 20 ^E	44
--	----

Troisième partie : Résultats et discussion

1. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement de la flore mésophile aérobie totale	47
2. Résultats et discussion de la recherche de <i>Salmonella</i>	48
3. Résultats et discussion de la recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	50
4. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement de <i>Vibrio paraheamolyticus</i>	53
5. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement des anaérobies sulfite-réducteurs	54
6. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
7. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement d' <i>Escherichia coli</i>	59
8. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
9. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement de la flore fongique	58
Conclusion	61
Recommandations	55
Références bibliographiques	
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction :

Il y a quelques années la sardine était présente quotidiennement sur la table des familles algériennes notamment celles habitant les villes côtières. Cependant, elle est devenue un produit de luxe inaccessible pour les ménages modestes. Face à cette situation, les algériens se rabattent sur l'achat du poisson congelé car il est beaucoup moins cher.

Le poisson congelé commercialisé en Algérie est importé de différentes régions (Vietnam, France, Espagne, Maroc, Nouvelle-Zélande, Inde ...). Avant d'arriver sur la table du consommateur, le poisson est transporté et stocké pendant un temps parfois long. Pendant lequel le poisson n'est pas toujours protégé des contaminations, de l'exposition à des températures élevées et des effets desséchants de l'air.

Par ailleurs les commerçants méconnaissent toutes règles d'hygiène. Quand ils manipulent le poisson congelé, ils ne maintiennent pas un degré approprié d'hygiène corporelle et ne prennent pas toutes les précautions nécessaires pour éviter la contamination de ce produit sensible. Ces différents facteurs concourent à la contamination et à la prolifération d'une microflore pouvant héberger des microorganismes potentiellement pathogènes, exposant ainsi le consommateur aux intoxications alimentaires qui peuvent être mortelles.

Dans cette optique nous nous sommes intéressées à la qualité microbiologique de filets congelés de Panga, importés du Vietnam et vendu en Algérie comme filet de sol, en raison de leurs fortes consommations par les ménages modestes.

L'objectif général de notre étude est d'évaluer la qualité microbiologique du poisson congelé (filets de *pangasius hypophthalmus*) et la comparer aux normes Algériennes (JORA, 1998).

Les objectifs spécifiques sont :

- déterminer la flore mésophile aérobie totale (FMAT)),
- rechercher et dénombrer les salmonelles, *Listeria monocytogenes*, les bactéries anaérobies sulfite-réductrices, *Staphylocoques* présumés pathogènes, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et les levures et les moisissures.

PARTIE I :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Pangasius hypophthalmus*

Le *Pangasius* offre l'exemple d'une espèce dont la domestication récente (1995) a permis le développement tout à fait exceptionnel d'une filière de production, de transformation et d'exportation. La production est ainsi passée en 10 ans de 50 000 tonnes à 400 000 tonnes en 2006 dont le Vietnam est le principal pays producteur (LAZARD *et* CACOT, 2003).

1.1. Systématique :

Règne : Animalia

Embranchement : Chordata

Sous-embranchement : Vertebrata

Super classe : Ostreithyès

Classe : Actinopterygii

Sous-classe : Neopterygii

Infra-classe : Teleostei

Super- ordre : Ostariophysi

Ordre : Siluriformes

Famille : Pangasiidae

Genre : *Pangasius*

Espèce : *Pangasius hypophthalmus* (VALENCIENNES *et*
VALENCIENNES, 1840)

1.2. Caractéristiques biologiques du Panga :

Le *Pangasius hypophthalmus* est une espèce d'eau douce riveraine, benthopélagique, vit typiquement dans une gamme de pH qui varie entre 6.5 et 7.5 et à une température de 22-26 °C, majeure dans le fleuve de Mékong. Il s'agit d'une espèce détritivore/omnivore, elle possède un corps allongé, latéralement aplati sans écailles, une tête relativement petite, une bouche généralement avec des petites dents tranchantes sur la mâchoire, des yeux relativement grands, deux paires de barbillons, les supérieurs sont plus courts que les inférieurs et des nageoires sombres grises ou noirs. Les grands adultes sont uniformément gris mais quelque fois avec une teinte verdâtre et des côtés argentés. Ils peuvent atteindre une longueur totale standard maximale de 130 centimètres et pèsent jusqu'à 44 kg (FAO, 2006).



Figure 01: *Pangasius hypophthalmus*
(Source: Pham Van Khanh (FAO, 2006))

La plus part des poissons récoltés sont transférés et exportés comme filets surgelés (2.7-3.3 kg de poisson est exigé pour produire 1 kg de filet), les poissons entiers vivants sont vendus dans le marché local (FAO, 2006).

La composition moyenne des filets de *Pangasius hypophthalmus* est de 82% d'H₂O, 15.5% de protéines et 2% de lipides (FAO, 2006).

2. Congélation des poissons :

Le poisson est une denrée alimentaire très périssable. L'altération est à l'origine des pertes importantes de poisson après capture. Pour limiter ces pertes, les usines transformatrices ont recours aux différents procédés de conservation dont la conservation par le froid (congélation, surgélation).

2.1 Définitions:

L'abaissement de la température d'un produit permet de prolonger dans le temps sa conservation et de différer sa consommation. La conservation par le froid est divisée en deux groupes principaux :

- **La réfrigération** : Terme utilisé pour des températures de stockage basses mais supérieures à 0°C (froid positif). La réfrigération a pour effet de ralentir les réactions enzymatiques et chimiques, et par conséquent la multiplication et le métabolisme des micro-organismes, mais elle ne permet qu'une conservation relativement courte (quelques jours) (JEANTET *et al*, 2007).
- **La congélation** : Terme général désignant le changement d'état d'eau liquide en glace, et le maintien du produit à une température négative. La congélation combine donc les effets de la diminution de la température et celle de l'activité de l'eau (a_w), puisqu'une partie de l'eau est sous forme cristallisée. La combinaison de ces deux effets permet de conserver les aliments plusieurs mois à température négative (JEANTET *et al*, 2010).

- ✓ **La surgélation** : Elle ne se distingue de la congélation que par la rapidité de l'abaissement de température, qui permet d'obtenir très vite des températures inférieures aux températures de cristallisation du produit.

2.2 Action de la température sur les microorganismes :

Les microorganismes peuvent mourir progressivement lorsqu'ils sont placés à faible température. Cette mortalité reste cependant très marginale ; il est essentiel de garder à l'esprit que la stabilisation obtenue par congélation se fonde pour l'essentiel sur une inhibition des flores et non sur leur destruction. En conséquence, la qualité du produit final dépend de celle du produit avant congélation, de la vitesse du refroidissement de la congélation et du maintien du froid négatif au cours de son stockage à basse température, les microorganismes doivent être exposés à une température favorable pendant un temps suffisamment long avant de pouvoir recommencer à se reproduire et à se développer du fait du stress subi (JEANTET *et al*, 2010).

Les microorganismes psychrotrophes peuvent se multiplier de manière active aux températures de réfrigération couramment utilisées (6°C). Les microorganismes psychrophiles, peuvent continuer à se développer en dessous de -5°C, voire même jusqu'à des températures aussi basse que -10°C. La plupart des moisissures et des levures appartiennent au groupe des microorganismes psychrotrophes, et peuvent donc se développer aux températures habituelles de réfrigération. Les coliformes peuvent également se développer dans la température de 5 à 0°C. En revanche, la plupart des bactéries pathogènes sont dans l'incapacité de se reproduire en dessous de 5°C, et ont besoin de conditions de température supérieures ou égales à cette valeur pour être en mesure de produire leur toxine (figure 1) (ROSSET, 1976 *et* JEANTET *et al*, 2010).

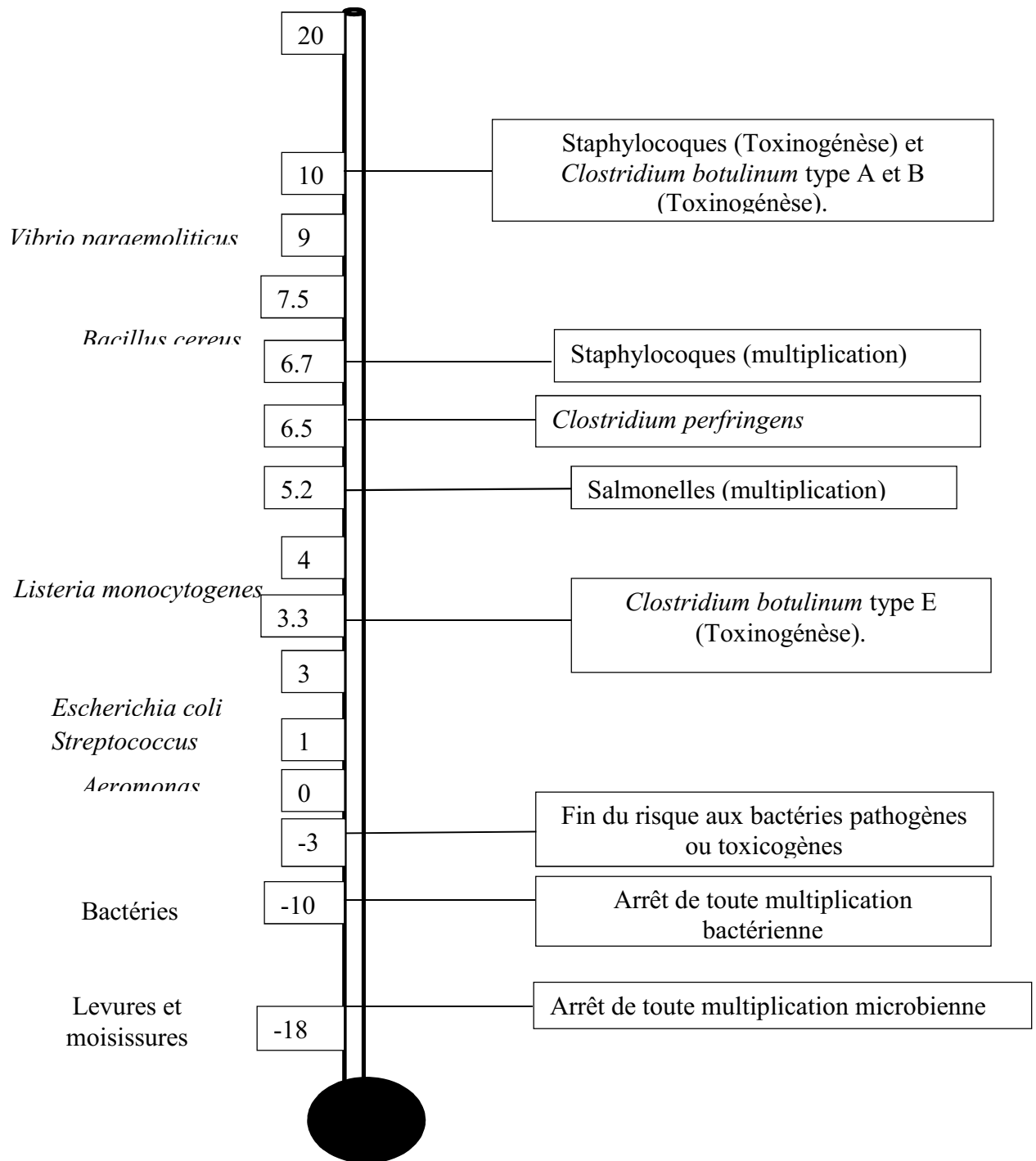


Figure 02 : Action de la température sur la multiplication et la toxinogénèse des micro-organismes de contamination des denrées alimentaire (NICCOLE *et* KNOCKAER, 1989 ; JEANTET *et al.* 2006)

2.3 L'influence de la congélation sur les aliments:

A. Action de la cristallisation de l'eau sur les aliments :

La transition de la phase eau-glace qui a lieu au cours du procédé de congélation a l'avantage de figer la structure du tissu, et d'isoler l'eau sous la forme de cristaux de glace. Selon la vitesse de la pénétration du froid dans la denrée alimentaire ces cristaux peuvent avoir des formes et des tailles différentes. En effet, si la congélation est lente, la cristallisation extracellulaire, qui accroît la concentration locale en solutés, provoque une déshydratation progressive des cellules par osmose. Ce transfert, qui peut avoir des effets irréversibles s'il dépasse un certain niveau, explique en grande partie la baisse de la turgescence, le décollement des tissus et l'exsudation d'eau que l'on observe lors de la décongélation de nombreux aliments ; il est la cause principale de l'amollissement des tissus. De gros cristaux de glace se forment et élargissent les espaces extracellulaires, tandis que les cellules plasmolysées diminuent considérablement de volume. Ces gros cristaux entraînent une compression mécanique tendant à écraser les cellules (NOUT *et al*, 2003).

Au contraire, lorsque la congélation est rapide, la cristallisation se produit simultanément dans les espaces extra et intracellulaires. Le déplacement d'eau est faible et un très grand nombre de petits cristaux est formé. L'altération de l'intégrité cellulaire et tissulaire est alors beaucoup moins marquée. En outre, les modifications de texture liées à la sortie d'eau des cellules par osmose sont nettement moindres que lors de la congélation lente. Lors de la décongélation, les produits congelés rapidement exsudent beaucoup moins que les produits congelés lentement. La durée de la congélation est donc une phase critique pour la qualité finale du produit qui sera d'autant meilleure que le palier sera court (JEANTET *et al*, 2007).

B. Action de la congélation sur le poisson:

✓ Poissons maigres :

C'est la structure des protéines musculaires des poissons maigres qui est affectée par le froid. Des réactions auraient lieu aussi entre les protéines cellulaires myofibrillaires et des acides gras libres dont la concentration s'accroît au cours de la congélation, du fait de l'action d'enzymes encore actives à l'état congelé.

Des réactions de condensation peuvent apparaître entre les produits d'oxydation des acides gras avec le formaldéhyde, résultant du clivage de l'oxyde de triméthylamine présent plus particulièrement dans certaines

espèces. Ces modifications structurales n'ont pas de conséquence au niveau nutritionnel (VIERLING, 2008).

✓ **Poissons gras :**

Du fait de la quantité et de la qualité des lipides des poissons gras, le rancissement est important au cours du stockage. Les produits d'oxydation des lipides peuvent donner des ponts covalents inter et intra-protéiques ou oxyder certains acides aminés, ce qui abaisse la valeur nutritionnelle de l'aliment : lysine, tryptophane ou acides aminés soufrés étant rendus indisponibles. On peut limiter le rancissement en entreposant les poissons à une température plus basse (- 25°C) et en mettant à l'abri de l'oxygène (VIERLING, 2008).

2.4 Les différentes étapes de la congélation de poisson :

Les étapes conduisant au poisson congelé sont décrites dans le diagramme ci-dessous (figure 03).

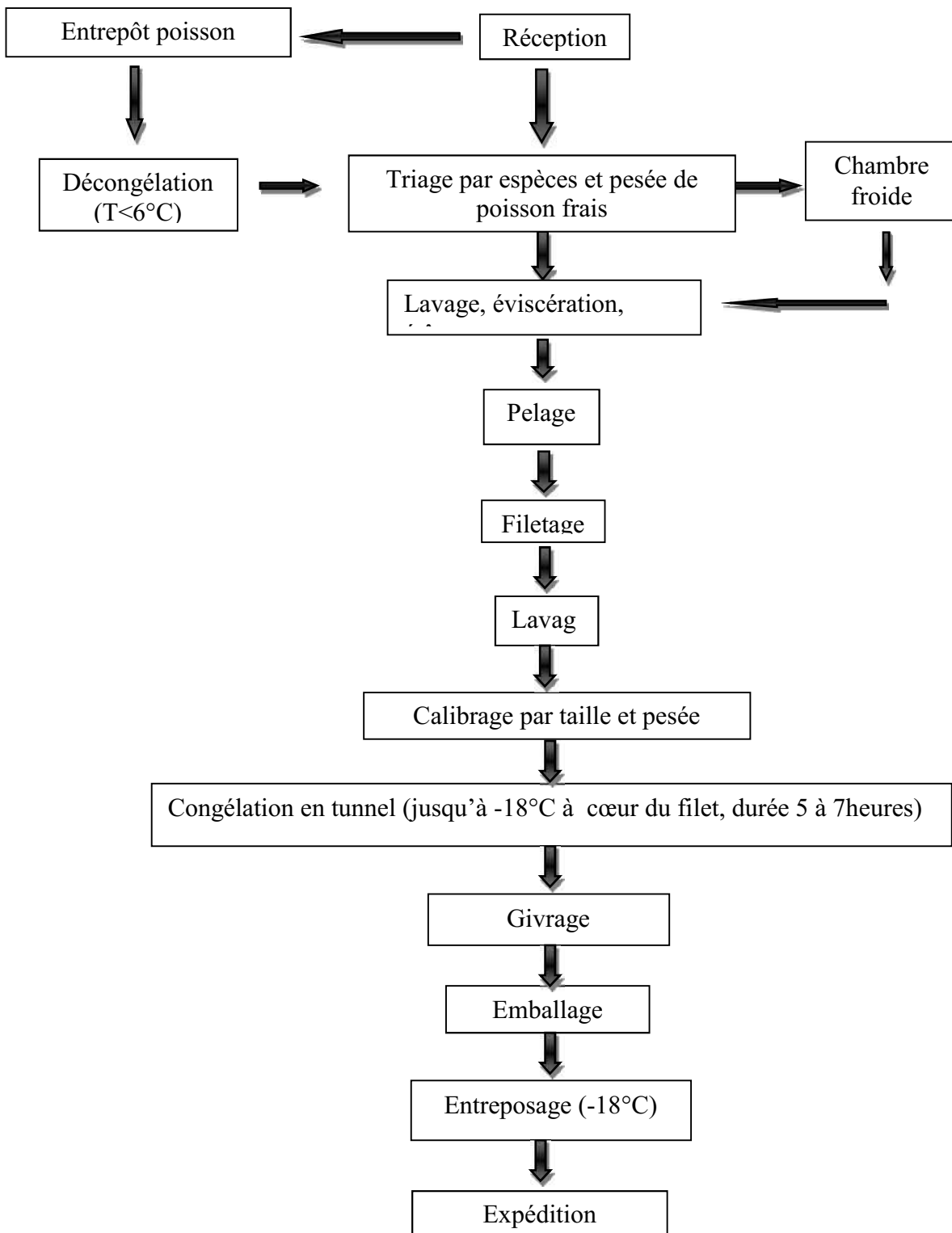


Figure 03: Diagramme de fabrication de filet de poisson congelé (COLAS *et* LEMESTE, 1990 *et* VIERLING, 2008)

2.5 Qualité du poisson congelé :

A. Qualité organoleptique :

De nos jours, le but de la congélation du poisson n'est plus seulement d'assurer sa conservation mais aussi de lui permettre de garder les propriétés du poisson frais et surtout sa valeur nutritionnelle, correspondant à l'évolution du goût des consommateurs ainsi que leur santé (FAO, 2008).

B. Qualité hygiénique :

Le poisson congelé doit offrir une sécurité ou une innocuité, c'est-à-dire l'absence de tout risque pour la santé du consommateur. Il ne doit pas renfermer en conséquence de microorganismes ni de substances chimiques dépassant des normes établies. La qualité hygiénique peut se distinguer en deux : La qualité chimique et la qualité microbiologique (ABOTCHI *et* SEYDI, 2010).

✓ Qualité chimique :

Elle est déterminée par la présence des substances chimiques que renferme la matière première (métaux lourds, micropolluants organiques...), par celles apportées par le processus de transformation (JEANTET *et al*, 2007).

✓ Qualité microbiologique :

La qualité microbiologique du poisson congelé selon VIERLING (2008) dépend en grande partie de la qualité microbiologique de la matière première (poissons frais) et de l'hygiène de la transformation.

2.6 La durée de congélation:

La durée de conservation des poissons congelés varie selon le type de poisson , elle est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 01 : La durée de conservation de certains produits de la mer
(ANONYME 1, 1972)

	Durée pratique de conservation en mois		
	-18°C	-25°C	-30°C
Poissons gras	4	8	12
Poissons maigres	8	18	24

3. Microbiologie des poissons :

Normalement, la chair du poisson est stérile. Les régions contaminées sont le mucus qui recouvre la peau, les branchies et le tube digestif (JOFFIN *et* JOFFIN 2010).

La contamination bactérienne de la chair ne survient qu'après la capture. Les sources de cette contamination sont diverses et peuvent être réparties en deux groupes (ABOTCHI *et* SEYDI, 2010).

- la contamination endogène,
- la contamination exogène.

3.1 Contamination endogène ou primaire :

Cette contamination a lieu du vivant de l'animal. Elle se fait via la respiration, l'alimentation et lors des déplacements. La composition et la quantité de cette flore bactérienne dépend de l'origine, de la température de l'eau, de l'alimentation etc. (DELARRAS, 2007).

Certains travaux ont montré une prédominance des bactéries à Gram-négatif dans la flore initiale de poissons issus des eaux tempérées (GRAM *et* DALGAARD, 2002) alors qu'une proportion élevée de coques à Gram-positif et de *Bacillus* sp est trouvée dans certains poissons provenant des mers chaudes et des eaux tropicales. Les bactéries d'origine endogène peuvent être subdivisées en 3 classes :

✓ Germes typiquement aquatiques :

Ils appartiennent généralement aux genres *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Halobacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Photobacterium*, (GUIRAUD, 2003).

✓ Germes d'origine tellurique :

Ce sont des bactéries sporulées en particulier les genres *Clostridium* *et* *Bacillus*. Leur dissémination dans les milieux aquatiques est assurée par les eaux de ruissellement et les eaux de pluie (GUIRAUD, 2003, ABOTCHI *et* SEYDI, 2010).

✓ Germes de contamination d'origine humaine et/ou animale :

Ces germes proviennent du tube digestif de l'homme et des animaux. Ils se retrouvent dans les milieux aquatiques à la faveur d'une pollution par les eaux usées mal ou non traitées (*Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, etc), (GUIRAUD, 2003).

3.2 Contamination exogène ou secondaire :

Après capture, le poisson est sujet à de nombreuses manipulations qui sont à l'origine de la contamination bactérienne (contamination par le personnel, le matériel et l'environnement) (figure 04). Selon HOBBS (1982) l'Homme constitue la source la plus importante des contaminations exogènes des denrées alimentaires d'origine animale (salmonelles, coliformes thermotolérants, *Staphylococcus aureus*, des bactéries anaérobies sulfito-réductrices, des levures et moisissures, la flore mésophile aérobie totale...).

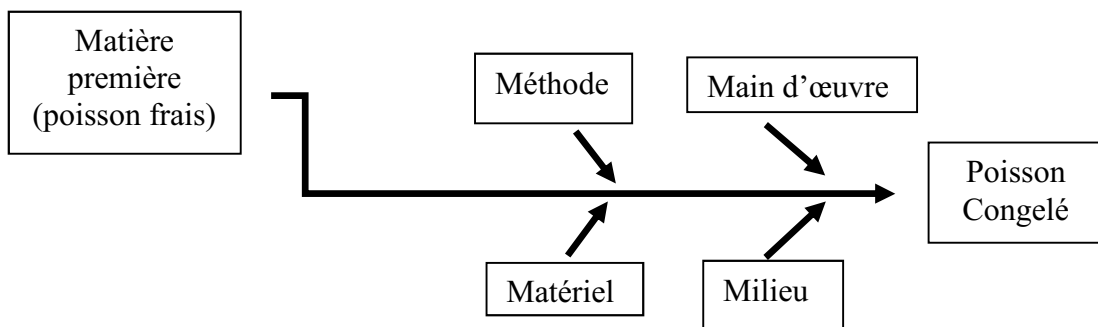


Figure 04: Diagramme de cause à effet des contaminations dans l'aliment (VIERLING, 2008)

4. Présentation des germes recherchés :

4.1 *Salmonella* :

La *Salmonella* est un type de bactérie particulièrement dangereuse et généralement le premier suspect lors d'une intoxication alimentaire. Sa présence dans l'aliment dénote d'un manque d'hygiène. C'est un bacille à coloration de Gram négatif appartient à la famille des Enterobacteriaceae, aéro-anaérobie ou anaérobie facultative, oxydase négatif et catalase positif (DELARRAS, 2007 et ANSES, 2010).

A. Réservoir :

Le réservoir principal de *Salmonella* est constitué par le tractus gastro-intestinal des mammifères et des oiseaux. Dans la majorité des cas, les animaux sont considérés comme des porteurs asymptomatiques. Cependant, certains d'entre eux peuvent, dans d'autres cas, exprimer des signes cliniques plus ou moins sévères. Certaines souches de *Salmonella* peuvent également être isolées d'autres sources, telles les animaux à sang froid (tortues de compagnie) et les animaux aquatiques (mollusques, poissons) (ANSES, 2011).

B. Mode de transmission :

L'aliment en lui-même, principalement les viandes, les œufs et les ovoproduits, ainsi que les fruits de mer crus ou insuffisamment cuits, est responsable de la transmission (ANSES, 2011).

C. Dose infectante :

Des études expérimentales font état de la nécessité d'ingérer des quantités atteignant 10^5 à 10^7 bactéries afin d'initier une infection ; cependant des données obtenues lors d'enquêtes consécutives au déclenchement de toxi-infections alimentaires, indiquent que les infections peuvent se déclarer entre 10^1 et 10^{11} cellules. Il a également été noté que cette dose infectante est plus basse lorsque les Salmonelles sont apportées dans des aliments à haute teneur en matière grasse ou en protéines (ANSES, 2011).

D. Caractéristiques de l'intoxication : Le tableau 02 présente les principaux caractères de la salmonellose.

Tableau 02 : Caractéristiques de la salmonellose (ANSES, 2011) :

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes	Durée des symptômes	Durée de la période contagieuse
Salmonelloses non –typhiques				
6 – 72 heures le plus souvent de 12 – 36 heures	Cosmopolite, toute classe d'âges	<ul style="list-style-type: none"> •Nausées, •vomissements, •Douleurs abdominales •Diarrhées •Maux de tête •Frissons •Fièvre à 39 - 40°C 	5 – 7 jours	plusieurs jours à plusieurs semaines. Parfois plusieurs mois : 1% des patients adultes et 5% des enfants de moins de 5 ans peuvent rester excréteurs pendant moins de 12 mois
Fièvres typhoïdes				
3 jours – 1mois Le plus souvent de 8 – 14 jours	Cosmopolite, toutes classes d'âge	<ul style="list-style-type: none"> •Fièvre prolongée •Céphalées intenses •Anorexie •Constipation le plus souvent ou diarrhées •insomnie nocturne, 	/	Pendant toute la durée des symptômes et plusieurs semaines après. 10% des patients restent excréteurs pendant 3 mois après le début des symptômes. 2 à 5 % deviennent des porteurs chroniques

4.2 *Listeria monocytogenes* :

C'est un petit bacille à Gram positif, mobile, non sporulé, aéro-anaérobie facultatif, supporte des températures entre – 2° C et + 45° C (DELARRAS, 2007).

Listeria monocytogenes est responsable d'une maladie touchant l'Homme et les animaux appelée la listériose (ANSES, 2009). Sa capacité de croître à températures basses augmente le risque de contamination des aliments et la transmission de ce pathogène à l'homme (TANG *et al*, 2013). Les infections à *L. monocytogenes* sont sérieuses mais heureusement « rares » (ANSES, 2011).

A. Réservoir :

L. monocytogenes est une bactérie ubiquiste, tellurique, très largement répandue dans l'environnement, et résistante dans le milieu extérieur (sol, lacs, rivières, eaux d'égouts ou de baies, etc.) (ANSES, 2009).

B. Relations dose-effet et dose-réponse :

Les relations de type exponentiel proposées en 2004 par l'Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS), prévoient une listériose sévère chez 1 % des consommateurs après ingestion d'une dose médiane de 4.10^{11} cellules pour la population générale et de 10^{10} cellules pour la population sensible (ANSES, 2011).

Caractéristiques de l'intoxication :

Le tableau 03 regroupe les principaux symptômes de la listériose. La durée des symptômes est de plusieurs jours alors que la durée de la période d'excrétion est inconnue.

Tableau 03 : Caractéristiques de la listeriose (ANSES, 2011) :

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes
Toutes formes confondues : 2 à 88j, médiane 17j Formes materno-néonatales : 14 à 88 j, médiane : 28j Formes neuro-méningées : 2 à 19j, médiane : 10j	Toute la population, toutes classes d'âge confondues Préférentiellement chez les sujets dont le système immunitaire est perturbé	<ul style="list-style-type: none">• Septicémies• Méningites, méningo-encéphalites, rhomboencéphalites, abcès cérébrale• Infections locales
	Femme enceinte	<ul style="list-style-type: none">• Syndrome pseudo-grippal (fièvre, frissons, lombalgies)• Avortement spontané• Mort in utero, prématurité• Infection néonatale

4.3 *Vibrio parahaemolyticus* :

V. parahaemolyticus est l'un des principaux agents pathogènes associés aux toxi-infections alimentaires. Le pouvoir pathogène de cette bactérie est lié à la présence des deux hémolysines la TDH (Thermostable Direct Hemolysin) et la TRH (Tdh-Related Hemolysin) (AFSSA, 2009).

C'est une bactérie qui appartient au genre *Vibrio* et à la famille des Vibrionaceae, bâtonnet à Gram-, recourbé en virgule, de 0,5 à 1µm de diamètre, non sporulé, mobile, aéro-anaérobie facultative et présente une réaction à l'oxydase positive et une catalase positive (BERAUD,

2004). Elle est halophile, sa température optimale de croissance est proche de 37°C (GUIRAUD, 2003).

A. Réservoir :

V. parahaemolyticus se trouve particulièrement dans les estuaires et les eaux côtières du monde entier, les poissons, les crustacés et les mollusques bivalves et les huitres (ANSES, 2008).

B. Aliments impliqués:

Dans la majorité des cas de gastro-entérites, la consommation de produits de la mer est mise en évidence (coquillages, crustacés et plus rarement, les poissons) (ANSES, 2008).

C. Conditions conduisant à la contamination des produits:

Les sources de contaminations des produits sont : le milieu naturel, le transfert de contamination lors de la manipulation, la contamination par le rinçage à l'eau de mer contaminée et la rupture de la chaîne du froid (ANSES, 2008).

D. Dose infectante:

Selon Guiraud (2003) la dose infectante pour *V. parahaemolyticus* est de 10^4 à 10^6 germes par gramme.

E. Caractéristiques de l'intoxication :

Le tableau 04 représente les principaux symptômes de l'intoxication causée par *V. parahaemolyticus* :

Tableau 04 : Caractéristiques de la vibriose (ANSES, 2011):

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes
12 à 24 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé, mais elle peut varier entre 4 et 96 heures.	<ul style="list-style-type: none">• Toute personne consommant des produits de la mer crus ou mal cuits.• Sujets immunodéprimés	<ul style="list-style-type: none">• Douleurs abdominales,• Crampes,• Diarrhées aqueuses ;• Nausées, vomissements• Fièvre

4.4 Clostridium Sulfito-réducteurs :

Les *Clostridium* correspondent à la famille des Clostridiaceae. Ce sont des bâtonnets souvent de grande taille, isolés ou en chaînettes. Ils sont catalase-, anaérobies strictes, mésophiles ou Thermophiles et acceptent des variations assez importantes de pH et de température. Ils sont Gram+, généralement mobiles, sporulés dans les conditions défavorables

(DELARRAS, 2007). La spore présente une grande résistance aux facteurs physicochimiques (thermorésistance) (GUIRAUD, 2003).

A. Réservoir, habitat :

Les *Clostridium* sont des bactéries très ubiquitaire largement répandue dans tout l'environnement (sol, sédiments, eaux d'égout, lisiers, cadavres, poussières, surface des végétaux, etc.) (GUIRAUD, 1998).

B. Voies de transmission (AFSSA, 2010) :

✓ *C. perfringens* :

La bactérie est transmise à l'Homme par l'ingestion des aliments contaminés. Il n'y a pas de transmission directe documentée entre l'animal malade et l'Homme, ni entre l'Homme malade et l'Homme sain.

✓ *C. botulinum* :

La maladie n'est pas transmissible entre individus, mais résulte le plus souvent d'ingestion d'un aliment contaminé. Trois formes de botulisme peuvent être distinguées selon le mode de contamination :

- **l'intoxication botulique** est due à l'ingestion de toxine botulique préformée dans un aliment.
- **la toxi-infection botulique** causée par l'ingestion de bactéries et/ou spores de *C. botulinum*.
- **le botulisme par blessure** est causé par l'inoculation des spores de *C. botulinum* dans une plaie.

C. Conditions conduisant à la contamination des produits :

Les produits alimentaires, notamment ceux d'origine animale, peuvent être contaminés soit lors de la phase d'éviscération à l'abattoir, soit à partir de l'environnement souillé (plan de travail, contact avec aliments souillés, poussières, etc.) (ANSES, 2010).

D. Dose infectante:

La toxine botulique est à ce jour considérée comme le poison le plus puissant qui existe. La toxine botulique A est la plus active. La dose létale chez un homme adulte est estimée à 100ng – 1µg par voie parentérale et 70µg par voie orale (1µg par kg) (AFSSA, 2011).

On ce qui concerne *C. Perfringens* une charge microbienne au moins égale à 10^8 germes par gramme est nécessaire pour déclencher la toxi-infection (GUIRAUD, 2003).

E. Caractère de la maladie : le tableau 05 regroupe les principaux symptômes causé par *C. perfringens* et *C. botulinum*.

Tableau 05 : Caractères de l'intoxication causé par *C. perfringens* et *C. botulinum* (AFSSA, 2011) :

	Durée moyenne d'incubation	Population cibles	Principaux symptômes	Durée des symptômes	Durée de la période contagieuse
<i>C. perfringens</i>	6 – 24h (généralement 10 – 12h)	Toute classe d'âge	<ul style="list-style-type: none"> • Diarrhée • Violents maux de ventre • Nausées (parfois) • Vomissements (rare) • Fièvre (rare) 	1- 3 jours	La phase de portage de <i>C.perfringens</i> dans le tube digestif peut être longue, mais il ne s'agit pas d'une phase contagieuse, car il n'ya pas de transmission directe à un individu sain
<i>C. botulinum</i>	1 – 10 jours le plus souvent 1-3 jours		<ul style="list-style-type: none"> • Troubles digestifs (vomissements, diarrhée) observés en début d'évolution (environ 30-50%) • Constipation fréquente en fin d'évolution (20-70%) • Paralysie des muscles de l'accommodation : vision floue, diplopie, mydriase (70-100%) • Paralysie au niveau buccal : sécheresse de la bouche, difficultés déglutition et d'élocution (80-100%) 	Quelques jours à 8 mois	

4.5 *Staphylococcus aureus* :

S. aureus est un coque à coloration de Gram positive, non sporulé, immobile, aéro-anaérobie facultatif, possède une catalase et une coagulase (BERAUD, 2004). Il produit de nombreuses toxines qui peuvent déclencher les symptômes de l'intoxication et elle peut aussi causer des infections, parfois mortelles (panaris, etc.) (BOURGEOIS, 1996).

A. Habitat :

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires présentes sur la peau, les muqueuses et la sphère rhinopharyngée chez les animaux à sang chaud (mammifères, oiseaux)

Première partie : Synthèse bibliographique

et en particulier chez l'Homme. Ces bactéries sont également isolées de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière, air), de l'environnement domestique de l'Homme (cuisine, réfrigérateur) (ANSES, 2011).

B. Voies de transmission:

La contamination de l'aliment est le plus souvent d'origine humaine, elle peut avoir lieu par contact direct ou indirect (squames contaminées, gouttelettes issues des voies respiratoires contenant le micro-organisme) et elle peut aussi être d'origine animale (ANSES, 2011).

C. Dose infectieuse :

Le nombre de germes nécessaires pour qu'il y ait danger d'intoxication est de l'ordre de 10^5 à 10^6 germes par g. La quantité de toxine dangereuse pour l'homme varie de 0,1 à 10 μg / kg de poids corporel (GUIRAUD, 2003).

D. Caractéristiques de l'intoxication : le tableau 06 suivant représente les principaux symptômes de l'intoxication causée par *S. aureus*

Tableau 06: Caractéristiques de l'intoxication causé par *Staphylococcus aureus* (ANSES, 2011) :

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes	Durée des symptômes	Durée de la période contagieuse
30 min – 8 h (3h en moyenne)	Toute la population, toutes classes d'âge confondues	<ul style="list-style-type: none">• Nausées suivies de vomissements caractéristiques.• Douleurs abdominales.• Diarrhées.• Vertiges.• Frissons.• Faiblesse générale parfois accompagnée d'une fièvre modérée.• Cas les plus sévères : maux de tête, prostration, hypotension...	18 – 24h Les diarrhées et la faiblesse générale peuvent durer 24 heures de plus.	Entérotoxines non transmissibles de personne à personne. Aucune contagiosité.

4.6 *Escherichia coli* :

C'est un bacille à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, aéro-anaérobie facultatif, oxydase⁻, catalase⁺ mesurant de 2 à 4 μm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 μm (DELARRAS, 2007 et RODIER, 2009). *Escherichia coli* est une bactérie commensale de la microflore bactérienne normale du tube digestif de l'Homme et

de la plupart des animaux à sang chaud, c'est un germe indicateur de la contamination fécale dans les eaux et les aliments (DELARRAS, 2007).

Certaines souches d'*E. coli* sont pathogènes (*Escherichia coli* O157 : H7) car elles ont acquis des facteurs de virulence. Elles sont regroupées en pathovars (ou pathotypes) parmi lesquels les *E. coli* entérohémorragiques ou EHEC (enterohémorragic *E. coli*).

Les EHEC libèrent des toxines, les shigatoxines (encore appelées vérotoxines), qui induisent des lésions de l'endothélium vasculaire, principalement intestinal, rénal et cérébral (ANSES 2010).

A. Voies de transmission :

La principale voie de transmission est indirecte par consommation d'aliments d'origine animale ou végétale et d'eau de boisson contaminés par un environnement souillé le plus souvent par les matières fécales d'animaux infectés (AFSSA, 2008).

B. Caractéristique de la maladie : le tableau 07 présente les principaux symptômes causés par *E. coli*.

Tableau 07 : Caractéristiques d'intoxication causé par *E. coli* (AFSSA, 2008) :

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Durée moyenne d'incubation	Principaux symptômes	Durée de la période contagieux
3-4 jours (Variable de 2 à 12 jours)	Toute la population	5 à 12 jours	<ul style="list-style-type: none">• Diarrhée banale ou, colite hémorragique :• Crampes abdominales et diarrhée initialement aqueuse puis sanglante	Une semaine au moins chez les adulte, mais peut être supérieure chez l'enfant

4.7 Pseudomonas aeruginosa:

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires que l'on rencontre dans les sols, sur les végétaux et surtout dans les eaux douces et marines (DELARRAS, 2007). De nombreuses souches pouvant se développer à basse température (souches psychrophiles) contaminent les denrées alimentaires ou produits pharmaceutiques conservés au réfrigérateur (ANSES, 2010).

Pseudomonas aeruginosa est la plus étudiée car c'est une bactérie commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, mais aussi pathogène pour eux (DELARRAS, 2007). *P. aeruginosa*, est un bacille droit fin à Gram⁻, très mobiles grâce à une ciliature polaire, ne présentant pas de spore ni de capsule, possède une oxydase et une catalase, utilise en général les glucides par voie oxydatives, dégrade la caséine, produit des pigments. Elle se multiplie à 28°C (température maximale 43°C) et pour des valeurs de pH varie entre 6.5 à 8 (FAURO *et al*, 2008).

Maladie causée par *P. aeruginosa* :

P. aeruginosa est l'agent de gastro-entérites (vomissements, diarrhées, crampes abdominales), elle possède au moins six toxines (entérotoxines, exotoxines A, exoenzymes S, hémolysine, leucocidine et glycolipoprotéine (GUIRAUD, 2003).

A. Dose infectante :

Selon FAURO *et al* (2008) la dose infectante chez l'homme est de l'ordre 10¹⁰ UFC.

4.8 La flore fongique:

La flore fongique correspond aux champignons comprenant, en particulier, les levures et les moisissures. Ces champignons sont capables de se développer en milieu acide et au froid (il faut atteindre -18°C pour arrêter leur croissance). En générale, leurs croissances est moins rapide que celle des bactéries. Leur dénombrement peut être important en raison, d'une part de la capacité de certains champignons de produire des aflatoxines dangereuses pour les consommateurs, d'autre part de rendre peu attirant l'aliment, ou l'altérer (JOFFIN et JOFFIN, 2010).

PARTIE II :
MATERIEL ET
METHODES

1. Cadre de l'étude :

Cette étude s'est déroulée du 11 avril au 06 juin 2013 au niveau de laboratoire de microbiologie de l'ENSSMAL.

2. Echantillons :

Notre étude a porté sur trois échantillons de filets congelés de Panga. Ces derniers ont été achetés dans des différents points de vente chez les détaillants commercialisant les produits congelés (viandes, légumes et poissons). Le premier acheté à Dely Brahim, il pèse 1000g, le deuxième acheté à El-Biar, il pèse 500g alors que le troisième a été acheté à Cheragua et il a un poids de 500g.

Les échantillons sont transportés au laboratoire dans des sachets de stockage et à température ambiante.

La décongélation se fait lentement à 4°C au réfrigérateur.

3. Préparation de la suspension mère et les dilutions :

- faire sortir les filets de Panga dans leur emballage aseptiquement devant un bec bunsen et les poser sur un plateau stérile,
- prélever et peser 25 g de la chair après décongélation à l'aide d'un scalpel et une pince stérile (la pesé se fait avec une balance (OHAUS®) de précision 0.01g),
- broyer la chair à l'aide d'un robot mixeur (WARING Commercial®) stérile en ajoutant le diluant choisi jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène ainsi on obtient la suspension mère ou la dilution 10^{-1} (BARTHE *et al*, 2007).

a) Préparation des dilutions :

- prendre 3 tubes stériles numérotés de 1 à 3 contenant chacun 9 ml de diluant approprié,
- prélever 1ml de la suspension mère à l'aide d'une micropipette et l'introduire dans 9 ml de diluant (tube N°1) et agiter vigoureusement à l'aide d'un vortex, on obtient la dilution 10^{-2} ,
- on opère de la même manière jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-4} (BARTHE *et al*, 2007).

b) Choix de diluant :

Le choix du diluant est fonction du produit à analyser et le type de microorganisme à rechercher (JOFFIN *et* JOFFIN, 2010) :

Le bouillon au sélénite et à la cystine (BSC) a servi de diluant pour les salmonelles, l'eau peptonée alcaline salée pour les vibrions. Alors que, l'eau peptonée tamponnée a été utilisée pour le reste des micro-organismes.

4. Dénombrement en milieu solide :

Les dénombrements en milieux solides ont été réalisés selon les recommandations de JOFFIN *et* JOFFIN, 2010.

A. Technique de dénombrement en profondeur (dans la masse) :

- liquéfier le milieu gélosé et le ramener en surfusion (45°C),
- prélever 1 ml de la dilution et l'introduire dans des boites de Pétri en déposant des gouttes au fond de la boite (on commence par la plus grande dilution, afin d'utiliser qu'une seule pipette sans introduire des erreurs),
- couler aseptiquement le milieu gélosé maintenu en surfusion et homogénéiser en imprimant à la boite des mouvements circulaires (en 8),
- après la solidification du milieu gélosé, étuver pour une durée et une température précises.

B. Technique de dénombrement en surface :

- couler le milieu adéquat dans des boites de Pétri stériles et laisser solidifier,
- prélever 0.1 ml de dilution la plus grande et la déposer en surface du milieu,
- poursuivre ainsi pour toutes les dilutions, toujours stérilement,
- étaler à l'aide d'une pipette râteau ou à l'aide d'un étaleur stérile,
- étuver pour une température et une durée précise.

C. Lecture :

$$N = \frac{C}{V \cdot (n_1 + 0,1n_2)} \cdot \frac{1}{d} \cdot f$$

$\sum C$ = somme des colonies des boites comptées

V = volume de l'inoculum

n_1 = nombre de boites comptées à la plus faible dilution.

n_2 = nombre de boites comptées à la plus forte dilution.

d = dilution correspondante à la plus faible

f = fraction de colonies identifiées (en général 1).

5. Dénombrement en milieu liquide :

A. La méthode du nombre le plus probable (NPP) :

- effectuer une série de dilutions décimales à partir de la suspension mère,
- ensemercer trois tubes contenant 9ml de milieu de culture par 1 ml de la suspension mère et chaque dilution,
- après culture et incubation, procéder à la lecture des résultats en comptant positifs les tubes qui présentent une activité biologique (virage d'indicateur coloré, dégagement de gaz,...) et négatifs les autres (GUIRAUD *et* ROSEC, 2004).

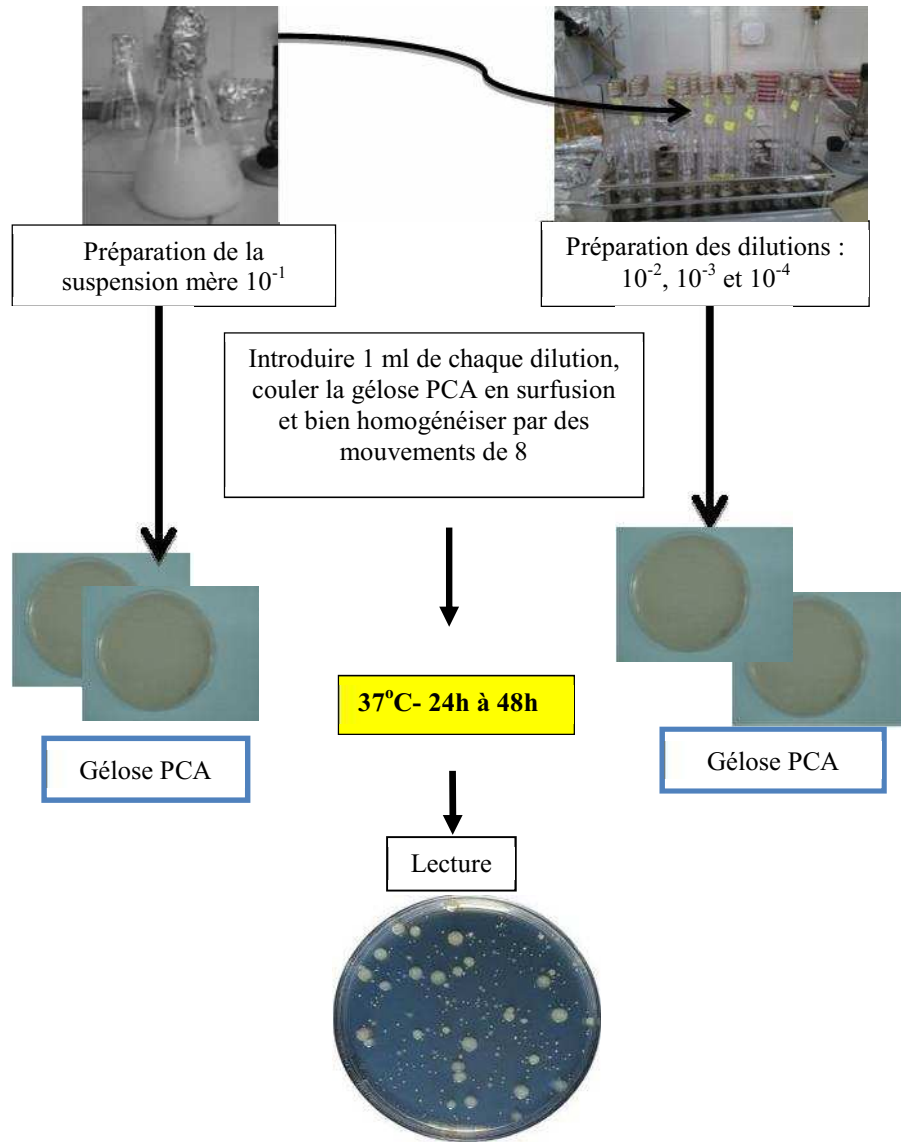
6. Dénombrement de la flore mésophile totale suivant la norme ISO 4833 ; février 2003 (figure 05).

A. Mode opératoire:

On prélève 1 ml de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) qu'on introduit aseptiquement dans les boîtes de Pétri. On y ajoute 15 ml de milieu PCA (Plate Count Agar) en surfusion. Le mélange est homogénéisé par des mouvements circulaires des boîtes. Elles sont ensuite incubées à 37°C. Le comptage se fait après 72 heures d'incubation.

B. Lecture :

On dénombre les colonies dans les boîtes qui contiennent au moins 30 et au plus 300 colonies.



www.geniebio.ac-aix-marseille.fr (18/06/2013)

Figure 05: Technique de dénombrement de la flore mésophile totale (Norme ISO 4833 ; février 2003).

7. Recherche de *Salmonella* :

La recherche de *salmonella* a été effectuée selon les recommandations de JOFFIN et JOFFIN, 2010 (figure 06).

A. Mode opératoire:

Pré enrichissement :

- peser 25g de la chair et ajouter 225ml de bouillon au sélénite et à la cystéine,
- broyer le contenu à l'aide d'un robot mixeur stérile pendant 2 min et le verser aseptiquement dans un flacon stérile, puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

Enrichissement :

- nous avons utilisé deux milieux pour l'enrichissement sélectifs: bouillon au sélénite et à la cystéine (BSC) et le bouillon Rappaport-Vassiliadis (BRV),
- transférer 0,1 ml de bouillon de pré-enrichissement dans un tube contenant 10 ml de BRV, incubé à 44°C pendant 24h,
- transférer 1ml de bouillon de pré enrichissement dans un tube contenant 10 ml de BSC, incubé à 37°C ±1°C pendant 24h.

Ensemencement :

- les cultures sur BSC et BRV sont repiquées sur la gélose Hektoen et sur la gélose SS,
- l'ensemencement du milieu est effectué par stries, incubé à 37°C pendant 24 heures.

B. Lecture :

Les colonies de *Salmonella* présumées apparaissent vertes ou bleues avec ou sans centre noir sur gélose Hektoen et transparentes avec ou sans centre noir sur gélose SS (ANONYME 2, 2010). La coloration noire est due à la formation de H₂S.

C. Identification ;

3 colonies caractéristiques et distinctes font l'objet d'une identification morphologique et biochimique qui se déroule comme suit :

-aspect des colonies sur milieu sélectif.

Troisième partie : Résultat et discussions

-coloration de Gram (Bacille Gram-).

-test d'oxydase (oxydase-).

-test de la catalase (catalase+).

-galerie API 20^E.

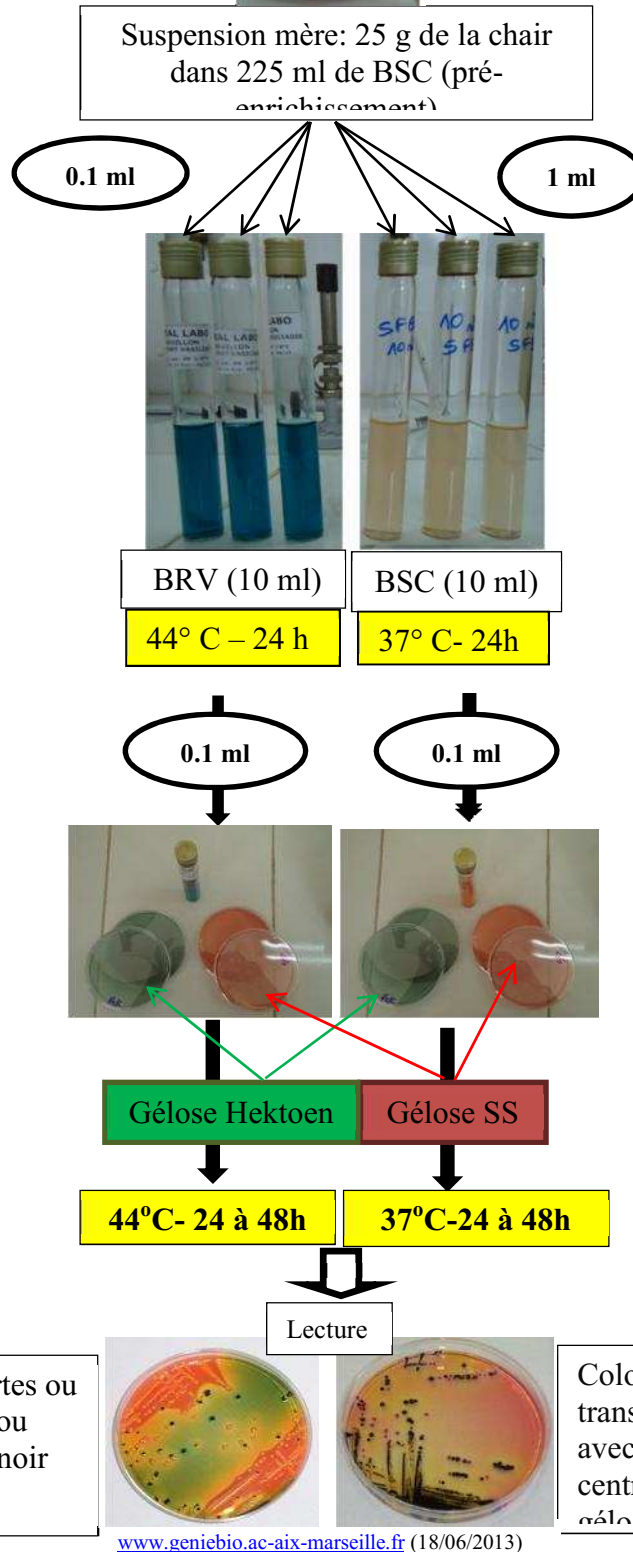


Figure 06: Technique de la recherche de *Salmonella* (JOFFIN et JOFFIN, 2010)

8. Recherche de *Listeria monocytogenes* (GUIRAUD et ROSEC, 2004) :

Mode opératoire: (figure 07) :

Préparer une suspension mère dans l'eau peptonée tamponnée en réalisant une dilution au 1/10, la laisser reposer à 20°C ± 2°C pendant 1h ± 5 min pour la revivification des bactéries stressées. Réaliser les dilutions nécessaires et étaler 0.1 ml de la suspension mère et les dilutions sur la gélose Columbia (ou gélose au sang) additionnée de 5% de sang humain frais, incuber à 37°C pendant 24-48h.

B. Lecture :

Les *Listeria* donnent des Colonies bleu- gris, β-hémolytiques sur gélose Columbia au sang (ou sur gélose au sang). La β-hémolyse se traduit par une zone claire facilement visible entourant les colonies. Cet éclaircissement est dû à la capacité des bactéries à détruire complètement les globules rouges (ANONYME 2, 1987).

C. Confirmation :

Confirmer l'identité de 5 colonies suspectes par :

- Isolement des colonies sur gélose Columbia au sang ou gélose au sang.
- Coloration de Gram (Gram +).
- Test de la catalase (catalase+).
- Test de l'oxydase (oxydase-).

9. Recherche et dénombrement de *Vibrio parahaemolyticus* (Norme XP ISO/TS 21872-1) (Figure 08).

A. Mode opératoire :

Préparer la suspension mère dans une eau peptonée salée alcaline (EPSA) à 30g de Na Cl par litre et pH 8.8 en réalisant une dilution au 1/10. Incuber durant 6h à 37°C. Ensemencer une nouvelle EPSA avec 1 ml de la suspension précédente et l'incuber 18h à 44°C puis isolé sur milieu au Thiosulfate, au Citrate, à la Bile et au Saccharose (TCBS).

B. Lecture :

Les colonies suspectes sont incolores à centre vert.

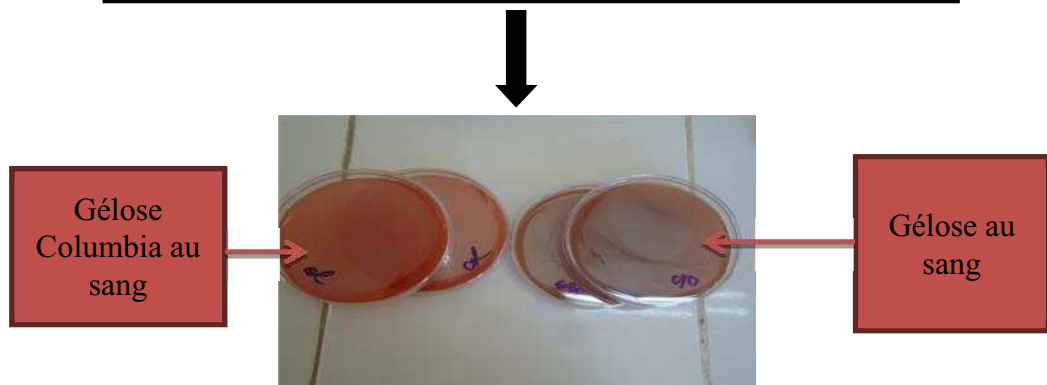
C. Confirmation :

- coloration de Gram (Gram-),
- test de la catalase (catalase+),
- test d'oxydase (oxydase+).



Préparation de la suspension mère (25 g de la chair dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée) et les dilutions décimales.

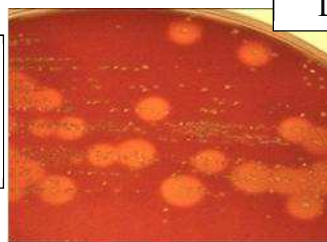
Laisser revivifier pendant 1h à température ambiante



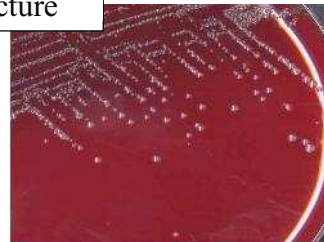
37° C – 24h à 48h

Lecture

Colonies
bleu- gris, β-
hémolytique
s



Colonies
bleu- gris, β-
hémolytique
s



www.microbes-edu.org (18/06/2013)

Figure 07: Technique de la recherche de *Listeria monocytogenes*.
(GUIRAUD et ROSEC, 2004)

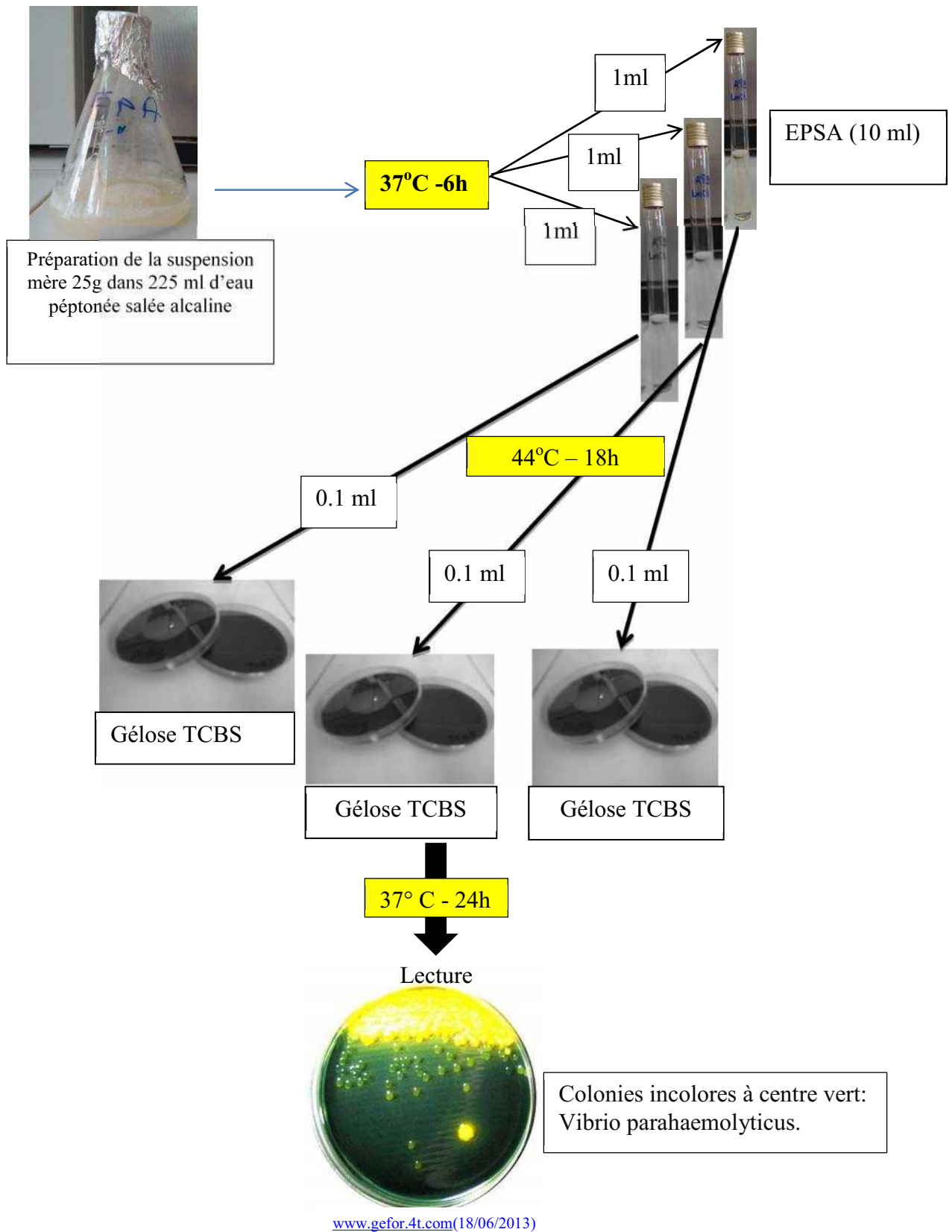


Figure 08 : Technique de la recherche et du dénombrement des *Vibrio. Sp* (JOFFIN et JOFFIN, 2010)

10. Recherche et dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs (Norme XP V 08-061) (Figure 09).

A. Mode opératoire :

- placer la suspension mère et les dilutions dans un bain-Marie à 80°C pendant 10 minutes pour éliminer toutes les formes végétatives,
- refroidir immédiatement les tubes sous l'eau de robinet (faisant un choc thermique),
- ajouter 15 ml de la gélose viande-foie en surfusion additionnée des additifs sulfites de sodium et alun de fer (20 gouttes pour chacun des additifs),
- laisser solidifier puis incuber à 37°C pour les sulfito-réducteurs et à 44°C pour *C. perfringens* pendant 72h.

B. Lecture :

Rechercher les colonies noires. Ces dernières correspondent aux bactéries produisant à partir des sulfites, des sulfures qui ont précipités avec les ions de fer III.

11. Recherche et du dénombrement de *Staphylococcus aureus*

(Norme ISO6888 NA 15164) (Figure 10):

A. Mode opératoire :

La recherche de *Staphylococcus aureus* se fait sur la gélose de Baird-Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium (ou milieu Chapman). Le milieu est ensemencé en surface avec 0,1 ml de la suspension mère et les dilutions. L'inoculum est ensuite étalé à l'aide d'un râteau en verre. L'incubation se fait à 37°C pendant 48h.

B. Lecture :

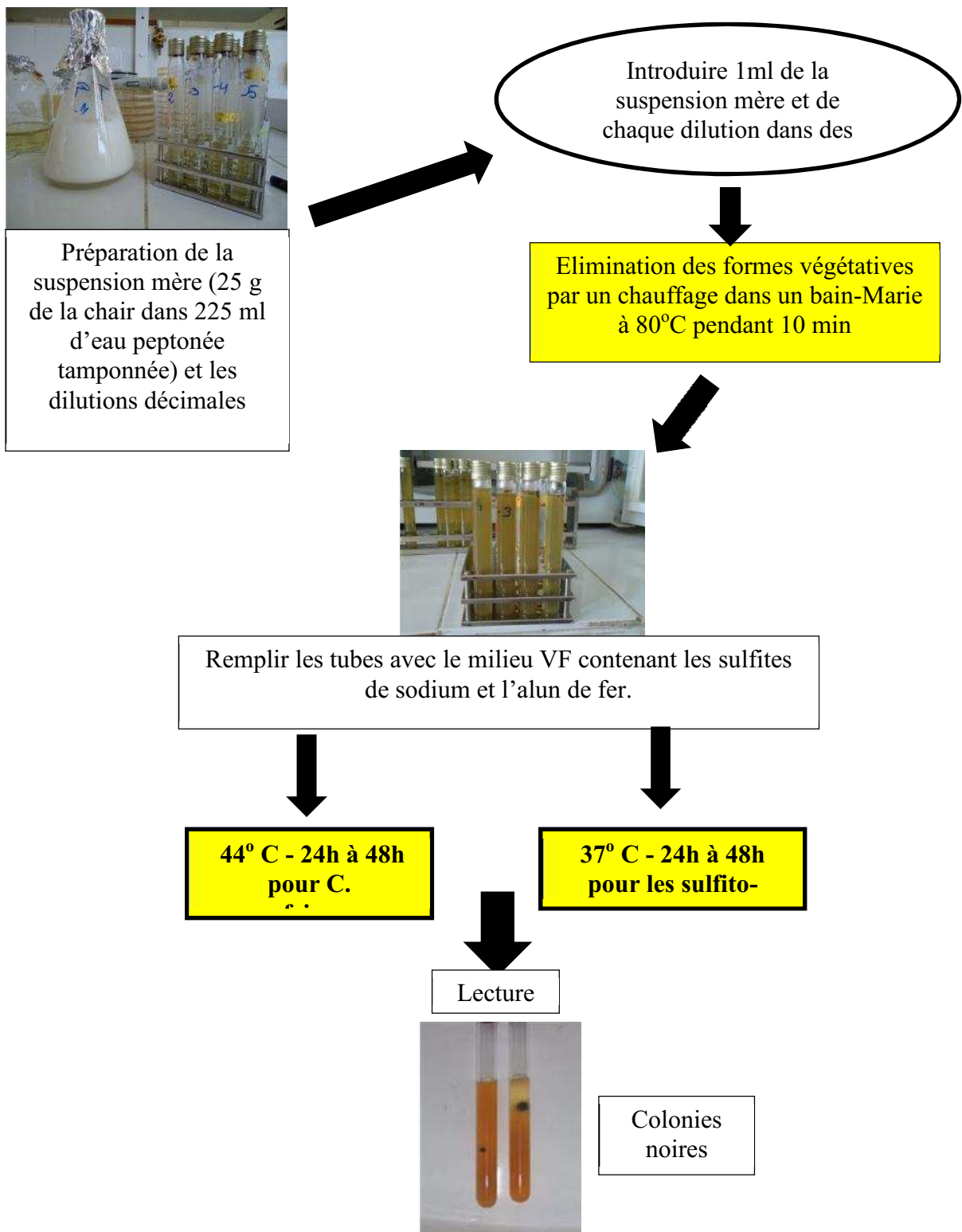
Les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent sur le milieu Baird-Parker, noires (réduction du tellurite en tellure), bombées, rondes et entourées d'un halo d'éclaircissement dû à la protéolyse des protéines du jaune d'œuf et, éventuellement, un liseré blanc opaque (précipitation des acides gras produits par la lécithinase qui hydrolyse la lécithine du jaune d'œuf). Elles sont jaunes dorées (mannitol+), lisses sur le milieu Chapman.

C. Confirmation :

Les colonies noires suspectées, entourées d'un halo clair doivent subir des tests de confirmation qui consistent en :

- une coloration de Gram (Gram+),
- un test de la catalase (catalase +),
- un test d'oxydase (oxydase+),
- un test de la coagulase (coagulase+).

Troisième partie : Résultat et discussions



www.geniebio.ac-aix-marseille.fr/18/06/2013

Figure 09 : Technique de la recherche et du dénombrement des germes sulfito-réducteurs (JOFFIN et JOFFIN, 2010)

Troisième partie : Résultat et discussions



Préparation de la suspension mère (25 g de la chair dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée) et les dilutions décimales

0.1ml

0.1ml



Gélose Baird Parker

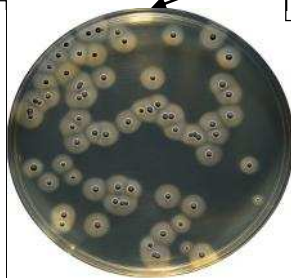


Gélose Chapman

37° C – 24h à 48h

Lecture

Colonies noires, bombées, rondes, entourées d'un halo d'éclaircissement et un liseré blanc opaque.



www.solabia.fr (18/06/2013)

Colonies jaunes dorées.



Figure 10 : Technique de la recherche et du dénombrement des *Staphylococcus aureus*
(Norme ISO6888 NA 15164)

12. Recherche et dénombrement des coliformes et d'*Escherichia coli* :

Les coliformes ont été recherchés par la méthode du nombre le plus probables (NPP). Cette méthode fait appel à deux tests consécutifs (RODIER, 2009 et JOFFIN et JOFFIN, 2010).

Le test présomptif (Figure 11a) est réservé à la recherche des coliformes totaux et réalisé sur bouillon lactosé (BL). Sa fermentation se manifeste par un trouble et un dégagement de gaz observé dans la cloche de Durham après une incubation à 37°C pendant 24-48 h.

Le test confirmatif (Figure 11b) est réservé à la recherche des coliformes fécaux dits coliformes thermotolérants, et des *Escherichia coli* à une température de 44°C pendant 24-48h, à partir des tubes positifs du test présomptif.

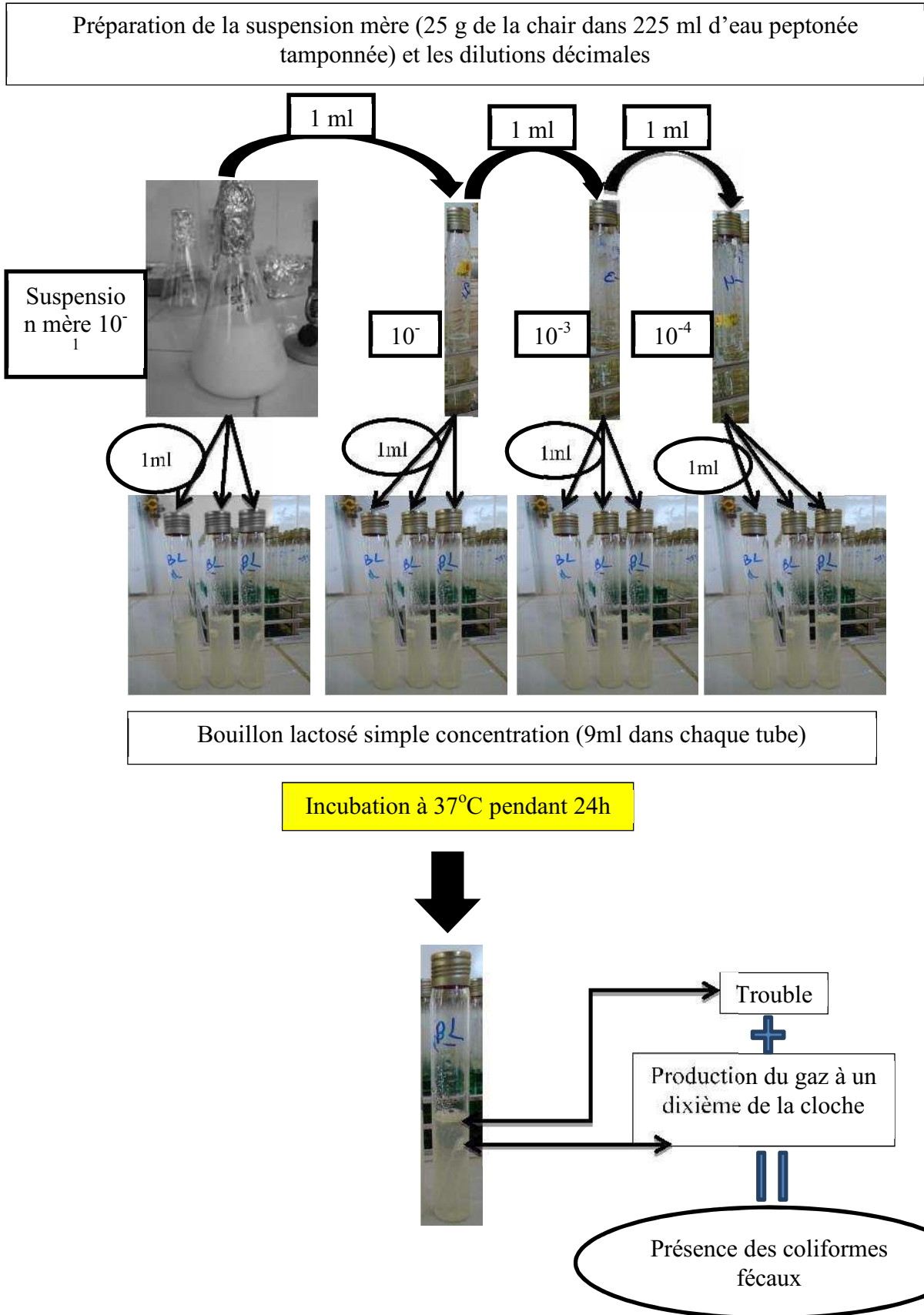


Figure 11a : Technique de la recherche et du dénombrement des coliformes et d'*E. coli* par la méthode NPP : Test présomptif (RODIER, 2009 et JOFFIN et JOFFIN, 2010 modifié)

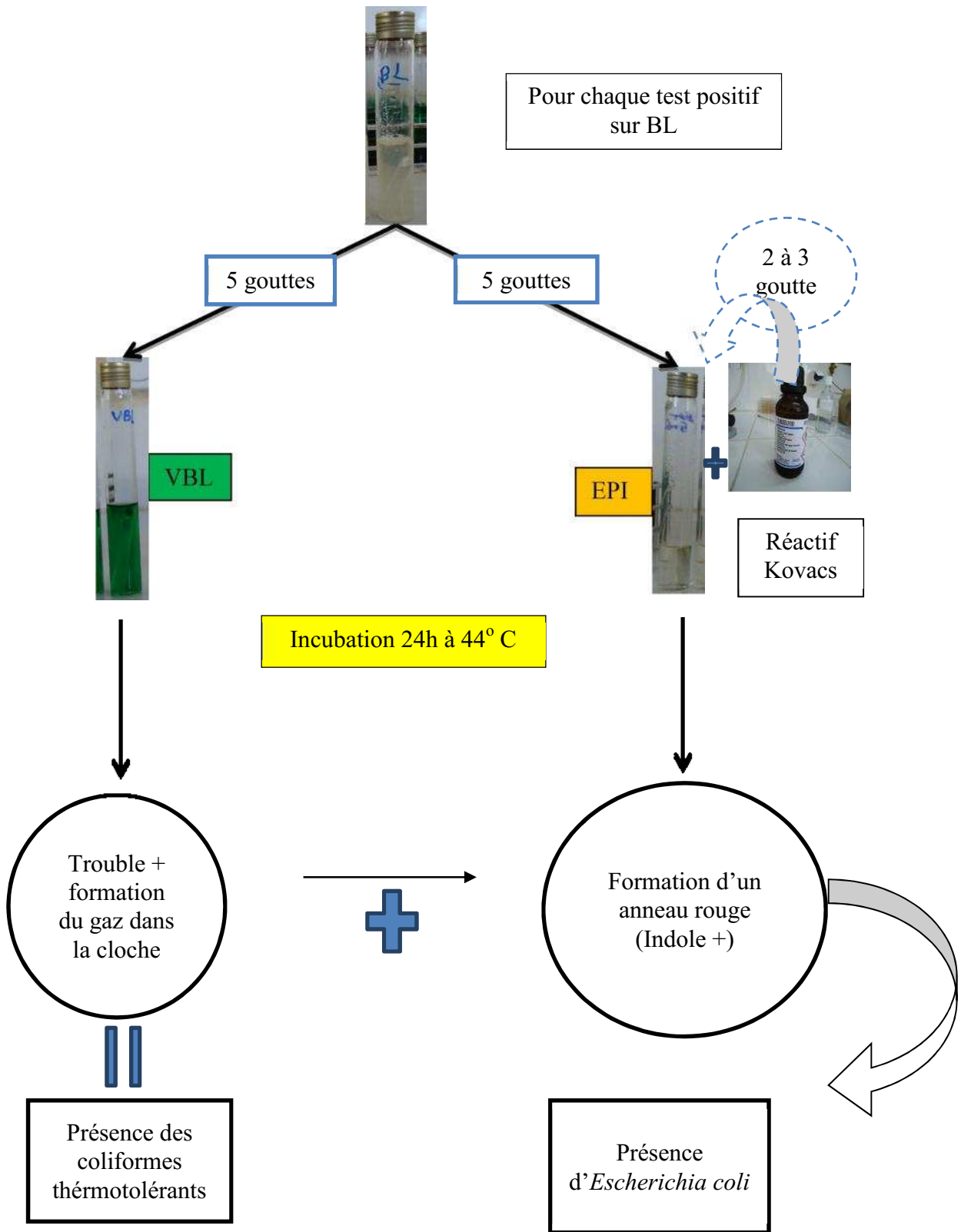


Figure 11b : Technique de la recherche et du dénombrement des coliformes fécaux et *E. coli* : Test confirmatif (RODIER, 2009 JOFFIN et JOFFIN, 2010 modifié)

13. Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*

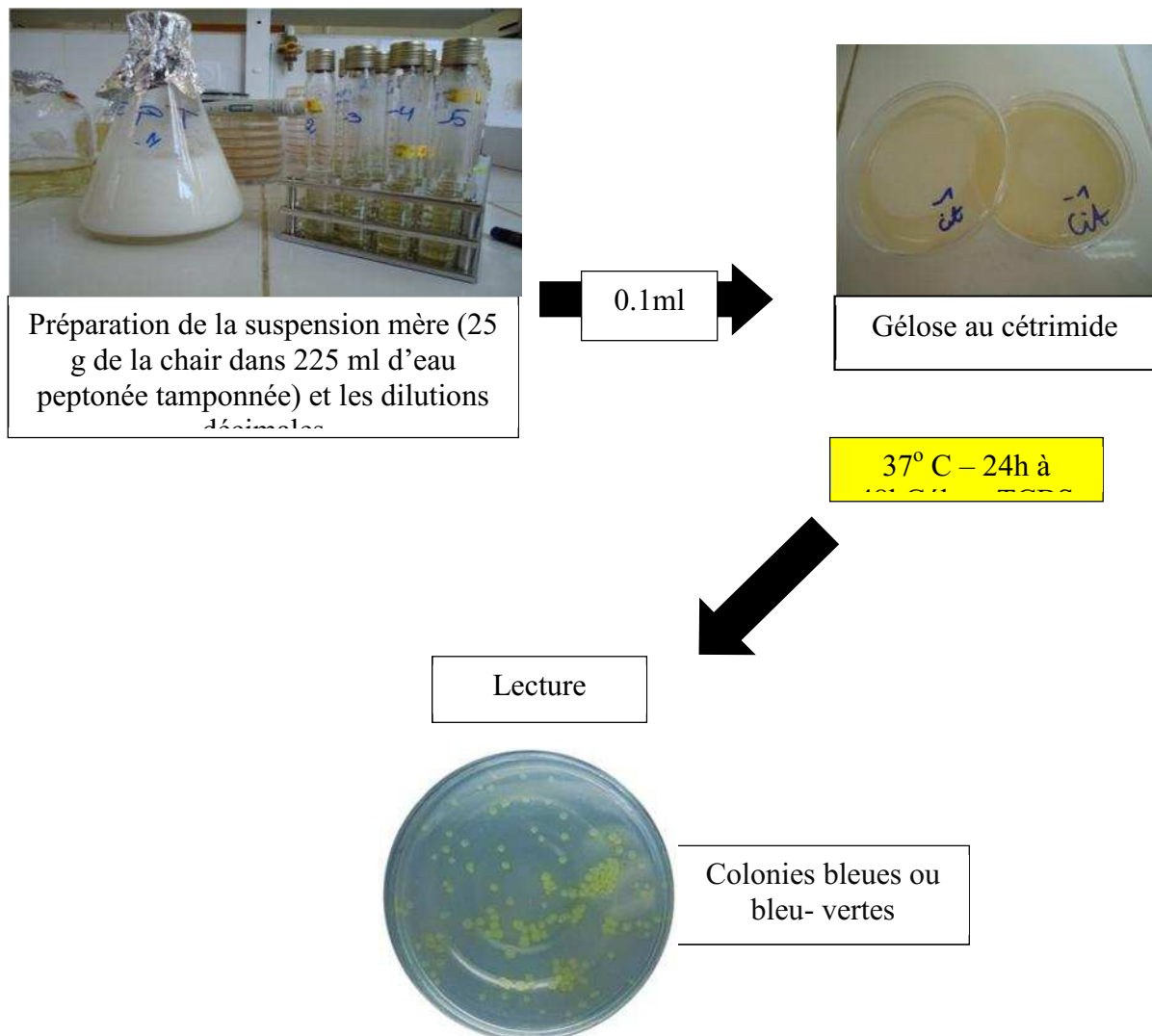
(Norme NFV 04-504 mars 2006) (Figure 12) :

A. Mode opératoire :

La recherche de *P. aeruginosa* s'effectue par ensemencement en surface d'un milieu sélectif au cétrimide avec 0,1 ml de la suspension mère et des dilutions. L'inoculum est ensuite étalé à l'aide d'un râteau en verre. L'incubation se fait à 37° C pendant 48h.

B. Lecture :

Les colonies de *P. aeruginosa* présentent une pigmentation caractéristique bleue ou bleu-verte et une fluorescence sous ultra-violets à 254 nm (ANONYME 2, 2010).



[www.solabia.fr\(18/06/20013\)](http://www.solabia.fr(18/06/20013))

Figure 12 : Technique de la recherche et du dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* (Norme NFV 04-504 mars, 2006)

14. Recherche et dénombrement de la flore fongique (Figure 13) :

Le milieu Sabouraud additionné d'amoxicilline a été utilisé pour la recherche et le dénombrement des levures et moisissures. L'amoxicilline est ajoutée au milieu (0.1g/l) en vue d'inhiber la croissance bactérienne. 0,1ml des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} sont ensemencés en surface de la gélose. La lecture des cultures se fait après 3 à 5 jours d'incubation à 37°C.

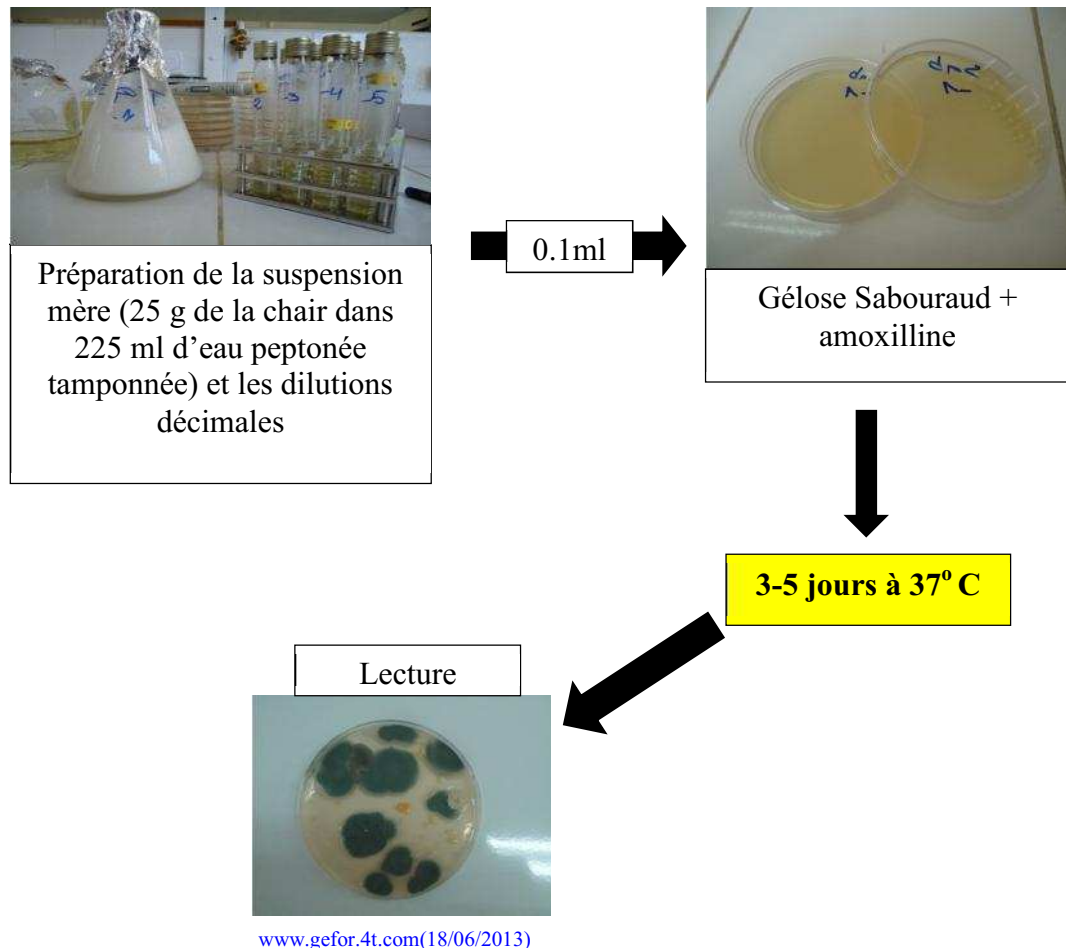


Figure 13: Technique de la recherche et du dénombrement des levures et moisissures (GUIRAUD, 2003)

15. Techniques d'identification bactérienne:

15.1. Technique de la coloration de Gram :

a) Préparation du frottis :

- poser une goutte d'eau distillée sur une lame propre, prélever un fragment d'une colonie bactérienne isolée et l'étaler sur la lame,
- sécher en approchant la lame de 15-20 cm au-dessus de la flamme du bec bunsen.

b) Fixation :

- tenir la lame avec une pince et la passer trois fois à la flamme avec la lame. Cette étape consiste à tuer les bactéries, à rendre les membranes plus perméables, à fixer les structures sans les altérer et à faire adhérer le frottis à la lame.

c) Coloration de Gram :

- **Coloration primaire** : couvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir 2min. Jeter l'excès de colorant.
- **Mordantage** : égoutter sans rincer et faire deux bains de lugol dont chacun dure 45 sec.
- **Décoloration** : égoutter et plonger la lame dans l'alcool 96° durant 30 secondes.
- Rincer doucement et abondamment à l'eau distillée.
- **Coloration secondaire** : recolorer les germes décolorer avec la fuchsine pendant 2 min.
- Laver à l'eau distillée et sécher la lame au-dessus de la flamme.

d) Observation au microscope :

- Observer à l'objectif à immersion (G 100×10) :
 - les bactéries colorées en violet sont les bactéries Gram+,
 - les bactéries colorées en rose sont les bactéries Gram-.

15.2. Recherche de l'oxydase:

L'oxydase ou la Cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes (DELARRAS, 2007).

La recherche d'oxydase consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacée (PRESCOTT *et al*, 2010).

a) Mode opératoire :

Déposer, sur une lame porte-objet propre, un disque « Ox » et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile. Prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque.

Une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes puis vire au noir indique que la bactérie produit une oxydase (DELARRAS, 2007).

15.3. Recherche de la catalase:

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives (DELARRAS, 2007). Cette enzyme catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est produit par certaines réactions cellulaires et très toxiques, donc c'est l'une des enzymes chargée d'éponger l'eau oxygéné par la dismutation (PELMONT, 1993). La réaction catalysée est la suivante :



a) Mode opératoire :

- sur une lame propre, séchée, on dépose une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes,
- a l'aide d'une pipette Pasteur on ajoute un fragment d'une colonie bactérienne bien isolée,
- L'observation se fait immédiatement :
 - catalase(+) : apparition de bulles dues au dégagement gazeux de dioxygène,
 - catalase(-): pas de réaction.

15.4. Recherche de la Coagulase:

Ce test sert à déterminer si la bactérie est capable de coaguler le plasma par l'action de l'enzyme coagulase.

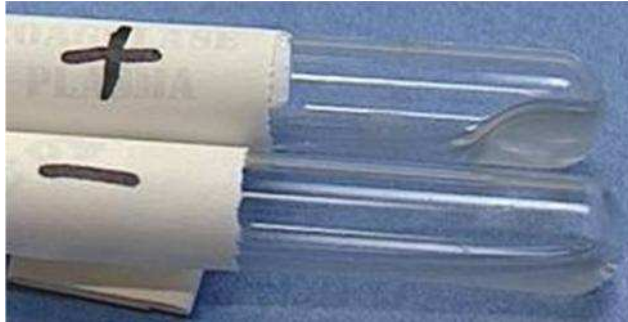
Mode opératoire :

- mettre dans un tube à hémolyse stérile 0,5 ml de plasma du lapin et une colonie suspecte,

- incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture :

Coagulation du plasma avec prise en masse totale, après une demi-heure ou avant la 24^{ème} heure indique que le germe produit une coagulase.



lifesci.rutgers.edu

Figure 14 : Résultats positif et négatif de la coagulase.

15.5. Test d'identification par la galerie API 20^E :

L'API 20^E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bactéries Bacilles Gram- non fastidieux. Comportant 21 tests biochimiques miniaturisés.

a) Principe :

La galerie API 20^E comporte 20 micro-tubes (surmontés de cupules) contenant des substrats déshydratés, qui permet de réaliser 21 tests biochimiques du métabolisme respiratoire, glucidique et protéique. Le test oxydase constitue le 21^{ème} test d'identification à effectuer hors galerie (DELARRAS, 2007).

b) Mode opératoire :

Préparation de la galerie :

- réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation,
- inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte,

Troisième partie : Résultat et discussions

- répartir de l'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide,
- déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

c) Préparation de l'inoculum :

- réaliser une suspension bactérienne dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile sans additifs, avec une seule colonie (bien isolée) prélevée sur un milieu gélosé et homogénéiser soigneusement.

d) Inoculation de la galerie :

- introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette en évitant la formation des bulles d'air,
- remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne,
- remplir uniquement les tubes des autres tests,
- créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de vaseline stérile,
- refermer la boîte d'incubation,
- incuber à 37°C pendant 24 heures.

e) Lecture :

- après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture,
- noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (+ ou -),
- réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs :

test TDA:1 goutte de réactif TDA,

test IND : 1 goutte de réactif Kovacs,

Troisième partie : Résultat et discussions

test VP : 1 goutte des réactif VP1 et VP2 et attendre 10 min.

f) Interprétation :

L'identification est obtenue à partir de profil numérique puis identifier à l'aide du catalogue analytique.



Figure 15 : Galerie API 20^E.

- | | |
|--|------------------------|
| 1) 2-nitrophénil-βD-galactopyranoside(ONPG), | 11) gélatine (GEL), |
| 2) L-Arginine (ADH), | 12) D-glucose (GLU), |
| 3) L-lysine(LDC), | 13) D-mannitol (MAN), |
| 4) L-arnithine (ODC), | 14) inositol (INO), |
| 5) trisodium citrate (CIT), | 15) D-sorbitol (SOR), |
| 6) Sodium thiosulfate (H ₂ S), | 16) L-rhamnose (RHA), |
| 7) Urée (URE), | 17) Dsaccharose (SAC), |
| 8) L-tryptophane (TDA), | 18) D-melibiose (MEL), |
| 9) Indole (IND), | 19) Amygdaline (AMY), |
| 10) sodium pyruvate (VP), | 20) L-arabinose (ARA), |

Remarque :

La coloration de Gram, le test de catalase et celui de l'oxydase ont été réalisés sur les colonies suspectes. La pureté des souches a été vérifiée par observation microscopique après une coloration de Gram. Les souches pures sont obtenues par plusieurs repiquages consécutifs.

PARTIE III :
RESULTATS ET
DISCUSSIONS




Dans le cadre de notre étude, les 3 échantillons de filets congelés de Panga ont fait l'objet d'analyses microbiologiques et les résultats obtenus ont été comparé aux normes Algériennes en vigueur (JORA ,1998).

1. Résultats et discussion du dénombrement de La flore mésophile aérobie totale (FMAT):

Elle est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banals de contamination. Ces germes n'agissent pas sur l'aliment et n'ont de répercussion du point de vue qualitatif (altération du produit) et hygiénique (santé du consommateur) qu'au-delà d'une certaine quantité (GUIRAUD *et* ROSEC, 2004).

Les résultats du dénombrement de la FMAT des échantillons sont énoncés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Résultats du dénombrement de la flore mésophile aérobie totale.

Echantillon	Observation macroscopique	Nombre de germes UFC/g	normes Algériennes (JORA, 1998)	observation
01		$2,8. 10^4$	$5. 10^4$	Qualité satisfaisante
02		$3,4. 10^5$	5.10^4	Mauvaise qualité microbiologique.
03		$6,4. 10^5$	5.10^4	Mauvaise qualité microbiologique.

La croissance bactérienne de cette flore était très importante à la dilution 10^{-1} pour les trois échantillons. Le nombre d'unité formant colonies était supérieur à 300 colonies par boîte de Pétri. Le dénombrement a été effectué à partir de la dilution 10^{-2} et les colonies sont


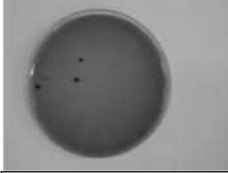







de tailles variables (petites, moyennes, et grandes), de formes (circulaire, plissée à striation concentrique avec un pourtour régulier ou irrégulier) et de couleurs différentes (blanche, jaune, crème, crème foncé et transparente). Dans le premier échantillon le nombre UFC/g de poisson obtenu est inférieur aux normes nationales (JORA, 1998), la qualité satisfaisante du filet peut être justifiée par la maîtrise des bonnes pratiques d'hygiène au cours des diverses opérations, le respect de la chaîne du froid au cours de l'entreposage et la commercialisation. Cependant, la mauvaise qualité microbiologique des échantillons (02) et (03) s'expliquerait par une contamination importante lors de la transformation, de la mauvaise gestion du couple durée/température et/ ou du manque d'hygiène chez les vendeurs de détail.

2. Résultats et discussion de la recherche de *Salmonella* :

Après enrichissement et ensemencement sur la gélose SS et la gélose Hektoen, les résultats obtenus dans les trois échantillons sont présentés dans le tableau 09.

Troisième partie : Résultat et discussions

Tableau 09 : Résultats de la recherche des salmonelles

Echantillon	Observation macroscopique	Isolement	Confirmation	Observation et identification
01	Absence de colonies caractéristiques sur :  Géllose SS  Géllose	/	/	Absence des Salmonelles.
02	Absence de colonies caractéristique sur:  Géllose SS  Géllose	/	/	Absence des Salmonelles.
03	 Colonies transparente avec un centre noir sur gélose  Colonies bleu-vertes avec centre noir sur gélose	Isolement des colonies caractéristiques  Géllose Hektoen  Géllose SS	Bâtonnets Gram-  lactose- Catalase + Oxydase-	Identification par la galerie API 20 ^E .

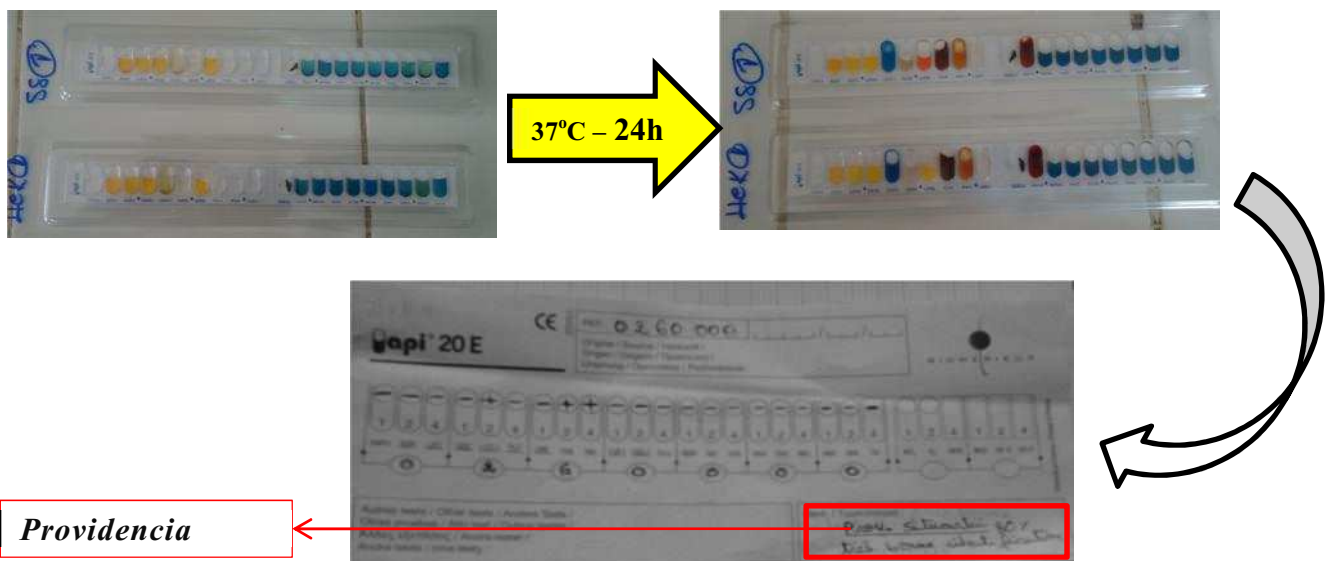


Figure 16 : Identification par galerie API

Troisième partie : Résultat et discussions


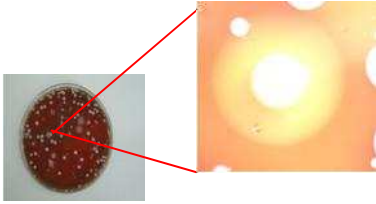


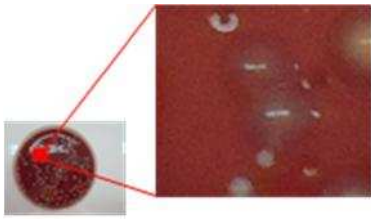

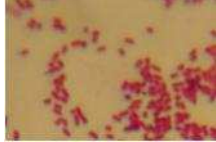
D'après le tableau 09 les résultats montrent l'absence totale des colonies caractéristiques dans les deux premiers échantillons, et donc absence de *Salmonella*. Par contre ce germe a été suspecté dans le troisième échantillon par la présence des colonies transparentes à centre noir sur gélose SS et bleu-vert sur gélose Hektoen et confirmé par la coloration de Gram, le test de la catalase et le test de l'oxydase. Mais, l'identification par la galerie API 20^E a démontré leur absence.

En comparant nos résultats avec les normes Algériennes qui exigent l'absence totale de *Salmonella* dans 25g de la chair, les filets de poisson sont de qualité satisfaisante. Les résultats obtenus peuvent être expliqués par la salubrité de la zone d'élevage de l'espèce, le respect des conditions d'hygiène lors des opérations (abattage, éviscération, filetage, etc.) et de commercialisation, nettoyage et désinfection des installations, bonne hygiène du personnel et les manipulateurs sont pas des porteurs sains .

3. Résultats et discussion de la recherche de *Listeria monocytogenes* :

Les ensemencements réalisés sur la gélose Columbia au sang et sur la gélose au sang des 3 échantillons ont donné les résultats regroupés au tableau 10.

Tableau 10 : Résultats de la recherche de *Listeria monocytogenes*

Echantillon	Observation macroscopique	Confirmation après isolement	Observation
01	Absence des colonies caractéristiques 	/	Absence de <i>Listeria monocytogenes</i>
02	Colonies bleu gris, lisses, translucides légèrement convexes à bords réguliers β-hémolyse sur gélose Columbia au sang. 	 petits bacilles Gram- : 	Absence de <i>Listeria monocytogenes</i>
03	Colonies bleu gris, lisses, translucides légèrement convexes à bords réguliers et β-hémolyse sur gélose Columbia au sang. 	 petits bacilles Gram- . 	Absence de <i>Listeria monocytogenes</i>







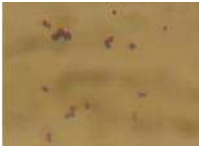
Les résultats du tableau 10 montrent l'absence des colonies caractéristiques dans le premier échantillon et donc l'absence de *Listeria monocytogenes*. En revanche, dans les échantillons (2) et (3) nous avons noté la présence des colonies typiques. L'absence du germe était confirmé après plusieurs isolements jusqu'à l'obtention d'une souche pure par une coloration Gram (bacille G- au lieu de bacille droit G⁺). Selon les normes décrites dans le journal officiel de la république algérienne, 1998), l'absence de *L.monocytogenes* dans 25g de la chair a permis de conclure que les filets surgelés sont d'une qualité satisfaisante. Ce résultat

traduit le bon nettoyage et la bonne désinfection des installations et des équipements au cours de la chaîne de transformation, le respect de la chaîne du froid durant l'entreposage et la commercialisation. *L. monocytogenes* possède une capacité de croître à températures basses (TAN *Getal*, 2013). Ce résultat laisse supposer que la durée de conservation était respectée. Le germe est présent normalement dans l'environnement aquatique surtout sur les poissons d'élevage et essentiellement sur la peau, dans les branchies ou le tube digestif des poissons (ANONYME 3, 2010). Donc l'absence de la bactérie dans les échantillons s'expliquerait par la salubrité de la zone d'élevage et les bonnes pratiques d'hygiène lors du pelage et l'éviscération des poissons.

4. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement de *Vibrio parahaemolyticus* :

La recherche du germe sur le milieu TCBS dans les trois échantillons a abouti aux résultats indiqués dans le tableau 11.

Tableau 11 : Résultats de la recherche et du dénombrement de *Vibrio parahaemolyticus*.

Echantillon	Observation macroscopique	Confirmation après isolement	Observation
01	Absence des colonies caractéristiques. 	/	Absence des <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
02	Colonies transparentes à centre vert.  saccharose-.	 Coques Gram +  Catalase -.	Absence des <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
03	Petites colonies vertes,  saccharose+.	 Coques Gram +,  catalase -, oxydase-.	Absence des <i>Vibrio Parahaemolyticus</i>




Après plusieurs isollements des colonies suspectés sur TCBS, la coloration de Gram et les tests de la catalase et de l'oxydase ont confirmé l'absence de *Vibrio parahaemolyticus* dans le deuxième et le troisième échantillon. L'absence de ce germe dans le premier échantillon a été estimée par la non apparition de colonies vertes caractéristiques. Ces résultats nous permettent de conclure que les échantillons sont de qualité satisfaisante, cela peut être dû à la sensibilité de *V. parahaemolyticus* au froid sachant que le temps de réfrigération nécessaire pour obtenir une diminution de dix fois le nombre de ce germe est de 20 heures (FAO, 2001). De plus, le fait que *V. parahaemolyticus* se trouve à la surface des

poissons (FAO, 2001), laisse supposer que cette bactérie était éliminée par le pelage si elle était présente, et aussi à un lavage avec une eau de bonne qualité et une éviscération bien faite.

5. Les anaérobies sulfito-réducteurs :

L'incubation des tubes de VF à des températures différentes (37°C pour la recherche et le dénombrement des sulfito-réducteurs et 45°C pour *Clostridium perfringens* a donné les résultats figurant dans le tableau 12 :

Tableau12 : Résultats de la recherche et du dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs


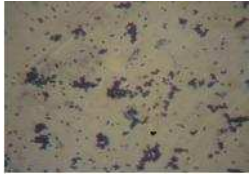

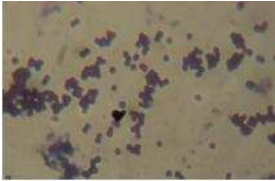


Echantillon	Observation macroscopique	Observation
01	Absence de colonies noires  37°C 44°C	Absence des anaérobies sulfito-réducteurs
02	Absence de colonies noires  37°C 44°C	Absence des anaérobies sulfito-réducteurs
03	Absence de colonies noires.  37°C 44°C	Absence des anaérobies sulfito-réducteurs

Après une incubation de 72 h à des températures appropriées. Les résultats indiquent une absence totale des colonies noires caractéristiques dans les trois échantillons de filet de Panga. L'absence des *Clostridium* sulfito-réducteurs traduit la maîtrise de la contamination tellurique lors des traitements de transformation par le respect des bonnes pratiques d'hygiène (désinfection des plan de travail, pas de contact avec les aliments souillés...).

6. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement de *Staphylococcus aureus* :

Selon PRESCOTT *et al* (2010) C'est un indicateur de contamination transmis essentiellement par le personnel (mains sales, infection de la peau, du nez ou de la gorge).

Tableau 13 : Résultats de la recherche et du dénombrement de *Staphylococcus aureus*.

Echantillon	Observation macroscopique	Confirmation	Nombre de germes UFC/g	Norme Algérienne (JORA, 1998)	Observation
01	Colonies jaune doré sur gélose Chapman 	coques en amas Gram+.  catalase+ oxydase+ coagulase+	53,6	10 ²	Présence des <i>Staphylococcus aureus</i> .
02	Colonies noires, brillantes entourées d'un halo clair 	Coques en amas Gram+  catalase+ oxydase + coagulase+	2,34.10 ³	10 ²	Présence des <i>Staphylococcus aureus</i> .
03	Colonies noires, brillantes entourées d'un halo clair 	Coques en amas Gram+  Catalase+ Oxydase+ Coagulase+	1,6. 10 ⁴	10 ²	Présence des <i>Staphylococcus aureus</i> .

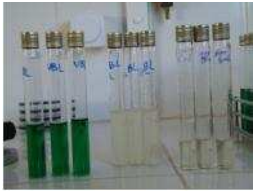


Troisième partie : Résultats et discussions

Dans le premier échantillon l'ensemencement sur le milieu Chapman a donné des colonies jaunes dorées entourées d'un halo jaune orangé (fermentation du mannitol), typiques de *Staphylococcus aureus* et dans le deuxième et le dernier échantillon l'utilisation du milieu Baird-Parker a permis de suspecter la présence de *Staphylococcus aureus* par l'apparition des colonies noires entourées d'un halo clair. Les colonies suspectes ont fait l'objet d'une confirmation par une coloration de Gram, et les tests de l'oxydase, de la catalase et de la coagulase. La coloration de Gram et les tests biochimiques ont confirmé la présence de *Staphylococcus aureus* à coagulase positive, signalons que le nombre de germes était inférieur à celui précisé dans le JORA (1998), dans le premier échantillon. Ce résultat nous permet de qualifier les filets d'une qualité satisfaisante. Cette dernière peut être argumentée par une limitation de la contamination par le personnel au cours de la chaîne de fabrication et au moment de la dernière distribution. Alors que pour les 2 autres échantillons la qualité était insatisfaisante. Ce résultat était attendu du fait que les emballages, qui normalement constituent une barrière protectrice contre les contaminations, étaient ouverts. De plus le commerçant a pesé le poisson à mains nues et/ou après avoir manipulé le poulet sans se laver les mains.

7. Résultats et discussion de la recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* :

C'est une bactérie intestinale de l'homme, sa présence dans l'aliment indique une contamination fécale. Le tableau 14 représente les résultats de la recherche et de dénombrement d'*E. coli* :

Tableau 14 : Résultats de la recherche et de dénombrement d'*Escherichia coli*




Echantillon	Observation macroscopique	NPP (<i>E. coli</i> /g)	Résultats
01	Trouble du milieu de culture, gaz+, Indole ⁻ 	<0.30	Absence d' <i>E. coli</i>
02	Trouble du milieu de culture, gaz +, Indole ⁻ 	<0.30	Absence d' <i>E. coli</i>
03	Trouble du milieu de culture, gaz+, Indole ⁻ 	<0.30	Absence d' <i>E. coli</i> [Présence des coliformes fécaux (8.4 germe/g)]

L'absence d'*Escherichia coli* dans les trois échantillons témoigne l'absence de toute contamination d'origine fécale. Par comparaison avec la norme Algérienne (JORA, 1998), le troisième échantillon contient un nombre de coliformes fécaux inférieur à 10 germes/g de poisson. La contamination est probablement à lieu soit lors des opérations d'éviscérations soit lors de la vente en détail.

8. Résultats et discussion de la recherche et du dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* :

Les résultats obtenus dans les trois échantillons figurent dans le tableau 15.

Tableau 15 : Résultats de recherche et du dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*



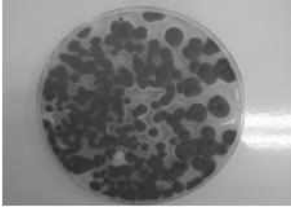
Echantillon	Observation macroscopique	Résultats
01	Absence de colonies caractéristiques sur gélose au cétrimide. 	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
02	Absence de colonies caractéristiques sur gélose au cétrimide. 	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
03	absence de colonies caractéristiques sur gélose au cétrimide. 	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

L'absence totale de *Pseudomonas aeruginosa* nous renseigne sur qualité satisfaisante des filets de Panga. Cela serait attribué à la bonne qualité de la matière première, à l'application précoce et le non interruption du froid, la durée limite de conservation était respectée, ainsi que les poissons étaient lavés avec une eau de bonne qualité.

9. La flore fongique :

La culture des levures et moisissures est faite sur la gélose Sabouraud, les résultats sont mentionnés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Résultats de recherche et du dénombrement de la flore fongique.

Echantillons	Observation macroscopique	UFC /g	Résultats
01		Non-dénombrable (nombre de colonies < 15)	Prédominance des moisissures
02		$0,61 \cdot 10^2$	Prédominance des moisissures
03		$2,09 \cdot 10^2$	Prédominance des moisissures

En comparant les trois échantillons, on constate que le premier échantillon est peu contaminé contrairement aux deux derniers qui présentent un niveau de contamination élevé par une prédominance des moisissures. Cela peut être dû à l'atmosphère humide des locaux où s'effectue la vente des poissons ou à une contamination par l'air, du fait que les sachets sont ouverts. Par conséquent les filets sont exposés à toute forme de contamination (air, poussière...), ainsi que les produits d'origine végétale (petit pois...) sont congelés dans le même frigo avec les filets de poisson.

CONCLUSION

Conclusion

La chair du poisson est une denrée très périssable (riche en eau et en élément nutritifs) favorable à la prolifération de la microflore d'altération et/ou pathogène.

Nous avons entrepris cette étude qui consiste à évaluer la qualité microbiologique des filets de Panga vendus sur le marché local, pour deux raisons essentielles :

- le poisson congelé peut être stocké assez longtemps et éventuellement soumis à des ruptures de la chaîne du froid (accidentelle ou intentionnelle),
- les commerçants manipulant le poisson ne respectent pas les règles élémentaires d'hygiène.

Ces deux facteurs concourent à favoriser l'altérabilité de ce produit déjà naturellement très sensible.

D'après les résultats obtenus les échantillons se caractérisent par :

- une flore mésophile totale et fongique abondantes,
- la présence de *Staphylococcus aureus*,
- l'absence totale : de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, de germes sulfite-réducteurs et d'*E. coli*.

Après avoir comparé nos résultats aux normes Algériennes (JORA, 1998) le deuxième et le troisième échantillon étaient de qualité insatisfaisante contenu de la présence de *Staphylococcus aureus* et d'une flore mésophile aérobie totale abondante.

La présence de *Staphylococcus aureus* et des flores mésophile et fongique dans les échantillons dénote du non-respect des règles d'hygiène au niveau du circuit de la commercialisation (vendeur aux mains sales et négligent, sachets ouverts.....). Ces résultats sont en accord avec ceux de HOBBS(1982) qui stipule que l'Homme constitue la source la plus importante des contaminations exogène des denrées alimentaires d'origine animale.

Recommandations :

Afin de limiter la contamination et la prolifération des germes dans les aliments congelés et protégé le consommateur des intoxications alimentaires, quelques actions doivent être menées par les vendeurs, les consommateurs et les autorités.

Vendeurs :

- l'hygiène corporelle et vestimentaire est obligatoire,
- il est recommandé de bien se laver les mains après avoir manipulé des aliments à risques (œufs, viandes crues, le poulet),
- il est recommandé de nettoyer soigneusement le plan de travail ayant servi aux préparations de ces aliments à risques,
- les manipulateurs de denrées alimentaires présentant des lésions cutanées doivent être exclus de la manipulation des denrées non conditionnées et/ou emballées, tant que les lésions ne sont pas correctement couvertes (principalement pour les staphylocoques),
- le respect de la chaîne du froid est capital,
- veiller à la fermeture des emballages,
- il est nécessaire de respecter les consignes de conservation au froid et les dates limites de consommation,
- une désinfection régulière des chambres froides et des congélateurs qui constituent un véritable écosystème favorable au développement des psychrotrophes.

Consommateurs:

- le lavage des mains avant et après la manipulation du poisson est nécessaire.
- veiller à la fermeture des emballages,
- ne jamais recongeler le poisson après sa décongélation,
- lire toujours les dates limite de conservation avant d'acheter le produit.
- il est nécessaire de bien cuire à cœur les aliments (70°C pendant 1 à 2 minutes) consommés par les jeunes enfants et les personnes âgées,
- désinfection des réfrigérateurs et des congélateurs.

 **Autorités :**

- organiser des journées de formation et de sensibilisation destinés à toute personne intervenant dans le circuit des produits alimentaires périssables,
- penser à la création d'écoles professionnelles destinées aux personnels travaillant dans les métiers de la bouche,
- créer ou redynamiser les comités citoyens pour la protection du consommateur.

REFERENCES

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIQUES

Bibliographie

- ABOTCHI K. et SEYDI M., *Evaluation de la qualité microbiologique des poissons fumés artisanalement au Togo*. Master II en qualité des aliments de l'homme. Ecole Inter-Etats des sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar (Sénégal), 30 p.
- ANONYME 1, 1972 : Institut international du froid.
- ANONYME 2, in www.biokardiagnostic.org (consulté en avril, mai et juin 2013).
- ANONYME 3, 2010 : Guide des bonnes pratiques d'hygiène et application de l'HACCP – Vol 6 – Poissons frais, surgelés ou congelés.
- BARTHE, WEAVER, TREMBLAY. *Préparation des échantillons pour l'analyse microbiologique*. Québec Direction du laboratoire d'expertises et d'analyses alimentaires, 13-09-2007. 01-D-550, p.04-18.
- BERAUD J., *Les techniciens d'analyse biologique*. Ed. Paris : Lavoisier, 2004. 2081 p.
- BOURGEOIS C.M. et MESCCCLE J.F et ZUCCA J., *Microbiologie alimentaire*. Tome 1. Paris : Lavoisier TEC & DOC, 1996, 672 p.
- COLAS B. et LEMESTE M., *L'eau dans les procédés de transformation et la conservation des aliments*. Paris : Lavoisier TEC & DOC, 1990, 277 p.
- DELARRAS C., *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Paris : Lavoisier Tec & Doc, EMinter, 2007. 476 p.
- FAURE E. et KIPNIS B. et GUERY. *Prise en charge des pneumonies liées à Pseudomonas aeruginosa*. Revue générale Rev. Tun. Infectiol., 2008, Vol 2, N°1, p. 1 – 8.
- GUIRAUD J-P. *microbiologie alimentaire*. Ed. DUNOD, 1998. 652 p.
- GUIRAUD J-P. *Microbiologie alimentaire*. Paris : DUNOD RIA, 2003. , 652 p.
- GUIRAUD et ROSEC. *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Paris : AFNOR, 2004. 300 p.
- GRAM L. et DALGAARD P., *Fish spoilage bacteria problems and solution*. Curr. Opin. Biotechnol., 2002. p. 262 – 266.
- HOBBS, G.1982. Changes in fish after catching. In Aitken A., Mackie I.M., Merritt J.H. & Windsor M.L., éd. *Fish handling and processing* Torry Research Station. Edinburgh, RU, HMSO.
- JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P. et BRULE G., *Science des aliments : Biochimie, microbiologie, procédés et produits*. Paris: Lavoisier TEC & DOC, 2007. , p. 211-219.

- JOFFIN C. et JOFFIN J-N. *Microbiologie alimentaire*. 6^{ème} éd. Centre régional de Documentation pédagogique d'Aquitaine, 2010. , p.34-83, 172, 181-207, 231-292.
- Journal Officiel de la République Algérienne N°35, 27 mai 1998. Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires (les poissons et produit de la pêche).
- LAZARD J. et CACOT P., *Domestication des poissons chats du Mékong du genre Pangasius*. Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD, 2003 [en ligne] (consulter le 22 mai 2013).
- NOUT R., HOUNHOUGAN J-D., et BOEKEL T-V., *Les aliments : transformation, conservation et qualité*. Backhuys Publishers et CTA, 2003. 268 p.
- PELMONT J., *Bactéries et environnement : adaptations physiologiques*. Collection Grenoble Sciences, 1993. 899 p.
- PRESCOT HARELEY KLEIN WILEY SHRWOOD et WOOLVERTON. *Microbiologie*. 3^{ème} éd. Italie: De Boeck, 2010. 1088 p.
- RODIER J., MERLET N., et coll., *L'analyse de l'eau. Chapitre A : Analyse microbiologique des eaux*. 9^{ème} éd. Paris : DUNOD, 2009. , p. 719-823.
- ROSSET P., BEAUFORT A., CORNU M., et POUMEYROL G., *La chaîne du froid en agroalimentaire*. Cahier de Nutrition et de Diététique 37, 2, 2002. p. 124-130.32
- TANG, SILIN, STASIEWICZ, MATTHEW J., WIEDMANN, MARTIN, BOOR, KATHRYN J., BERGHOLZ, TERESA M., Efficacy of different antimicrobials on inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in laboratory medium and on cold-smoked salmon, *International Journal of Food Microbiology* (2013), in j. food. micro.
- VALENCIENNES et VALENCIENNES, 1840 in www.wikipedia.fr (consulté le 14 mai 2013).
- VIERLING E., *Aliments et boissons : Filières et produits*. 3^{ème} éd. Bordeaux : SCEREN CRDP AQUITAINE, 2008. P.91-109.

WEBOGRAPHIE

www.afnor-validation.org (consulté le 13 mai 2013)

www.afssa.fr (consulté en avril, mai et juin 2013)

www.anses.fr (consulté en avril, mai et juin 2013)

www.FAO.org (consulté en avril, mai et juin 2013)

ANNEXES

Annexe I:

Milieux de culture et réactifs

1. Technique de préparation d'un milieu de culture

La préparation classique d'un milieu de culture passe par les étapes suivantes :

- La lecture et interprétation de la formule de préparation.
- Rassembler les différents constituants.
- La pesée.
- Dissolution avec ajustement du volume exacte.
- Ajustement du pH.
- La filtration c'est facultatif.
- La répartition.

La stérilisation des milieux de culture se fait à l'autoclave 121°C pendant 15 minutes, 120°C pendant 20 minutes (Pour les milieux stérilisables).

2. Composition des milieux de culture et réactifs :

Formules indiquées en gramme par litre d'eau distillée

Eau peptonée tamponnée (E.P.T)

Formule:

- Mélange de peptones..... 10,0
- Chlorure de sodium.....5,0
- Di-sodium hydrogénophosphate.....3, 5
- Dihydrogénophosphate de potassium..... 1,5

PH final= 7,2à 25°C

Autoclaver 20 minutes à120°C

Eau peptonée salée alcaline (EPSA)

Formule :

- Peptone.....20
- Chlorure de sodium.....5

PH= 8.2

Additionné 40% de Chlorure de sodium pour obtenir une solution hypersalée.

Autoclaver 15 minutes à 120°C.

Eau peptonée exempte d'indole (EPI)

Formule :

- Peptone exempte d'indole.....15

PH= 7.2 à 25°C

Répartir en tubes à essais (9ml) et autoclaver 15 minutes à 120°C.

Bouillon lactosé:

Formule :

- Hydrolysats pancréatique de gélatine5
- Extrait de viande.....3
- Lactose.....5

PH= 6,9à 25°C

Répartir en tubes à essais (9 ml), ajouter éventuellement une cloche de Durham et autoclaver 15 minutes à 120°C.

Mode d'action :

La présence de l'hydrolysats et du lactose (disaccharide) favorisent la revivification des entérobactéries et d'autres germes Gram – dans ce bouillon (DELARRAS, 2007).

Bouillon lactosé bilié au vert brillant (VBL)

Formule :

- Peptone de viande10
- Lactose10
- Bile de bœuf desséchée.....20
- Vert brillant0.0133
- Eau permutée1000

PH= 7,2 à 25°C

Répartir dans des tubes à essais et autoclaver 15 minutes à 120°C (Guiraud, 2003).

Mode d'action :

La bile et le vert brillant inhibent les bactéries autres que les entérobactéries et autres germes Gram- alors que l'hydrolysats et le glucose facilitent leurs développement (DELARRAS, 2007).

Bouillon sélénite – cystine

Formule :

- tryptone..... 5,0
- Lactose4,0
- Selinite acide de sodium.....4,0
- Phosphate disodique.....10
- cystine.....100 mg

Répartir en tubes à essais (10ml). Stériliser par ébullition 10 min (ne pas autoclaver)

PH finale= 7,0à 25°C (GUIRAUD, 2003)

Mode d'action :

- La teneur en sélénite permet d'assurer l'inhibition des microorganismes autres que les salmonelles et notamment des coliformes et des entérocoques. Les *Pseudomonas* et les *Proteus* ne sont pas totalement inhibés (Delarras, 2007).

- Le phosphate disodique contribue à assurer le maintien du pH et à réduire la toxicité du sélénite afin d'augmenter la capacité de récupération du milieu (ANONYME 2, 2010).

Bouillon Rappaport-Vasiliadis

Formule :

- Peptone de soja.....4, 5
 - Chlorure de sodium.....7, 2
 - Tampon phosphate : $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$1, 44
 - Chlorure de magnésium $6\text{H}_2\text{O}$28, 4
 - Oxalate de vert malachite.....0, 036
- pH= 5.2 à 25°C

Mode d'action :

- La peptone de soja, riche en vitamines hydrates de carbone favorise la culture des germes exigeants.
- Le chlorure de magnésium à 28,4 g/l et le vert de malachite sont des inhibiteurs de bactéries Gram-.
- Le chlorure de magnésium permet de diminuer l'effet toxique du vert de malachite.
- Le tampon phosphate assure la stabilité du pH (ANONYME 2, 2010).

Gélose Baird-Parker

Formule:

- Mélange de peptones..... 15,0
 - Extrait de viande..... 5,0
 - Extrait de levure..... 2,0
 - Pyruvate de sodium.....7,5
 - Glycine..... 7,5
 - Chlorure de lithium.....3,0
 - Gélose A (RM 10)..... 17,0
- pH= 6,8 à 25°C .

Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Préparation : ajouter aseptiquement le supplément Baird-Parker: Émulsion de jaune d'œuf au tellurite de potassium à 1% (50 ml) (GUIRAUD, 2003).

Mode d'action :

- Le tellurite de potassium, réduit en tellure métallique noir par les staphylocoques, produit des colonies noires.

- Le jaune d'œuf contient des lipoprotéines qui peuvent être hydrolysées par des lipoprotéinase en produisant un halo d'éclaircissement au jaune d'œuf autour des colonies ; après 48h d'incubation, une opacification peut apparaître dans le halo, traduisant l'action d'une lécithinase (DELARRAS, 2007).

Gélose Chapman(= gélose mannitol)

Formule :

- Extrait de viande.....1
- Peptone.....10
- Chlorure de sodium5
- Mannitol.....10
- Rouge de phénol.....25 mg
- Gélose.....15

pH= 7,4 à 25°C.

Autoclaver 15 minutes à 120°C. Répartir en boîtes de pétri.

Mode d'action :

- Le chlorure de sodium à concentration élevée (75g/l) inhibe de nombreux germes, sauf les germes halophiles ou halotolérants.
- La fermentation du mannitol (polyalcool) par certaines espèces de staphylocoques, libère des acides qui font virer le rouge de phénol au jaune en milieu acide ; dans le cas contraire le milieu conserve sa couleur rouge initiale (DELARRAS *et* TREBAOL, 2003).

Gélose au Cétrimide (=gélose pour *Pseudomonas aeruginosa*)

Formule :

- Peptone.....20
- Sulfate de potassium.....10
- Chlorure de magnésium.....3
- Glycérol.....10 ml
- Phosphate dipotassique.....0,3
- Cétrimide.....0,2
- Acide nalidixique(facultatif selon les formules).....15 mg
- Gélose.....3 mg

pH= 7,2 à 25°C.

Autoclaver 15 minutes à 120°C.

Mode d'action :

- Le cétrimide ou bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium est un antiseptique (ammonium quaternaire) inhibiteur de beaucoup de germes autre que les *Ps. aeruginosa*.
- La peptone de gélatine est une peptone trypsique de gélatine, à faible teneur en cystéine, tryptophane et hydrates de carbone.
- Le sulfate de potassium et le chlorure de magnésium favorisent la production des deux pigments (pyocyanine et pyoverdine), (DELARRAS, 2007).

Gélose Columbia

Formule :

- Peptone (mélange).....23
- Amidon.....1
- Chlorure de sodium.....5
- Gélose.....10

pH= 3.7 à 25°C

Autoclaver 15 min à 120°C. Ajouter aseptiquement 5% de sang défibriné stérile (Guiraud, 2003).

Mode d'action :

- Les peptones qui entrent dans la composition du milieu favorisent l'excellente croissance des colonies.
- L'extrait de levure est une source du complexe vitaminique B.
- L'amidon est un détoxifiant, également source d'énergie.
- Le sang humain défibriné, qui est rajouté au milieu, favorise la détection des réactions hémolytiques (α ou β -hémolytique), (ANONYME 2, 2010).

Gélose Hektoen

Formule:

- Mélange de peptones..... 13,8
- Extrait de levure..... 2,0
- Lactose..... 12,0
- Saccharose..... 12,0
- Salicine..... 1,0
- Chlorure de sodium..... 5,0
- Tauroglycocholate de sodium..... 6,5
- Thiosulfate de sodium (anhydre)..... 1,25
- Citrate d'ammonium ferrique..... 1,25
- Bleu de bromothymol..... 0,065
- Fuschine acide..... 0,1
- Agar..... 14,0

pH= 7,6à 25°C .

Autoclaver à 121C° pendant 15 minutes (Guiraud, 2003).

Mode d'action :

- Le lactose inhibe les bactéries à Gram+ et quelque bactérie à Gram- .
- Le lactose et le saccharose sont des disaccharides ; la salicine est glucoside de la saligénine (alcool salicylique + glucose). Ces trois sucres peuvent être fermentées par certaines entérobactéries en produisant des acides qui font virer le bleu de bromothymol et la fuchsine acide (indicateurs colorés) au jaune saumon : test « sucre+ » ; dans le cas contraire, la coloration est bleu-vert ; donc test « sucre- ».
- La peptone de viande et éventuellement le thiosulfate de sodium constituent deux sources de soufre. Le soufre peut être réduit par certaines entérobactéries en H₂S ; ce dernier réagit avec le citrate de fer ammoniacal du milieu pour donner du sulfure de fer qui colore en noir le centre des colonies. (DELARRAS, 2007).

Gélose pour dénombrement ou Plate Count Agar (P.C.A)

Formule:

- Tryptone..... 5,0
- Extrait de levure..... 2,5
- Glucose..... 1, 0
- Agar A (RM 10)..... 12, 0

PH final= 7, 2 ± 2 à 25°C.

Autoclaver à 121C° pendant 15 minutes.

Mode d'action :

- Les substances nutritives apportées par la Tryptone, les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure et le glucose (source énergétique) favorisent la croissance de la plupart des bactéries à dénombrer (ANONYME, 2010).

Gélose Salmonella-shigella(SS)

Formule :

- Peptone.....5
- Extrait de viande de bœuf.....5
- Sels biliaires.....4. 2
- Citrate de sodium.....10
- Thiosulfate de sodium.....8.5
- Citrate de fer.....2
- Lactose.....10
- Rouge neutre.....25 mg
- Vert brillant.....0.3mg
- Agar.....12

PH final= 7.3±0.2 à 25°C

Mode d'action:

- Les sels biliaires, le citrate de sodium et le vert brillant (colorant) inhibent les bactéries à Gram+, le citrate et le thiosulfate de sodium diminuent le développement des coliformes et *proteus*.
- Le thiosulfate de sodium est réduit, en présence d'une réductase, en H₂S, qui réagit avec le citrate de fer pour produire du sulfure de fer ; ce dernier colore en noir le centre des colonies, qui sont dite H₂S+ (DELARRAS, 2007).

Gélose sabouraud BioMérieux® :

Formule :

▪ Peptone de viande (bovin ou porcin).....	3
▪ Peptone de caséine (bovin).....	3
▪ Peptone de soja.....	3
▪ Extrait de levure.....	2
▪ Extrait de malt.....	1
▪ Glucose.....	19
▪ Phosphate monopotassique.....	0.5
▪ Phosphate disodique.....	0.5
▪ Agar.....	13p

H= 6.4 à 25°C

Autoclaver 20 minutes à 120°C. Additionner un antibiotique (Amoxicilline 0.5g/l)

Mode d'action :

- La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures
- L'addition de l'antibiotique inhibe toute croissance bactérienne.

Gélose au sang

▪ protéose-peptone.....	15
▪ extrait de foie.....	2.5
▪ extrait de levure.....	5
▪ chlorure de sodium.....	5
▪ gélose.....	12

pH= 7.4 à 25°C.

Autoclaver 20 minutes à 120°C. Ajouter aseptiquement 5-10 % de sang défibriné stérile

Gélose Thiosulfate Citrate Bile Saccharose (TCBS)

Formule :

▪ Peptone de caséine.....	5
▪ Peptone de viande.....	5
▪ Extrait de levure.....	5
▪ Citrate de sodium.....	10
▪ Thiosulfate de sodium.....	10
▪ Bile de bœuf desséchée.....	5
▪ Cholante de sodium.....	3
▪ Saccharose.....	20
▪ Chlorure de sodium.....	10
▪ Citrate terrique.....	1

- Bleu de thymol.....40mg
- Bleu de bromothymol.....40mg
- Gélose.....14
- pH= 8.6 stérilisé par 5min d'ébullition (ne pas autoclaver), (GUIRAUD, 2003).

Mode d'action :

- Les concentrations élevées en thiosulfate et en citrate de sodium ainsi que la forte alcalinité du milieu inhibent fortement la croissance des entérobactéries.
- La bile de bœuf et le cholate de sodium ralentissent la culture des entérocoques et inhibent le développement des germes à Gram positif.
- Par acidification du milieu, résultant de la fermentation du saccharose, les Vibrio provoquent le virage au jaune de l'indicateur au thymol et au bleu de bromothymol.
- A partir du thiosulfate, qui constitue une source de soufre, la production de sulfure d'hydrogène est révélée en présence de citrate ferrique. Tous les Vibrio sont H₂S-négatifs (ANONYME, 2010).

Gélose Viande-foie :

Formule :

- Base viande-foie.....30
- Glucose.....2
- Amidon.....2
- Sulfite de sodium.....2.5
- Sels de fer.....0.5
- Agar.....11

PH= 7.7 ± 0.1 à 25°C

Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Mode d'action :

- L'amidon favorise la germination des spores, alors que le glucose sert de source de carbone et d'énergie.
- Les sulfites de sodium, source de soufre pour les bactéries sulfitoréductrices est réduit en sulfure de fer noir en présence des sels de fer.

Réactif de KOVACS

Formule :

- Paradiméthylamino-benzaldéhyde.....5,0
- Alcool amylique.....75,0
- HCL pur.....35,0
- Eau permutée.....1000 ml

Fuchsine de Ziehel

- Fuchsine basique.....1
- Alcool éthylique à 90o.....10 ml
- Phénol.....5
- Eau distillée.....100 ml

Doit être utilisée diluer au 1/15 pour la coloration de Gram.

Lugol

- Iode.....1
- Iodure de potassium.....2
- Eau distillé.....300 ml

Violet de gentiane

- Violet de gentiane.....1
- Ethanol à 90o.....10 ml
- Phénol.....2
- Eau distillée.....100 ml

Annexe II :

(Journal Officiel De La République Algérienne N°35, 27 mai 1998).

**Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998
modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994
relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires (les
poissons et produit de la pêche).**

TABLEAU IV				
CRITERES MICROBIOLOGIQUES		DES POISSONS		
PRODUITS		n	c	m
1. Poissons	tranches panes ou non réfrigérés	et filets	de poissons	frais
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Germes aérobies à 30° C ▪ Coliformes fécaux ▪ <i>Staphylococcus aureus</i> ▪ <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs à 46° C ▪ <i>Salmonella</i> ▪ <i>Listeria monocytogenes</i> 		5 5 5 5 5 /	3 3 3 3 0 /	10 ⁵ 10 10 ² 10 absence absence
2. Poissons	tranches panes ou non, filets de poissons congelés ou surgelés.			
<ul style="list-style-type: none"> ▪ germes aérobies à 30° C ▪ coliformes fécaux ▪ <i>Staphylococcus aureus</i> ▪ <i>clostridium</i> sulfito-réducteurs à 46° C ▪ <i>Salmonella</i> ▪ <i>Listeria monocytogenes</i> 		5 5 5 5 5 /	3 3 3 3 0 /	5.10 ⁴ 10 10 ² 2 absence absence
3. Poissons frais et congelés				
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Germes aérobies à 30° C ▪ Coliformes fécaux ▪ <i>Staphylococcus aureus</i> ▪ <i>Salmonella</i> ▪ <i>Listeria monocytogenes</i> 		5 5 5 5 /	3 3 3 0 /	10 ⁶ 4 10 ³ Absence absence