

## **Listes des figures**

*Figure1 :Cycle biologique général des oceans*

**Figure 2 : Famille des Sparidés**

**Figure 3 :** Action de la température sur la multiplication et toxinogénèse des micro-organismes.

**Figure 4 : Préparation de la solution mère.**

**Figure 5 : Recherche de Vibrien parahaemolyticus.**

**Figure 6 : Dénombrement de la FMAT à 30°**

**Figure 7 : Contamination des branchies du Pagre par les Entérobactéries**

**Figure 8 : Contamination de la du Pagre par la flore globale et les pseudomonas sp..**

**Figure 9 : Contamination des branchies du Pagre par la Flore globale et les pseudomonas sp.**

## **LISTES DES PHOTOS**

**Photo 1 : Espèce Parus Coeruleostictus**

**Photo 2 : Echantillons écailles prêts à l'analyse.**

**Photo 3 : Prélèvement de la chair.**

**Photo 4 : Revivification des germes.**

**Photo 5 : Comptage des colonies.**

du genre Vibrion

**Listes des schéma**

**Schéma 1 : Squelette des poissons osseux.**

**Schéma 2 : Structure des branchies**

## Listes des Tableaux

**Tableau 1 : Composition bactérienne des poissons.**

**Tableau 2 : Pourcentages d'acides aminés essentiels de différentes protéines.**

**Tableau 3 : Composition actuelle**

**Tableau 4 : Répartition et origine géographique des 113 souches étudiées de *Vibrio parahaemolyticus***

**Tableau 5 : Les 3 catégories de microbes des aliments en fonction de leur température.**

**Tableau 6 : T.I.A.C. recensés en France (1993-1997).**

**Tableau 7 : Intoxications alimentaires d'origine microbienne.**

**Tableau 8 : Interprétation du test de l'halophilie**

**Tableau 9 : Contamination du Pagre par la FMAT .**

**Tableau 10 : Contamination du Pagre par la FAP.**

**Tableau 11 : Contamination du Pagre par les bactéries du genre *Pseudomonas***

**Tableau 12 : Contamination du Pagre par les Entérobactéries.**

**Tableau 13 : Contamination du Pagre par les bactéries du genre *Vibrio*.**

Tableau 14 : Contamination globale des 102 échantillons du Pagre à points bleus par les Vibrions.

## **SOMMAIRE**

### **Pages**

<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	1
----------------------------------	---

## ***PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

<b><u>CHAPITRE I : CARACTERISTIQUES DES MERS TROPICALES</u></b> .....	3
---	---

<b>I- <u>CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES</u></b> .....	3
---	---

<b>1. LE pH ET LE CO<sub>2</sub> DISSOUT</b> .....	3
--	---

<b>2. LA TEMPERATURE</b> .....	3
--------------------------------	---

<b>3. L'OXYGENE DISSOUS</b> .....	3
-----------------------------------	---

<b>4. LA SALINITE</b> .....	4
-----------------------------	---

<b>II- <u>CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES</u></b> .....	4
---	---

<b>1. LE RÔLE DES BACTERIES DANS LE MILIEU MARIN</b> .....	4
--	---

<b>2. NATURE ET DISTRIBUTION DES BACTERIES MARINES</b> ...	4
--	---

<b>2.1 NATURE</b> .....	4
-------------------------	---

<b>2.1.1. Les bactéries du genre Vibrio</b> .....	5
---	---

2.1.2. Les bactéries du genre Clostridium .....	5
2.1.3. La flore .....	5

## **CHAPITRE II : CARACTERISTIQUES ANATOMIQUE ET CHIMIQUES DES MERS TROPICALES .....**

7

### **I- CARACTERISTIQUES ANATOMIQUES DU POISSON .....**

7

#### **1. LES NAGEOIRES .....**

7

##### **1.1. NAGEOIRES PAIRES .....**

7

##### **1.2. NAGEOIRES IMPAIRES .....**

8

#### **2. LES MUSCLES .....**

8

#### **3. L'APPAREIL RESPIRATOIRE .....**

9

### **II- COMPOSITION CHIMIQUE DU POISSON .....**

9

#### **1. LES PROTEINES .....**

10

#### **2. LES LIPIDES ... ..**

11

#### **3. LES EXTRAITS AZOTES .....**

11

## **CHAPITRE III : CARACTERISTIQUES DE L'ESPECE SPARUS COERULEOSTICTUS .....**

12

## **CHAPITRE IV : CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES DES POISSONS DES MERS TROPICALES.....**

14

### **I- PRINCIPALES FAMILLES BACTERIENNES RECHERCHEES .....**

14

#### **1. *VIBRIONACEAE* .....**

14

##### **1.1. LE GENRE *VIBRIO* .....**

14

1.2. LE GENRE <i>AEROMONAS</i> .....	15
2. <i>LES ENTEROBACTERIES</i> .....	16
3. <i>LES PSEUDOMONCEA</i> .....	16
<b>II- <u>CLASSIFICATION DES BACTERIES DE POISSON</u></b> <b><u>EN FONCTION DE LEUR TEMPERATURE</u></b> .....	17
1. <u>EFFETS DE LA TEMPERATURE</u> .....	17
1.1. LES BACTERIES THERMOPHILES .....	18
1.2. LES BACTERIES MESOPHILES .....	18
1.3. LES BACTERIES PSYCHROPHILES .....	19
<b>III- <u>CONTAMINATION DES POISSONS</u></b> .....	20
1. <u>ORIGINE DE LA CONTAMINATION DES POISSONS</u> .....	21
1.1. <u>CONTAMINATION ANTERIEURE A LA PECHE</u> .....	21
1.1.1. Contamination des eaux de pêche .....	21
1.1.2. Contamination d'origine aquatique .....	21
1.2. <u>CONTAMINATION POSTERIEURE A LA PÊCHE</u> .....	22
1.2.1. Vecteurs animés .....	22
1.2.2. Vecteurs inanimés .....	22
2. <u>NATURE DES BACTERIES DU POISSON</u> .....	23
2.1. FLORE SAPROPHYTE .....	23
2.2. FLORE PATHOGENE .....	24
3. LOCALISATION DES BACTERIES DES POISSONS.....	24
4. VOIES DE PENETRATION .....	25
5. FACTEURS INFLUENCANT LA CONTAMINATION BACTERIENNE DU POISSON .....	26

<b><u>CHAPITRE V</u> : CONSEQUENCES ECONOMIQUES ET SANITAIRES DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE DU POISSON .....</b>	<b>27</b>
<b>I- <u>INCIDENCES ECONOMIQUES</u> .....</b>	<b>27</b>
<b>1. <u>LES BACTERIES DE L'ALTERATION</u> .....</b>	<b>27</b>
<b>2. <u>LES MECANISMES DE L'ALTERATION BACTERIENNE DU POISSON</u> .....</b>	<b>27</b>
<b>3. <u>INCIDENCES SANITAIRES</u> .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. <u>INTOXINATION A CLOSTRIDIUM BOTULINUM</u> .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. <u>AUTRES MALADIES BACTERIENNES TRANSMISES PAR LE POISSON</u>.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.1. Toxi-infection à <u>Vibrio</u> .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2. Toxi-infection à <u>Salmonella</u> .....</b>	<b>31</b>



## **DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

### **Pages**

<b><u>CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES</u></b>	<b>34</b>
<b>I- <u>MATERIEL</u></b>	<b>34</b>
1. <u>PRODUITS ANALYSES</u>	34
2. <u>MATERIEL DE LABORATOIRE</u>	35
<b>II- <u>METHODES</u></b>	<b>38</b>
1. <u>ECHANTILLONNAGE</u>	38
2. <u>PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE</u>	38
2.1. <u>PRISE DE TEMPERATURE</u>	38
2.2. <u>ECAILLAGE DU POISSON</u>	38
2.3. <u>PREPARATION DE LA SUSPENSION MERE</u> <u>ET DES PRISES D'ESSAIS</u>	38
2.3.1. Prises d'essai	38
➤ Prélèvement de la chair	
➤ Prélèvement des branchies	
2.3.2. Préparation de la suspension mère	38
2.3.3. Dilution	40
2.4. <u>ANALYSES BACTERIOLOGIQUES</u>	40
2.4.1. Recherches des bactéries du genre Vibrio...	40

2.4.2.	Dénombrement de la flore .....	44
2.4.3.	Dénombrement des entérobactéries .....	46
2.4.4.	Recherche des bactéries du genre Pseudomonas .....	47

## **CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION** ..... 48

### **I- RESULTATS** ..... 48

### **II- DISCUSSION** ..... 51

#### **1. METHODOLOGIE** ..... 51

#### **2. CONTAMINATION BACTERIENNE DU PAGRE A POINTS BLEUS** ..... 51

##### **2.1 CONTAMINATION DU PAGRE A POINTS BLEUS PAR LES ENTEROBACTERIES ET LES BACTERIES DU GENRE PSEUDOMONAS** ..... 52

###### **2.1.1. Contamination du Pagre par les Entérobactéries** ..... 52

###### **2.1.2. Contamination du Pagre par les bactéries du genre Pseudomonas** ..... 53

##### **2.2. CONTAMINATION DE LA CHAIR PAR LES 2 TYPES DE FLORES (F.M.A.T ET F.A.P)** ..... 54

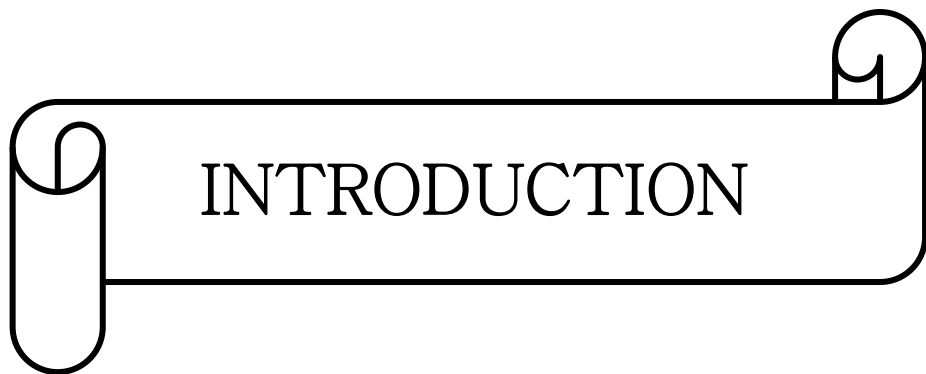
##### **2.3. CONTAMINATION DU PAGRE A POINTS BLEUS PAR LA FLORE GLOBALE (F.M.A.T ET F.A.P)** ..... 55

##### **2.4. CONTAMINATION DU PAGRE PAR LES VIBRIONS** ..... 56

#### **3. PROPOSITIONS D'AMELIORATION** ..... 57

## **CONCLUSION GENERALE** ..... 61

## **BIBLIOGRAPHIE**



## INTRODUCTION

Le poisson est une denrée d'importance primordiale dans l'alimentation et dans l'économie des pays côtiers d'Afrique de l'Ouest comme le Sénégal.

Celui -ci avec ses 700 Km de côtes se situe dans une zone classée parmi les plus poissonneuses du monde, dont le plancton est renouvelé de façon permanente, par les courants marins.

De ce fait, la pêche connaît ici un essor considérable et permet le développement des exportations vers l'Union Européenne, le Japon et le Canada.

Mais de temps en temps, les produits exportés s'avèrent non conformes sur le plan sanitaire aux critères microbiologiques imposés par les pays importateurs. Ces critères ayant été définis à partir des poissons des mers tempérées, il reste à savoir si ceux-ci sont adaptés aux poissons des mers tropicales.

Toutefois, le Sénégal est confronté à des problèmes liés à la non-conformité de leurs produits sur le plan sanitaire.

Autrement dit, le niveau élevé de la contamination des poissons exportés, responsable de leur non conformité est-elle due à une contamination initiale et ou surajoutée excessive(s).

Or, il se trouve que peu de travaux ont été réalisés sur le sujet (**FAYE** 2002 ; **MIASSAGOUMOUKA** 2002).

C'est pour contribuer à une plus grande connaissance des flores de contamination et à l'amélioration de la qualité des poissons utilisés comme matières premières au Sénégal que nous avons choisi de travailler sur le thème suivant :

**« L'étude de la contamination initiale du poisson des mers tropicales : Cas du Pagre à points bleus (*Sparus coeruleostictus*) »**

Notre travail comprend 2 parties :

- La première partie sera consacrée à la **synthèse bibliographique**,
- La seconde, traite de l'**étude expérimentale**.

Cette dernière partie comporte le matériel et les méthodes ainsi que les résultats suivis de la discussion et des recommandations.

## *PREMIERE PARTIE*

# *SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE*

## **CHAPITRE I : CARACTERISTIQUES DES MERS TROPICALES**

### **I- CARACTERISTIQUES PHYSICO –CHIMIQUES**

#### **1. LE pH ET LE CO<sub>2</sub>**

Le pH traduit la concentration en ions Hydrogène (H). Il donne une bonne indication de la quantité de gaz carbonique dissoute dans l'eau de mer. Le pH est d'autant plus bas quand la teneur en CO<sub>2</sub> est élevée. Normalement, l'eau de mer est alcaline et dans les zones océaniques les eaux de surface présentent des variations très faibles : pH = 8 à 8,3.

Toutefois, du fait de l'activité biologique, on note des variations du pH entre le jour et la nuit ; la nuit, l'arrêt de l'assimilation chlorophyllienne fait augmenter la teneur en CO<sub>2</sub> et le pH nocturne est donc plus acide que le pH diurne.

De plus, en profondeur, le pH peut diminuer de 7,8 à 7,6 à la suite de l'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> (14).

#### **2. LA TEMPERATURE**

Les eaux tropicales ont une température moyenne annuelle supérieure à +20°C, contre des températures comprises entre + 6° et +20°C pour les eaux tempérées. Ces températures varient en fonction de la saison , avec des écarts annuels faibles de l'ordre de 4,5°C pour les mers tropicales alors qu'en zone tempérée, ils peuvent atteindre 8 à 15°C.

Ces différences de température jouent un rôle important dans la circulation océanique et dans la vie des organismes marins. Ces écarts sont de très faibles amplitudes, environ +0,5°C au cours de la journée (variation de l'ensoleillement). (14)

#### **3. L' OXYGENE DISSOUS**

La teneur est en général inférieure à 10cc/l. Le taux d'oxygène dissout diminue quand la salinité et la température s'élèvent. La teneur est plus forte dans les eaux froides que dans les eaux tropicales (7 à 8 cc contre 4cc).

Dans les régions côtières tropicales, on observe des phénomènes localisés importants ; la mangrove est une zone à faible teneur en O<sub>2</sub> dissout, alors que le *faciès corralien* se développe toujours dans les zones à forte oxygénation.

#### **4. LA SALINITE**

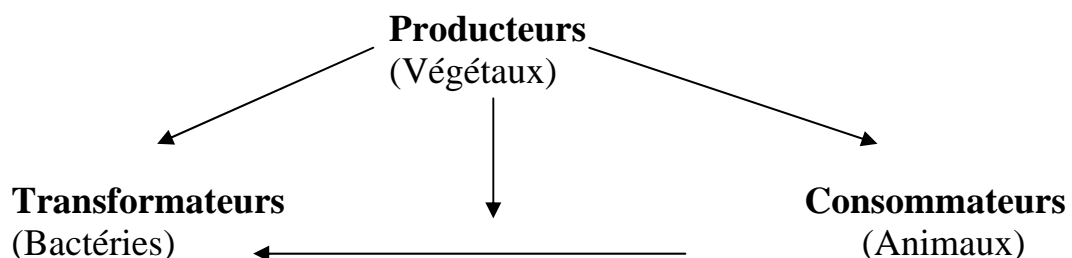
Les eaux tropicales sont caractérisées par une forte salinité, 35,5 à 36,5%. Toutefois, sous l'équateur, du fait des fortes précipitations, il se crée près des continents des eaux équatoriales à vie éphémère, cyclique, une salinité comprise entre 35 et 35,5 % avec parfois dans certaines zones particulières un abaissement de la salinité jusqu'à 34,5%.

Dans les mers tropicales, se trouvent en surface des eaux salées mais à température élevée donc légères.

## **II- CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES**

### **1. LE RÔLE DES BACTERIES DANS LA PRODUCTION PRIMAIRE**

Les bactéries jouent un rôle essentiel dans le cycle des sels nutritifs car elles assurent la minéralisation des matières organiques. Les composés azotés (nitrates, nitrites, sels ammoniacaux) et phosphorés se trouvent grâce à elles, remis à la disposition des végétaux chlorophylliens (03).



**Figure 1 : Cycle biologique général des océans**

## **2. NATURE ET DISTRIBUTION DES BACTERIES MARINES**

### **2.1. NATURE**

Juste après la capture, le poisson ne renferme pas de bactéries dans le muscle mais sur la peau, dans les branchies et dans les viscères.

La majorité de cette flore bactérienne (à l'exception du *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Listeria monocytogenes*) est de nature banale, donc inoffensive. C'est au cours de la manutention à bord, à terre et au cours de sa transformation et de la commercialisation que le poisson risque de se contaminer par une flore pathogène.

Les différents groupes de germes recherchés dans les produits de la pêche sont au nombre de quatre (04). Mais, parmi ces bactéries, deux genres présentent une importance en santé publique ; il s'agit des *Vibrios* et des *Clostridium*. Ces deux genres cohabitent fréquemment avec une flore banale souvent à l'origine de l'altération du poisson. (01)

#### **2.1.1. Les bactéries du genre Vibrio**

Il s'agit essentiellement des *Vibrios* halophiles tels que *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) et *Vibrio alginolyticus* (*V. alginolyticus*).

Ils sont retrouvés en grand nombre dans les produits de mer et les eaux côtières, ils croissent sur les aliments de mer et ne produisent pas de spores résistantes et peuvent être facilement détruits par la chaleur.

Quant au *vibrio cholerae*, il est traditionnellement considéré comme transporté par l'eau, mais l'usage d'eau polluée dans une installation de transformation de fruits de mer peut mener à la contamination du produit. C'est un organisme qui n'est pas résistant à la chaleur et donc, comme *V. parahaemolyticus*, il est détruit par les procédés normaux de cuisson. Les travaux réalisés par *SEYDI* et *COLL.* ont mis en évidence dans les poissons frais des côtes sénégalaises, le genre *Vibrio parahaemolyticus*. (34)

#### **2.1.2. Les bactéries du genre Clostridium**

Les spores de *C. botulinum* sont largement répandues dans la nature et on en trouve fréquemment sur les matières brutes.

Pour *HUSS*, *C. botulinum* fait partie intégralement de la flore commensale des poissons. *NICKODENUSZ* et *COLL.* cités par *BERRUYER* (03) isolent sur



les poissons capturés au large des côtes allemandes Clostridium type E et C. perfringens.

Les types A , B, C, D et F se rencontrent également de façon sporadique dans d'autres parties du monde.

### 2.1.3. La flore

L'eau de mer contient une flore voisine de celle des eaux douces, mais cette flore est adaptée aux conditions de salinité Tableau 1.

Elle comprend la flore halophile, mésophile et psychrotrophe, les principaux micro-organismes rencontrés appartiennent généralement aux genres pseudomonas, Acinobacter, Flavobacterium, Bacillus, Micrococcus, Corynebacterium et Flavobacterium.

**Tableau I : Contamination bactérienne des poissons**

Type de contamination	Groupes de bactéries		Taux de contamination
<u>Primaire</u> = bactéries propres aux poissons	Gram (+) Mésophiles (2-3 %) - Micrococcus - Corynéformes - Erysipelothrix rhusiopathiae = (Bacille du Rouget) - Clostridium botulinum type E - Listeria	Gram (-) Psychrotrophes 95 % - Pseudomonas - Aéromonas - Flavobacterium - Moraxella - Alcaligenes - Acinetobacter - Cytophaga - Photobacterium  Entérobactéries rares (2 – 3 %) surtout pour les Colliformes.	<u>Tube digestif</u> $10^6 - 10^8 / \text{ml}$  <u>Branchies</u> $10^3 - 10^6 / \text{g}$
<u>Secondaire</u> : bactéries surajoutées	- Staphylococcus - Clostridium	D'origine humaine : - Entérobactéries	<u>Peau</u> $10^3 - 10^6 / \text{cm}^2$

= par contamination fécale	- Streptococcus	Morganella (ex Proteus) Klebsiella- Entérobacter E. COLI – Salmonella - Psychrotrophes moins nombreuses, apport surtout par l'eau.	<u>Branchies</u> $10^2 - 10^5/\text{cm}^2$
----------------------------	-----------------	---	---

## **CHAPITRE II : CARACTERISTIQUES ANATOMIQUE ET CHIMIQUE DU POISSON**

La microflore du poisson a des caractéristiques propres qui doivent être prises en compte pour maîtriser la conservation et la transformation.

Le poisson constitue un substrat particulier pour les bactéries, compte tenu de ses caractéristiques anatomiques et biochimiques.

### **I- CARACTERISTIQUES ANATOMIQUES DU POISSON**

#### **Photo 1**

Comme tous les Sparidae, Sparus Coeruléostictus dit Pagre à points bleus, possède un corps perciforme, haut et comprimé avec un profil frontal élevé et typique : la nageoire dorsale unique est constituée de 10 à 13 épines et de 10 à 15 rayons noirs, l'anale de 3 épines et de 8 à 12 rayons.

La caudale est fourchue, les mâchoires sont pourvues de 4 à 6 fortes canines antérieures et de 2 rangées latérales de dents molariformes.

Les deux premières épines de la nageoire dorsale sont très courtes, les 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> sont effilées, nettement plus longues que les suivantes et la région dorsale est constellée de points bleu vif.

C'est une espèce rencontrée depuis la côte (20 cm de profondeur) jusqu'au rebord du plateau continental (200 m de profondeur) du Sénégal à l'Angola.

Cette espèce peut atteindre 55 cm de long.

**Source 19**

## **1.1 LES NAGEOIRES**

Les poissons présentent des nageoires paires et des nageoires impaires.

### **1.1.1 LES NAGEOIRES PAIRES**

Elles en ont une de chaque côté. Ces nageoires symétriques correspondent aux membres chez les autres vertébrés impairs. Toutes ont une armature de soutien : les rayons.

Les nageoires paires sont les nageoires pectorales et les nageoires ventrales :

- Les nageoires pectorales sont bien développées, insérées en arrière de l'opercule ou des fentes brachiales. Les faces latérales du corps sont réunies au crâne par la ceinture scapulaire.
- Les nageoires ventrales comportent souvent à leur base une scapulaire, grosse écaille particulière, dite « processus solaire ». Elles sont articulées par une ceinture pelvienne sans lien fixe avec la colonne vertébrale. La position du point d'insertion des nageoires pelvienne par rapport à celui des nageoires pectorales est très importante dans la classification des téléostéens :
  - Pelviennes insérées nettement en arrière des pectorales (téléostéens thoraciques)
  - Pelviennes insérées nettement en avant des pectorales (téléostéens jugulaires).

### **1.1.2 LES NAGEOIRES IMPAIRES**

Ce sont les nageoires caudales (queue), anales et dorsales ;

- la caudale a deux lobes égaux chez les téléostéens (elle est dite homocerque) et a deux lobes très inégaux chez les sélaciens (elle est dite hétérocerque)
- l'anale est unique ou dédoublée : elle est toujours insérée sur le bord ventral du poisson en arrière de l'anus
- la dorsale est unique, double ou triple. Souvent dans une dorsale unique, on peut reconnaître deux (2) dorsales accolées (la première, épineuse et la deuxième, molle), séparées seulement par une échancrure plus ou moins marquée.

## **1.2. LES MUSCLES**

Ils constituent la partie la plus intéressante au point de vue alimentaire et la plus importante en poids (35 à 65% du poids total).

Les muscles du tronc (ceux qui forment les filets) sont répartis en 3 groupes : les muscles rouges, les muscles des nageoires et les muscles grands latéraux.

- Les muscles rouges sont colorés, parce qu'ils sont très fortement irrigués. Ils forment une lame amincie sous cutanée latérale.
- Les muscles des nageoires : Eux, sont blancs, dorsaux et ventraux.
- Les muscles grands latéraux sont blancs également, symétriques de part et d'autre de la colonne vertébrale. Ils forment la plus grande masse du corps. Chaque muscle latéral est composé de 2 fuseaux accolés ; chaque fuseau est constitué par l'emboîtement de plaques en chevrons facilement individualisables, surtout à la cuisson. (23)

## **1.3. L'APPAREIL RESPIRATOIRE**

Il est constitué de branchies et de cavité branchiale. Les poissons respirent dans l'eau grâce à leurs branchies. Ce sont deux groupes symétriques d'arc sur lesquels s'insèrent comme des dents de peigne, des lamelles et des filaments branchiaux richement vascularisés. Elles sont le siège des échanges gazeux.

La cavité branchiale, quant à elle, loge les branchies sur les côtés du pharynx ; elle est ouverte en avant, dans la bouche, en arrière et à l'extérieur.

En filtrant l'eau, les branchies retiennent toutes les impuretés qui peuvent s'y trouver, elles constituent de ce fait, un foyer de contamination microbienne.

Figure 2 : **Structure des branchies** (Source 23)

## **2. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES**

La composition chimique du poisson varie considérablement d'une espèce à une autre, d'un individu à un autre selon l'âge, le sexe, l'environnement et la saison.

Les poissons et les mammifères ont les mêmes constituants principaux, bien que certaines différences existent sur le plan quantitatif.

Les variations dans sa composition chimique du poisson sont nettement liées à son alimentation. C'est ainsi qu'en période d'alimentation copieuse, la teneur en protéines du tissu musculaire augmente d'abord légèrement et aussitôt après, la teneur en lipides croît de façon marquée et rapide. Toutefois, le poisson passera des périodes de famine, soit pour des raisons naturelles ou physiologiques (période de froid ou migration), soit à cause de facteurs extérieurs tels que la pénurie d'aliment.

La fraction lipidique est souvent l'élément qui subit les variations les plus fortes, attestant au sein d'une même espèce, une évolution saisonnière caractéristique avec un minimum pendant la période de froid. (14)

### **2.1. LES PROTEINES**

Les protéines du poisson constituent une excellente source, les protéines du muscle du poisson peuvent être divisées en 3 groupes :

- les protéines structurelles (actine, myosine et tropomyosine) qui constituent 70 à 80% des protéines totales chez le poisson et 40% chez les mammifères.
- Les protéines sarcoplasmiques (myoalbumine, globuline, enzymes) qui constituent 25 à 30% des protéines.
- Les protéines du tissu conjonctif (collagène), constituent environ 3% des protéines des téléostéens.

Le point iso électrique des protéines du poisson se situe à des niveaux de pH de l'ordre de 4,5 à 5,5. A ce pH, les protéines sont électriquement neutres et

moins hydrophiliques qu'à l'état ionisé, ce qui veut dire que leur capacité de rétention de l'eau ainsi que leur solubilité sont minimales.

Comme pour les protéines du lait, des œufs et de la viande, celles du poisson ont une valeur biologique importante, étant donné qu'elles renferment tous les acides aminés essentiels.

**Tableau II : Pourcentage d'acides aminés essentiels de différentes protéines**

<i><b>ACIDE AMINE</b></i>	<i><b>POISSON</b></i>	<i><b>LAIT</b></i>	<i><b>BOEUF</b></i>	<i><b>ŒUF</b></i>
<b>Lysine</b>	8,8	8,1	9,3	6,8
<b>Tryptophane</b>	1,0	1,6	1,1	1,9
<b>Histidine</b>	2,0	2,6	3,8	2,2
<b>Phénylalanine</b>	3,9	5,3	4,5	5,4
<b>Leucine</b>	8,4	10,2	8,2	8,4
<b>Isoleucine</b>	6,0	7,2	5,2	7,1
<b>Thionine</b>	4,6	4,4	4,2	5,5
<b>Méthionine</b>	4,0	4,3	2,9	3,3
<b>cystéine</b>	6,0	7,6	5,0	8,1
<b>Valine</b>				

## **2.2. LES LIPIDES**

Les lipides ont un rôle de réserves énergétiques et peuvent donc être classés comme dépôts de graisse, ces dépôts se trouvent surtout dans les tissus sous-cutané (entrailles), dans le tissu conjonctif entre les fibres musculaires (muscle blanc ou rouge) et dans la tête.

Contrairement aux lipides des mammifères, ceux des poissons sont formés d'acides gras insaturés à chaîne longue (de 14 à 22 atomes de carbone).

Ce sont des glycérides, contenus dans la graisse de poisson, qui donnent l'odeur caractéristique de l'huile de poisson. La graisse de poisson contient également une importante quantité d'oléine de l'ordre de 50 à 60%. Ces glycérides renferment également une plus grande proportion de phospholipides que les autres chairs. Dans le hareng par exemple, **REWALD** cité par **HUSS**, en

a dosé 1,187% contre 0,72% dans la viande de bœuf. Ce contenu en phospholipides fait que la chair de poisson est un aliment particulièrement adapté pour restaurer et exciter les capacités vitales du système nerveux. (14)

### **2.3. EXTRAITS AZOTE**

Ce sont des composés non protéiques, de faible poids moléculaire, solubles dans l'eau et contenant de l'azote. Cette fraction représente 9 à 18 % de l'azote total des téléostéens.

Les constituants majeurs de cette fraction sont les bases volatiles telles que l'ammoniac et l'oxyde de triméthylamine (OTMA ), la créatine, les acides aminés libres, les nucléotides, bases pyriques et l'urée dans le cas des poissons cartilagineux

## **CHAPITRE III : CARACTERISTIQUES DE L'ESPECE « *SPARUS COERULEOSTICTUS* » DANS LA FAMILLE DES SPARIDAE**

La famille des Sparidés présente un corps généralement ovale et comprimé, d'où le nom de Brèmes de mers (mieux connus sur les côtes méditerranéennes sous l'appellation de Poissons blancs).

Hermaphrodites soit à l'état potentiel avec ovotestis plus ou moins caractérisé, soit à l'état fonctionnel (protandrique ou protogynique suivant les espèces).

Cette famille comporte 7 genres :

➤ Le genre DENTEX : 4 espèces

- *Dentex gibbosus* (denté bossu)
- *Dentex* (denté commun)
- *Dentex macrophthalmus* (denté à gros yeux)
- *Dentex maroccanus* (denté du maroc)

➤ Le genre SARPA : Une espèce

- *Sarpa salpa* (saupe)

➤ Le genre BOOPS : Une espèce

- *Boops boops* (bogue)

➤ Le genre SPONDYLIOSOMA : Une espèce

- *SpondylIOSoma cantharus* (dorade gris)

➤ le genre OBLADA : Une espèce

- *Oblada melanura* (oblade, blade)

➤ le genre DIPLODUS : 5 espèces :

- *Diplodus cervinus* (sar à grosses lèvres)
- *Diplodus vulgaris* (sar à tête noire)
- *Diplodus annularis*
- *Diplodus sargus* (sar commun)
- *Diplodus puntazzo* (sar à museau pointu)

➤ le genre SPARUS : 4 espèces

- *Sparus auriga* (pagre rayé)
- *Sparus caeruleostictus* (pagre à points bleus) Photo 3
- *Sparus aurata* (dorade royale)
- *Sparus pagrus* (pagre commun)

➤ le genre PAGELLUS : 4 espèces

- *Pagellus erythrinus* (pageot commun)



- *Pagellus bogaraveo* (dorade rose)
- *Pagellus acarne* (pageot acarné)

Selon **VALENCIENNES**, 1830, *Sparus coeruleostictus* est une espèce qui se fait très rare en Méditerranée, mais fréquent en atlantique tropicale jusqu'au Portugal.

Les adultes vivent généralement au fonds de 10 à 250 m, et les jeunes, généralement en surface. Les autres espèces sont rencontrées aussi bien en Méditerranée qu'en atlantique.

## **CHAPITRE IV :      CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES DES POISSONS DES MERS TROPICALES**

## **I- PRINCIPALES FAMILLES BACTERIENNES RECHERCHEES**

### **1. LES VIBRIONACEAE**

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives proches des entérobactéries et possédant une oxydase mais mobiles par cils polaires.

Cette famille est caractérisée par des bactéries ayant une forme incurvée ou allongée, de 0,3 à 1,3µm de diamètre et 1,4 à 5,0 µm de long. Ce sont des bactéries à gram négatif, mobiles par un flagelle polaire ou immobiles.

Leur répartition géographique est mondiale. Elles sont initialement aquatiques, rencontrées dans l'eau de mer, l'eau douce ou saumâtre en association avec les animaux aquatiques (06). Les principaux genres sont : Vibrio et Aéromonas.

#### **1.1. LE GENRE VIBRIO**

Les bactéries de ce genre, sont des bacilles incurvées, en virgule, mobiles grâce à un ou plusieurs cils polaires. Elles sont aérobies, anaérobies, se multiplient facilement sur des milieux usuels et sont capables de fermenter une large variété d'hydrate de carbone. Leur métabolisme est également respiratoire, puisqu'elles possèdent une chaîne respiratoire de transfert électrique, en particulier une oxydase très active correspondant à la présence de cytochrome dans la cellule.

Le métabolisme de l'arginine est une des particularités intéressantes de la plupart des espèces. Elles sont en effet capables en anaérobiose de décomposer l'arginine en ornithine, CO<sub>2</sub> et ammoniac grâce à une arginine dihydrolase.

Les pourcentages de l'ADN en cytosine guanine est assez différent pour les deux genres : environ 50% avec Vibrio, 60% avec les Aeromonas (12). Parmi les espèces pathogènes pour l'homme, il y a Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus et vulnificus. (Tableau III)

Tableau III : Composition actuelle du genre Vibrio

<b>Espèces pathogènes pour</b>	<b>Espèces non pathogènes pour</b>
--------------------------------	------------------------------------

I'homme	I'homme
<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. aestrianus</i>
<i>V. cholerae</i>	<i>V. anguillarum</i>
<i>V. carchariae</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>V. fluvialis</i>	<i>V. costicola</i>
<i>V. furnissi</i>	<i>V. diabolicus</i>
<i>V. Hollisae</i>	<i>V. diazotrophicus</i>
<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>V. mimicus</i>	<i>V. gazogenes</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>V. vulnificus</i>	<i>V. ichtyoenteri</i>
	<i>V. iliopiscarius</i>
	<i>V. logei</i>
	<i>V. marinus</i>
	<i>V. méditerraneei</i>
	<i>V. mytili</i>
	<i>V. navarrensis</i>
	<i>V. natriegens</i>
	<i>V. nereis</i>
	<i>V. nigripulchritudo</i>
	<i>V. ordalii</i>
	<i>V. orientalis</i>
	<i>V. pelagius</i>
	<i>V. penaicida</i>
	<i>V. proteolyticus</i>
	<i>V. salmonicida</i>
	<i>V. scophtalmi</i>
	<i>V. splendidus</i>
	<i>V. tapetis</i>
	<i>V. trachuri</i>
	<i>V. tubiashii</i>

## 1.2. LE GENRE AEROMONAS

Les genres qui le constituent sont aussi aquatiques, essentiellement des eaux douces. Leur pouvoir pathogène chez les poissons ou les batraciens a été souvent décrit : « red leg » de la grenouille, furonculose de la truite (*Aeromonas salmonicida*).

Leur présence constante et abondante dans les eaux de toute nature correspond vraisemblablement à un rôle privilégié qu'ils assumeraient dans les écosystèmes aquatiques. (06)

## **2. LES ENTEROBACTERIES**

Ce sont des bacilles à gram négatif, en forme de bâtonnets courts, ne dépassant pas 0,5µm de diamètre. Elles sont mobiles par cils péritriches ou immobiles. La présence d'une capsule est fréquente dans le genre *Klebsiella*. Les entérobactéries sont aéro-anaérobies et se développent facilement sur milieux ordinaires.

Les principaux genres rencontrés chez l'homme sont :

- *Escherichia*
- *Klebsiella* – *enterobacter* – *Serratia* – *Hafnia*
- *Leminorella*
- *Proteus* – *Morganella* – *Providencia*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Yersinia*

### **➤ Le genre *Escherichia***

Ce sont des bactéries qui peuvent se développer en présence ou non d'oxygène. Ce sont des anaérobies facultatifs, mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles.

Ces bactéries utilisent une très large variété de composés organiques simples comme source d'énergie : sucres, acides aminés, acides organiques. Elles présentent l'aptitude à se multiplier à 44°C et à le faire en présence de sels biliaires ou d'autres agents tensioactifs, et dotées de propriétés analogues à la même température en 24 h au moins.

*Escherichia* réduit les nitrates et fermente un certain nombre de sucres en acide pyruvique et en acide lactique). L'espèce type est ***E. coli* (06)**.

## **3. LES PSEUDOMONACEAE**

Cette famille renferme comme principaux genres : *Escherichia Coli*, *Pseudomonas*, *altereromonas*, *Acinetobacter* et *Alcaligenes* :

- Etant donné le nombre et la variété de ses représentants, le genre *Pseudomonas* occupe une place privilégiée. Le vaste genre *Acinetobacter* joue un rôle voisin dans l'évolution biochimique du sel et de l'eau. Le genre restreint *Alcaligenes* dont les représentants sont fréquemment avec les bactéries du genre *Pseudomonas*.

- Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à gram négatif, généralement droits, mobiles par un ou plusieurs cils polaires. Ils cultivent facilement sur les milieux usuels en aérobiose à la température de 30°C. Leur métabolisme est strictement respiratoire.

Certaines espèces sont aussi capables d'utiliser les nitrates en anaérobiose. Ce qui tend à leur conférer un avantage écologique notable et à leur faire jouer un rôle important dans les processus de dénitrification.

L'espèce type rencontrée est *pseudomonas aeruginose*, ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux. Elle est, fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. (06)

## **II- CLASSIFICATION DES BACTERIES DE POISSON EN FONCTION DE LEUR TEMPERATURE**

La suppression, voire le freinage de la croissance bactérienne passe par la connaissance des facteurs conditionnant cette croissance. En effet, certains facteurs inhibent ou ralentissent la croissance bactérienne tandis, que d'autres la favorisent. Ces facteurs sont multiples ; certains sont de nature physique (température, degré de déshydratation de l'aliment ( $A_w$ ), l'acidité (pH), rayons ultraviolets et ionisants, hygrométrie), d'autres sont de nature chimique (présence d'hydrogène, de gaz carbonique, de sels, de sucre, de substances diverses etc.). Ces différents facteurs agissent aussi bien sur les micro-organismes que sur les denrées elles-mêmes. Parmi ces divers facteurs, nous ne citerons que quelques uns.

### **1. EFFETS DE LA TEMPERATURE**

Elle est le facteur essentiel. Selon **ROZIER (31)**, pour chaque espèce bactérienne, il existe une gamme de températures eugénésiques au-delà de laquelle, la croissance est nulle. Ainsi, on distingue 3 catégories de bactéries :

- celles qui aiment la chaleur : elles sont dites thermophiles
- celles qui se développent bien à des températures modérées : les mésophiles
- Et celles qui se portent bien quand les températures sont plus basses : les psychrophiles (aiment le froid).

Le tableau (IV) ci-dessous et les figures (03) permettent de mieux comprendre les températures de croissance des différents germes pour des espèces bactériennes rencontrées dans les denrées inhibées à 60°C (limite maximale). (29)

### 1.1. LES BACTERIES THERMOPHILES

Leur température optimale de croissance est habituellement située entre 45 et 55°C, avec une température maximale de croissance entre 55 et 70°C, ces bactéries ne se développent plus en dessous de 33°C.

Selon *ROZIER,et COLL.* (32), il est possible, sans préjuger de la température optimale, d'employer les thermo-thermotrophes, mésotrophes, psychrotrophes ou cryotrophes, pour des germes se développant au dessus de 45°C, entre 20 et 45 °C et en dessous de 20°C.

Ainsi, dans de nombreux ouvrages, la distinction entre le suffixe « phile » et « trope » n'est pas faite.

Les principaux thermophiles appartiennent aux genres *Clostridium* *Bacillus* *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Une incubation à 55°C permet de les isoler.

### 1.2. LES BACTERIES MESOPHILES

Le groupe des mésophiles, comprend des bactéries aussi bien pathogènes que d'altérations des aliments. Ces bactéries se développent à des températures modérées, avec un optimum situé entre 30 et 45 °C et une température minimale de croissance de l'ordre de 5 à 10°C.

A température optimale et dans un milieu favorable, le temps de génération des germes mésophiles est de moins d'une ½ heure. (10)

**Tableau IV: Répartition et origine géographique des 113 souches étudiées de *Vibrio parahaemolyticus***

<b>Homme = 37</b>	Coproculture = 36 Hémoculture = 1	Sénégal = 26 Guinée = 1 Madagascar = 1 France = 1 Gabon = 1 Vietnam = 3 Ceylan = 2 Thaïlande = 1 Espagne = 1
<b>Milieus Marins = 12</b>	Poissons = 6 Mollusques (moules) = 3 Crustacés = 3 (crevettes = 2, puces de mer = 1	Madagascar = 3 Japon = 2 Iran = 1 Sénégal = 3 Maroc = 1
<b>Eaux = 60</b>		Guadeloupe = 57 Madagascar = 1 France = 1 Iran = 1
<b><u>Origine inconnue</u> = 4</b>		Collections japonaise = 2, Belge = 1, Française = 1

### **1.3. LES BACTERIES PSYCHROPHILES**

Beaucoup d'auteurs ont classé dans le groupe des psychrophiles tout organisme capable de se développer à 0° C sans tenir compte de la température optimale de croissance.

**MORITA** (1975), cité par l'ICMSF (15) parvient à définir une température optimale de croissance pour les psychrophiles, située en dessous de 15°C, avec un minimum de 0°C et un maximum de 20°C.

Selon les mêmes auteurs, les organismes, capables de se développer en dessous de 0°C et ayant des températures optimale et maximale supérieures à celles requises pour le développement des psychrophiles sont appelés des psychrotrophes. Ils sont représentés par les bactéries à gram négatif, aérobies tels que les *Pseudomonas* qui sont souvent d'origine hydrique mais aussi par des *cocci* et bâtonnets à gram positif.

**Tableau V : Les trois catégories de microbes des aliments en fonction de leur température de croissance**

GERMES	Températures caractéristiques (°C)			Délai minimum entre 2 multiplications
	minimum	optimum	maximum	
<b>Thermophiles</b>	30-35	45-55	60	10 minutes
<b>Mésophiles</b>	5-10	30-40	45	20 minutes
<b>Psychrophiles</b>	-5 à +5	20-25	30	60 minutes

**(Source 31)**

### **III- CONTAMINATION DES POISSONS**

La bactériologie des poissons est d'abord le reflet de celle du milieu aquatique.

Elle est ensuite liée aux conditions de manipulation et de conservation après la capture.

La chair d'un poisson sain est presque stérile avant sa capture ; mais les branchies, la peau et le tube digestif hébergent une flore commensale plus ou moins abondante. (17)

- Peau :  $10^2$  à  $10^7$  germes/cm<sup>2</sup>
- Branchies :  $10^3$  à  $10^9$ /g
- Contenu intestinal :  $10^3$  à  $10^9$ /g.

Ces germes, après la mort du poisson, prolifèrent et envahissent les muscles (chair).



La flore de surface de poissons est constituée de actéries appartenant aux genres : *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Proteus*, *Vibrio* *Bacillus*, *Corynebacterium*.

La flore est plus ou moins psychrophile selon la température habituelle de l'eau (14).

## **1. ORIGINE DE LA CONTAMINATION DES POISSONS**

Selon **ROZIER (32)** et **SEYDI (33)**, on peut distinguer deux origines possibles de la contamination initiale des poissons :

- La contamination endogène
- La contamination postérieure à la pêche ou contamination exogène. (02)

### **1.1. CONTAMINATION ANTERIEURE A LA PÊCHE**

#### **1.1.1. Contamination des eaux de pêche**

C'est la contamination microbienne du poisson de son vivant et dans son milieu naturel. La composition de cette flore de contamination est généralement proche de celle du milieu aquatique (05).

#### **1.1.2. Contamination d'origine aquatique**

Ce sont des bactéries naturelles du milieu aquatique, et ont un métabolisme adapté aux conditions de vie de ce milieu.

Selon **HUSS (14)**, la flore microbienne du poisson qui vient d'être pêché en zone tempérée est surtout composée de bactéries psychrotrophes à gram négatif, aérobies ou anaérobies facultatives, alors que la tendance s'inverserait en zone tropicale avec une prédominance des bactéries à gram positif, plus mésophiles. Il est rejoint dans sa thèse par **PETIT (28)**.

Les deux auteurs ébauchent une classification de ces bactéries du milieu marin.

### **1.2. CONTAMINATION POSTERIEURE A LA PÊCHE**

La contamination postérieure à la capture des produits halieutiques survient au cours des manutentions, de l'entreposage et de la transformation.

La contamination exogène demeure la plus fréquente et à des origines multiples.

Elle fait intervenir deux types de vecteurs :

- Les vecteurs animés
- Les vecteurs inanimés

### 1.2.1. Vecteurs animés

Ils sont représentés par l'homme et les animaux.

#### ➤ **L'homme**

Selon **HOBBS** cité par **SEYDI (33)**, l'homme constitue la source la plus fréquente de contamination exogène des denrées alimentaires d'origine animale. Il intervient comme vecteur passif et actif. (22)

- **Vecteur passif**

L'homme peut assurer le transfert de germes, présents sur ses mains, ses vêtements, ses bottes souillées, lors de la manipulation des poissons. Ainsi, un défaut d'hygiène peut entraîner la dissémination du germe parfois dangereux. (22)

- **Vecteur actif**

L'homme est parfois un réservoir de germes. Il peut être porteur sain, malade ou convalescent, excréteur de germes dangereux. Ainsi, les personnes atteintes d'infections respiratoires (pneumonie, rhume, angine, bronchite, tuberculose etc.), sont des vecteurs actifs de contamination à travers les expectorations et les crachats. C'est aussi le cas des manipulateurs présentant des lésions tégumentaires (plaies suppurées, furoncles, eczémas infectés).

D'après **ROZIER** et **COLL. (32)**, les germes cutanés s'incruster dans les glandes sudoripares et dans les follicules pileux.

Même un lavage soigneux à l'aide d'antiseptique est inefficace.

### 1.2.2. Vecteurs inanimés

Ce sont des éléments inertes ou souvent des facteurs de l'environnement et du matériel en contact avec les poissons. Il s'agit principalement de l'air, du sol, de l'eau, des locaux, du matériel et des équipements.

- L'air

L'air véhiculant de la poussière peut renfermer des quantités de micro-organismes responsables d'altération ou de maladie. Il s'agit le plus souvent des germes d'altérations du genre *Pseudomonas* d'après les travaux de **SEYDI**.(33)

- Le sol

Le sol constitue une source importante de micro-organismes, notamment de nombreux germes dits telluriques. Les germes sont issus des déchets d'animaux et végétaux (matières fécales, matières en décomposition).

- L'eau

L'eau est une matière très utilisée dans la filière de la pêche, pour le nettoyage, pour la fabrication de la glace et pour d'autres opérations. Son utilisation est donc incontournable.

Cependant, même après ozonisation ou chloration, un certain nombre de germes dits saprophytes subsistent comme ceux des genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* qui n'en sont pas moins dangereux pour l'altération des denrées. (24)

## 2. NATURE DES BACTERIES DU POISSON

L'étude de la nature des bactéries des poissons selon **BOURGEOIS** et **LEVEAU** (09), vise deux aspects importants pour le consommateur et le produit lui-même : c'est l'aspect sanitaire et économique. Et en fonction de leur rôle sur la qualité hygiénique et marchande des produits, **ROZIER** et **COLL.** (32) les classent en deux catégories :

- la flore saprophyte
- la flore pathogène

## 2.1 FLORE SAPROPHYTE

Ce sont des bactéries en général sans incidence sur la santé humaine. Elles sont surtout à Gram négatif, représentées par deux familles importantes : les entérobactériacées et les Pseudomonacées avec le genre *Pseudomonas*.

Les bactéries à Gram positif sont peu nombreuses et se retrouvent surtout dans la famille des Micrococcacées avec le genre *Micrococcus*, *Streptococcus*, en particulier les Streptocoques fécaux ou du groupe (entérocoques). (02)

La flore microbienne du poisson fraîchement capturé dans des eaux tempérées est souvent dominée par des bactéries psychrotrophes citées plus haut.

Un facteur plus important pourrait être la température requise par ces bactéries pour proliférer.

**SHEWAN** (1997), cité par **HUSS** (14) a isolé une proportion bien plus élevée de bactéries Psychrotrophes dans les poissons d'eaux froides ou tempérées, et a observé que seuls 5% de la flore des poissons de la mer du Nord pouvaient se développer à 37°C, contre 55% pour celle des poissons capturés au large des côtes Mauritanienes (02).

En conditions anaérobies ou de tension d'oxygène basse, la charge microbienne est plus faible, ne dépassant pas 10<sup>6</sup>g de poisson. (02)

## 2.2 FLORE PATHOGENE

Les poissons pêchés au large des côtes, contiennent rarement des bactéries pathogènes pour l'homme. C'est l'avis de **BERRUYER** (09) et de **HUSS** (14). Au contraire, **NICKODENUSZ** et coll. cités par **BERRUYER** (03) isolent sur les poissons capturés au large des côtes Allemandes *Clostridium botulinum* type E et C. *perfringens*. Pour **HUSS**, *Clostridium botulinum* et *Vibrio Parahaemolyticus* font partie intégrante de la flore commensale des poissons d'eau douce.

Les travaux de **SEYDI** et **COLL.** (34), portant sur les poissons frais des côtes sénégalaises ont permis l'isolement de *Vibrio Parahaemolyticus*, rencontrés le plus souvent dans les estuaires et le long des côtes. Les genres *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Clostridium* et l'espèce *Vibrio Cholerae* sont très rarement impliqués dans les toxico infections alimentaires suite à une consommation des poissons.

Erysipelothrix rhusiopathiae ou bacille du rouget du poisson, provoque de nombreux accidents, surtout au Japon, lors des manipulations. (28)

### **3. LOCALISATION DES BACTERIES DES PRODUITS DE LA PECHE**

Les micro-organismes se rencontrent initialement sur toutes les surfaces externes en contact direct avec l'eau de mer (14). La localisation des bactéries des produits de la pêche a une tendance plutôt élective, c'est le mucus de la peau, des branchies, mais également des intestins qui se contaminent par le biais de l'alimentation.

Dans le poisson, les bactéries ont une localisation plus ou moins élective. On les trouve au niveau de la peau, des branchies qui se contaminent par contact direct avec une eau de mer polluée, lors de la respiration et des déplacements du poisson dans son eau de mer natale.

Selon **HUSS** (14), les muscles du poisson sain ou fraîchement capturé, sont stériles, de sorte que les micro-organismes ne se rencontrent que sur les surfaces internes et externes du poisson.

Selon **DAAOUI** (08), cité par **NDIAYE**. (23), les charges bactériennes moyennes pour le poisson venant d'être capturé varient de :

- $10^2$  à  $10^5$  germes/cm<sup>2</sup> pour la peau
- $10^3$  à  $10^7$  germes/g pour les branchies
- $10^3$  à  $10^8$  germes/g pour les intestins

Cette grande variabilité reflète l'effet de l'environnement. Ainsi, des charges microbiennes réduites de (10 à 100 germes/cm<sup>2</sup>) de peau se rencontrent dans les poissons provenant d'eaux froides et propres (**LISTON**, 1980 ; **HUSS** et *al.*, 1974) (14), alors que, des charges élevées sont souvent associées à des poissons capturés dans les zones polluées où dans les eaux chaudes tropicales. (14)

Toutefois, selon **LARSEN** et *al.* (1978), des travaux récents semblent indiquer chez au moins une espèce de poisson (*Gadus morhua*), une flore intestinale spécifique formée de bactéries à gram négatif du type *Vibrio*, à une concentration d'environ  $10^7$  germes/g. Cette flore se rencontre dans tous les poissons, quelle que soit la zone de pêche, la saison ou la nature des aliments contenus dans l'estomac. (14)

### **4. VOIES DE PENETRATION**

Les bactéries contaminant les poissons ont principalement trois voies de passage selon (07) :

- les branchies
- la muqueuse digestive
- la peau

La barrière cutanée ne peut être franchie que lorsqu'il y a, au niveau de celle-ci des lésions créées par les manipulateurs.

## **5. FACTEURS INFLUENCANT LA CONTAMINATION BACTERIENNE DU POISSON**

La contamination bactérienne du poisson est sous l'influence d'un certain nombre de facteurs liés à :

- La biologie des espèces : Les micro-organismes se rencontrent sur toutes les surfaces externes (peau et branchies) et dans les intestins du poisson vivant, fraîchement capturé. La charge microbienne très variable, est de l'ordre de  $10^2$  à  $10^7$  germes/cm<sup>2</sup> de peau et de  $10^3$  à  $10^9$  germes/g de branchies ou d'intestins (*SHEWAN*, 1962).
- L'influence de la zone de pêche sur la contamination initiale est notoire. Cette grande variabilité reflète l'effet de l'environnement. Ainsi, des charges microbiennes réduites (de 10 à 100 germes/cm<sup>2</sup> de peau) se rencontrent dans les poissons provenant d'eaux froides et propres (*LISTON*, 1980 à *HUSS* et *al.* 1974), alors que des charges élevées sont souvent associées à des poissons capturés dans des zones polluées ou dans des eaux chaudes tropicales (*SHEWAN*, 1977).
- La charge microbienne des intestins du poisson reflète l'environnement et l'alimentation ; des conditions de quasi-stérilité se rencontrant dans le poisson jeune.
- Un facteur plus important qui pourrait être la température requise par ces bactéries pour proliférer. *SHEWAN*, 1977 a isolé une proportion bien plus élevée de bactéries psychrotrophes dans des poissons d'eaux froides ou tempérées et a observé que seuls 5% de la flore des poissons de la mer du Nord pouvaient se développer à 37°C, contre environ 55% pour celle des poissons capturés au large des côtes Mauritanienes.(14)

## **CHAPITRE V : CONSEQUENCES ECONOMIQUES ET SANITAIRES DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE DU POISSON**

### **I- INCIDENCES ECONOMIQUES**

L'incidence économique relève de la contamination du poisson frais par les germes d'altération. *LISTON* (20) démontre que les micro-organismes sont les principaux responsables de l'altération des produits de mer.

En effet, selon ce même auteur, un muscle prélevé stérilement et maintenu à 0°C, se conserve plus de 6 semaines sans modification organoleptique détectable. (20)

#### **1. LES BACTERIES DE L'ALTERATION**

Bien que la flore totale du poisson frais soit très abondante, le nombre de ces bactéries joue un rôle insignifiant aux fins de l'altération. Les bactéries qui en sont responsables ne représentent qu'une faible proportion de la flore totale mais donnent lieu à des odeurs et goûts très désagréables entraînant ainsi une perte de la qualité marchande des poissons. En effet, ces altérations sont généralement à prédominance bactérienne.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer la capacité d'altération des bactéries.

L'école britannique préconise l'inoculation du muscle de poisson stérile avec des cultures pures (*SHEWAN*, 1977), alors que les chercheurs australiens utilisent l'homogénéisation stérile du muscle préalablement digéré par la trypsine (*GILLESPIE*, 1975)

Les organismes les plus actifs pendant le processus d'altération du poisson réfrigéré sont des bactéries psychrotrophes en forme de bâtonnet à gram négatif comme *Alteromonas putrefaciens* et certaines bactéries du genre *Pseudomonas*, *Vibrio* et *Aeromonas*, (*SHEWAN*, 1977. (02)

## **2. LES MECANISMES DE L'ALTERATION BACTERIENNE DU POISSON (10)**

Après une phase de latence correspondant à la rigor-mortis, les bactéries vont se développer de façon exponentielle, pour atteindre des populations de l'ordre de  $10^8$  à  $10^9$  germes/g de muscle ou  $\text{cm}^2$  de peau, après 8 à 10 jours à  $0^\circ\text{C}$ . (24)

Auparavant, on estimait souvent que les bactéries envahissaient le muscle à travers le système vasculaire ou la peau. Cependant, l'examen de coupe histologique a montré que, dans le cas du poisson réfrigéré, seules quelques bactéries envahissaient le muscle et ceci, pendant les dernières étapes de l'altération. (14)

## **3. LES INCIDENCES SANITAIRES**

Le poisson est considéré parmi les aliments les moins dangereux pour la santé. Ceci n'est pas contestable lors de sa pêche au large, par contre, il peut ingérer des bactéries pathogènes s'il traverse des eaux de mer contaminées par des rejets d'égouts ou des eaux de ruissellement. Ce qui peut être le cas du poisson pêché en bordure des côtes, concernant les poissons d'eau douce, le risque de contamination est plus élevé encore compte tenu des nombreux rejets humains ou animaux.



La plupart des entérobactéries ne survient qu'à un temps très court dans l'organisme des poissons marins.

Mais, les bactéries pathogènes véhiculées par les eaux terrestres et les eaux résiduaires déversant sur le littoral peuvent survivre un temps suffisant pour contaminer les poissons qui les ingèrent.

Les accidents alimentaires provoqués pour les denrées alimentaires peuvent être classés en deux groupes :

- Intoxination
- Toxi-infections

### **3.1. INTOXINATION A CLOSTRIDIUM BOTULINUM**

Selon l'organisation mondiale de la santé, (1976) (26), les informations nouvelles concernant Clostridium botulinum sont relativement rares depuis une dizaine d'années.

Parmi les sept types toxigènes reconnus de C. botulinum (A à G), seuls les types A, B, E et F affectent l'homme.

On a récemment signalé dans plusieurs pays, la présence de C. botulinum de type E en grand nombre chez des poissons dans des stations de pisciculture.

La production de toxines atteint parfois des niveaux affectant le poisson. On soupçonne que le développement intensif de C. botulinum est dû au surpeuplement des viviers et/ou à la suralimentation des poissons.

Les aliments les plus souvent responsables du botulisme sont les conserves préparées à domicile (les légumes en particulier), le poisson fumé ou saumuré et d'autres produits analogues de faible acidité. (26)

Les symptômes sont très nombreux, parmi lesquels, on peut citer :

- Les mydriases bilatérales
- Les troubles bucco pharyngés qui deviennent constants ; la paralysie du voile du palais est moins fréquente.

- Des signes plus rares peuvent apparaître telles que la constipation par diminution des sécrétions digestives, paralysies musculaires, rétention urinaire, tachycardie. (10)

### **3.2 AUTRES MALADIES BACTERIENNES TRANSMISES PAR LE POISSON**

#### **3.2.1. Toxi-infection à Vibrio**

Les souches de vibrions, qui sont le plus souvent à l'origine de phénomènes pathologiques chez l'homme, appartiennent à deux espèces :

- Vibrio parahaemolyticus
- Vibrio cholerae (10).

⇒ Le Vibrio parahaemolyticus

Il est à l'origine de gastro-entérites. C'est un agent pathogène pour l'homme et a souvent été associé à des incidents d'intoxications alimentaires.

Il doit être recherché dans les produits originaires des régions, où son incidence est élevée et surtout dans les produits destinés à être consommés sans aucun traitement thermique préalable.

Il est recommandé que son taux ne dépasse pas 100 germes par gramme de poisson. (ICMSF, 1974). (15)

L'épreuve de *Kanagawa* à l'hémolysine sur gélose de *Wagat suma* qui sert à déterminer la pathogénicité potentielle, donne des résultats surtout positifs avec les souches provenant de sujets atteints de gastro-entérite.

Les résultats sont généralement négatifs dans l'environnement marin et que les souches *Kanagawa* positives peuvent se multiplier rapidement et de préférence dans l'intestin. (14)

Il n'existe encore aucune épreuve définitive, chimique ou clinique, qui permet de déterminer sans équivoque la pathogénicité d'isollements de Vibrio parahaemolyticus. La toxi-infection à Vibrio parahaemolyticus se caractérise par une gastéro entérite du type dysentérique avec :

- diarrhée
- crampe abdominale sévère
- nausées
- vomissements

- légère fièvre et maux de tête

Le taux de mortalité est bas.

⇒ Le vibrio cholerae

Le rôle du poisson dans la transmission du choléra a été abondamment débattu, mais rien ne prouve que le poisson contaminé provoque l'infection chez l'homme.

Toutefois, des études épidémiologiques ont permis de rapporter une épidémie de choléra, suite à la consommation de poissons crus.

D'autres études, effectuées par **DE ARAOZ** et *al.* Ont montré que le *Vibrio cholerae* survit dans les poissons et les fruits de mer pendant une à deux semaines au minimum dans le réfrigérateur. (10)

L'incubation de la maladie est généralement inférieure à 24 heures mais peut parfois aller jusqu'à 5 jours. Très peu de germes suffisent pour être malade.

Le *Vibrio cholerae* se multiplie dans l'intestin grêle où il produit une enterotoxine qui provoque une stimulation de la sécrétion des chlorures, accompagnée d'une perte liquidienne intense, riche en potassium et en bicarbonate, entraînant un choc hypovolémique. La dose infectante est de 100 à 1000 *Vibrio cholerae*.

Les symptômes sont essentiellement des crampes abdominales avec une diarrhée aqueuse abondante, nausées et vomissements occasionnels. Ces symptômes rappellent ceux observés dans le cas d'une toxi-infection à *Vibrio parahaemolyticus*, mais sont plus graves dans le cas du choléra. La mort survient lorsque le déficit liquidien devient supérieur à 10% du poids du corps. (10)

### 3.2.2. Toxi-infection à Salmonella

On définit par ailleurs le foyer de Toxi-Infection Alimentaire Collective (T.I.A.C) comme étant l'apparition d'au moins de deux cas groupés, similaires, d'un même symptomatologie en général, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Selon **HAMZA** cité par **MIASSANGOUMOUKA (22)**, en France les cas de T.I.AC recensés de 1993 à 1997 sont importants comme en témoigne le tableau ( )

**Tableau VI : T.I.A.C recensés en France de 1993 à 1997**

Résultats	Années				
	1993	1994	1995	1996	1997
Foyer	369	553	395	414	478
Malades	8643	9532	7349	7858	7817

**(Source 22)**

Pour leur part, les poissons et les fruits de mer ont été la cause de 54 cas de T.I.A.C. soit 11,3 % pour l'année 1997.

La niche écologique pour Salmonella, *E. COLI* et *SHIGELLA*, est le tractus intestinal de l'homme, des mammifères et des oiseaux.

Leur présence dans le poisson et produits de la pêche est normalement associée à la contamination fécale :

- soit par l'intermédiaire de la pollution de l'environnement, de l'eau naturelle, ou ces germes peuvent survivre pendant longtemps (des mois) à la température ambiante.
- Soit par la contamination au cours de la transformation.

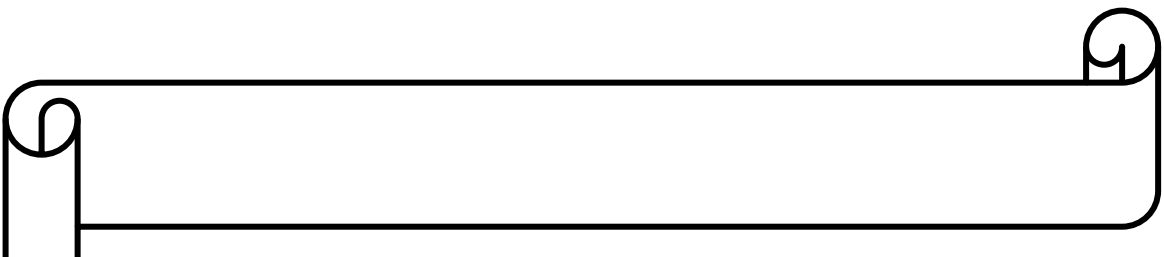
Ces 3 germes sont capables de provoquer des maladies graves chez l'homme.

**Tableau VII : Intoxications alimentaires d'origine microbien (Source 31)**

Affection	Agent causal	Temps d'incubation	T° limite de croissance	Symptômes et thérapeutiques
BOTULISME	Toxines de Clostridium Botulinum thermolabiles	18h à 36 h (2 h à 8 jours)	3,3 °C 48°C	Céphalée, lassitude, signes neurologiques, modification de la voix, sécheresse de la bouche, diplopie,

				ptosis, mydriase, dysphagie, constipation, pas de fièvre. Paralysie des muscles respiratoires. Sérum antituberculeux
INTOXINATION STAPHYLOCOCCIQUE	Entérotoxine staphylococcique Thermo-résistance	1 h à 6 h en moyenne 2 h	6,7 °C 50 °C	« Maladie des banquets » salivation, nausées, vomissements, douleurs abdominales, température normale, prostration. Guérison rapide. Petits soins.
TOXI-INFECTION ou GASTRO- ENTERITES AIGUES	Salmonella (Shigella sonnei, Arizona)	10 à 24 h	5,2 °C 46°C	Douleurs abdominales, diarrhées, vomissements, fièvre, algies et asthénie céphalée. Guérison après plusieurs jours Convalescence 8 jours Cas mortels : enfants, vieillards. Antibiothérapie.
INTOXICATIONS ALIMENTAIRES	Clostridium perfringens	12 h à 18 h	6,5°C	Douleurs abdominales Diarrhées, pas de vomissements, pas de fièvre. Guérison rapide (24 h)
	Bactéries non spécifiques	6 h à 18 h		
INTOXICATIONS DE TYPE HISTAMINIQUE	Amines de décarboxylation	2 h et moins		Nausées, vomissements, diarrhées, précédés de « bouffées de chaleur » et prurit. Oedèmes. Guérison rapide. Antihistaminiques : action immédiate

## DEUXIEME PARTIE



# *ETUDE EXPERIMENTALE*

## **CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES**

### **I- MATERIEL**

Le matériel utilisé est constitué du matériel biologique ou animal du matériel de laboratoire.

#### **1. PRODUITS ANALYSES**

Ce sont des poissons de l'espèce « Pagre à points bleus » entier (*Sparus Coeruleostictus*), capturé le même jour par des piroguiers débarquant à la plage de Hann.(Dakar)

Ces poissons sont communément appelés par les mareyeurs : « des pièces du jour ».

#### **□ Justification du choix de la plage de Hann**

La plage de Hann est située au Km 5, Boulevard du Centenaire de la Commune de Dakar.

Le choix de cette plage comme site de prélèvement se justifie par :

- Sa proximité du laboratoire d'analyses (HIDAOA) de l' EISMV
- L'avantage d'y trouver des mareyeurs sensibilisés sur l'importance du stockage sous glace du poisson.

En effet, ces derniers fournissent la matière première à certaines sociétés de pêche de la place.

- L'assurance de pouvoir trouver quotidiennement chez le mareyeur, l'espèce utilisée dans notre étude.

#### □ **Choix de l'espèce** (*Sparus Coeruleostictus*)

La plupart des *Sparidae* et plus particulièrement les pagres ou *Sparus* ont une excellente chair.

Du point de vue des quantités pêchées, l'espèce *Sparus* occupe le 6<sup>e</sup> rang des tonnages débarqués avec 1900 tonnes, en provenance des côtes Sénégalaises et Africaines de l'Ouest. D'où la demande très forte de ces poissons, traduisant leur importance économique. (22)

#### □ **Etat du poisson à l'achat**

Aussitôt après leur capture, les pagres sont mis dans des boîtes en PVC contenant de la glace de bonne qualité bactériologique.

## **2. MATERIEL DE LABORATOIRE**

Le matériel de travail est celui communément utilisé dans tous les laboratoires de bactériologie alimentaire.

- **Matériel de stérilisation, de préparation de milieu de culture**
  - autoclaves
  - fours ou réchauds
- **Matériel de prélèvement**

- glacière
- 3 générateurs de froid ou carboglace fortement congelés pour le transport des échantillons sous régime de froid
- thermomètre infrarouge

- **Matériel utilisé pour les prises d'essai et les analyses**

- hotte à flux laminaire
- couteaux, ciseaux, pinces
- balances électroniques
- sachets stériles et « STOMACHER<sup>ND</sup> »
- broyeur
- portoirs pour sachets
- brûleurs (bunsen)
- bains-marie
- tubes à essais, pipettes
- boîtes de pétri
- milieux de culture
- réactifs.

- **Matériel d'incubation**

- étuves à (30°C, 37 °C, 44° et 46°C) et réfrigérateurs

- **Matériel de lecture**

- compteur de colonies.

## **II- METHODES**

### **1. ECHANTILLONNAGE**

Les échantillons sont achetés le jour même de l'analyse. Chaque échantillon comprend 5 poissons entiers choisis au hasard.

Au total, 102 échantillons ont été prélevés et conservés sous régime de froid à l'aide de flacons de carboglace et d'une enceinte isotherme (glacière). Leur acheminement de la plage au laboratoire se fait en taxi, pour réduire au minimum, le temps séparant la capture des poissons et le début des analyses.



## **2. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE**

### **Photo 1**

#### **2.1. PRISE DE TEMPERATURE**

Chaque échantillon est disposé dans un plateau en inox, préalablement nettoyé et désinfecté. La prise de température est effectuée à l'aide d'un thermomètre à infrarouge permettant l'obtention de la température à cœur. La température à cœur du poisson frais, stocké sous glace de 7° à 8°C.

#### **2.2. ECAILLAGE DU POISSON**

L'écaillage du poisson se fait à l'aide d'un couteau adapté. Le rinçage et l'égouttage succèdent l'écaillage.

Ces opérations ont pour but, de diminuer la flore microbienne au niveau de la peau, afin d'éviter toute contamination croisée avec la chair lors des prises d'essai.

#### **2.3. PREPARATION DE LA SUSPENSION MERE ET DES PRISES D'ESSAIS**

##### **2.3.1. Prises d'essai**

La prise d'essai est la quantité de chair et de branchies prélevées pour l'analyse microbiologique.

Deux types de prélèvements ont été effectués au niveau de la chair et au niveau des branchies.

Ces prélèvements de font en commençant par le site le moins contaminé (la chair) vers le site le plus contaminé (les branchies).

##### **□ Prélèvement de la chair (Photo 2)**

C'est le protocole défini par l'arrêté du 21 décembre 1979 de la réglementation française qui a été utilisée. (25)

Mais nous nous sommes aussi inspirés des normes AFNOR (Association Française de Normalisation) qui sont appliquées dans le laboratoire d'hygiène Alimentaire de l'EISMV.

Dès l'arrivée de l'échantillon au laboratoire, on prélève de la chair sous la hotte à flux laminaire comme suit ; à l'aide d'un scalpel préalablement stérilisé, on délimite la zone à prélever pour incision de la peau.

Le prélèvement de la chair s'effectue ensuite, en profondeur à côté de l'arête centrale, à l'aide d'un couteau et de ciseaux stériles.

#### □ **Prélèvement des branchies**

Le prélèvement au niveau des branchies a été effectué selon deux méthodes :

- La première méthode consiste à faire un écouvillonnage. Dans ce cas, c'est le mucus recouvrant les branchies qui est récupéré dans des écouvillons contenant 5 ml de BCC (Bouillon Cœur Cervele).

Le tout est homogénéisé par agitation mécanique au vortex. Cet écouvillonnage branchial est utilisé pour la recherche des *vibrionaceae*.

- La deuxième méthode consiste à sectionner les branchies au niveau de leur insertion. Les branchies ainsi prélevées serviront à la recherche des types de flores suivantes : entérobactéries, flore globale et Pseu

### 2.3.2. **Préparation de la suspension mère**

#### Figure 4

10 g de chair ou de branchies sont introduits dans un sachet stomacher<sup>ND</sup> stérile.

On y ajoute 90 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) ou de (BBC). On obtient ainsi une suspension mère au 1/10. Le contenu du sachet est homogénéisé par broyage pendant 3mn au stomacher<sup>ND</sup>.

La suspension ainsi obtenue est laissée au repos pendant 30 mn, pour assurer la revivification des bactéries, stressées par le choc provoqué lors du broyage.

### 2.3.3. **Dilution**

On obtient la dilution de la suspension mère en établissant le rapport :

<b>Poids de l'aliment</b> -----
------------------------------------

### **Volume total (diluant + aliment)**

Ainsi 1 ml de la solution mère est prélevé et mis dans 9 ml d'eau peptonée tamponnée, la dilution  $10^{-2}$  est réalisée.

Pour réaliser la dilution  $10^{-3}$ , 1 ml de la précédente dilution est ajoutée dans 9 ml d'eau peptonée tamponnée et ainsi de suite pour réaliser les dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , etc.

## **2.4. ANALYSES BACTERIOLOGIQUES**

### **2.4.1. Recherches des bactéries du genre Vibrio**

Norme NFISO 8914 (Mai 1991)

#### **figure 5**

Ce sont des germes typiques qui peuvent être isolés du poisson fraîchement capturé et n'ayant subi aucune manipulation.

Leur recherche est, de ce fait, primordiale dans l'étude de la contamination initiale du poisson. Il s'agit essentiellement :

- des bactéries du genre vibrion
- des entérobactéries
- de la flore globalement constituée de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) à 30°C et de la flore psychrotrophe (FAP) à 5°C
- des Pseudomonas

#### **□ Etapes de la recherche de bactéries du genre Vibrion**

La recherche des bactéries du genre Vibrion se fait en 4 étapes. A chacune de ces étapes, correspond un milieu de culture bien déterminé.

##### **➤ Isolement**

A l'aide d'une pipette, Pasteur ou d'une öse, préalablement trempée dans la solution d'enrichissement, on réalise l'isolement par stries en surface sur le milieu TCBS.

Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24 h.

##### **➤ Lecture**

Après incubation, 2 types de colonies peuvent être obtenus sur les boîtes de TCBS.

- des colonies rondes jaunâtres, saccharose positif :  
V. alginolyticus, V. cholerae.
- des colonies rondes vertes, saccharose négatif :  
V. parahaemolyticus.

Sur certaines boîtes, on peut avoir une coexistence des 2 types de colonies.

### ➤ **Purification**

La gélose GNS (Gélose Nutritive Salée) est utilisée pour la purification des vibrios.

A l'aide d'une pipette Pasteur, on prélève une colonie sur TCBS pour ensemer les boîtes de GNS, en réalisant des stries superficielles. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h.

On obtient des colonies blanchâtres qui seront ensuite identifiées.

### ➤ **Identification**

L'identification des vibrios est basée sur l'exploitation des caractères morphologiques et biochimiques de la famille.

Plusieurs techniques ont, de ce fait, été utilisées :

- La coloration de Gram

Elle a été réalisée à l'aide d'un Kit à Gram comprenant quatre éléments :

- Violet de Gentiane phénique
- Solution iodo – iodurée (Lugol)
- Solution d'alcool – acétone
- Solution de Fushine de Ziehl diluée.

On observe à l'immersion au microscope optique à l'objectif x 100, des bactéries colorées en rose à Gram négatif.

- Etat frais

L'état frais permet une observation directe des vibrios qui, sur le champ microscopique disparaissent et réapparaissent.

Ces mouvements rapides attestent de la mobilité des vibrions grâce à la présence d'un flagelle polaire (bactérie monotriche).

- Recherche de l'oxydase OX

La recherche de l'oxydase permet de différencier au sein des bactéries à Gram négatif, les vibrions (OX<sup>+</sup>) et les entérobactéries.

Des disques imprégnés d'oxalate de diméthyl –Para-Phénylène – diamine ont été utilisés pour la recherche de l'oxydase.

- Composé vibriostatique 0/129

Il permet de faire un diagnostic différentiel au niveau de la famille des vibronaceae entre les Aeromonas et vibrio.

La sensibilité ou la résistance à l'action vibriostatique de la 2,4 diamino – 6,7 diisopropylptéridine, encore appelée « composé vibriostatique 0/129 », est recherchée dans ce test à l'aide de disques imprégnés.

- Mode opératoire

On ensemence, par inondation, une gélose Mueller –Hinton (MH) ou GNS.

Après séchage, au bout de 15 minutes à l'étuve 37 °C, on dépose un disque en appuyant légèrement à l'aide d'une pince, pour en assurer l'adhérence avec la gélose.

Après incubation, l'absence de zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur ou égal à 15 mm, montre la sensibilité au composé 0/129 : vibrio.

- Test de l'halophilie

Elle permet l'identification des vibrions halophiles tels que (V. parahaemolyticus et V. alginolyticus) par rapport à V. cholerae non halophile.

Le milieu utilisé est le milieu E.P.I (Eau Peptonée exempte d'Indole) à différentes concentrations de NaCl.

- Mode opératoire

Dans chaque tube, 5 ml d'EPI sont introduits à une concentration donnée de NaCl.

Parallèlement, une suspension de vibrions est effectuée comme suit :

- Une colonie prélevée sur la gélose GNS est mise dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

- Après Homogénéisation, une goutte de cette suspension sert à inoculer chaque tube d'EPI.

La lecture se fait après 24 h d'incubation.

Tableau VIII : Interprétation du test de l'halophilie

% Nacl	3% Nacl	7% Nacl	10 %Nacl	Vibrio correspondant
-	+	+	-	<u>V. parahaemolyticus</u>
-	+	+	+	<u>V. alginolyticus</u>
+	-	-	-	<u>V. cholerae</u>

+ = Croissance ;    - = Pas de croissance

- Gélose chromagar

Les colonies de vibrions, purifiées sur GNS, sont repiquées sur cette gélose en surface. On obtient après 24 h d'incubation :

- soit des colonies pourpres : V. parahaemolyticus
- soit des colonies blanchâtres : V. alginolyticus.

#### 2.4.2. Dénombrement de la flore globale (Fig 6) NFV08-051 (déc.1992)

Deux types de flores ont été dénombrés en fonction de la température d'incubation : la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) à 30 °C et la Flore Aérobie Psychrotrophe à 5 °C ( FAP).

#### ➤ Milieu de culture utilisé

La gélose Plate Count Agar (PCA) a permis le dénombrement des deux flores.

En raison de sa faible sélectivité, elle est utilisée en double couche pour éviter l'envahissement de la surface de la boîte par des germes contaminants comme *Proteus*.

La composition des différents milieux de culture est donnée en annexe.

### ➤ Mode opératoire

Les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  sont réalisées pour la chair, alors que pour les branchies qui ont un niveau de contamination plus important, les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-3}$  sont utilisées.

On prélève aseptiquement 1 ml de chaque tube de dilution que l'on dépose dans des boîtes de Pétri ; on coule ensuite dans chaque boîte, 15 ml de PCA.

L'homogénéisation se fait par des mouvements circulaires, pour mélanger l'inoculum au milieu PCA.

Après solidification de la première couche, on coule la deuxième couche, à raison de 5 ml de PCA pour éviter l'envahissement de la surface par les *Proteus* et les *Bacillus*.

A l'incubation, les boîtes sont retournées, couvercles vers la clayette de l'étuve à 30 °C pour la FMAT, pendant 48 à 72 h à 5°C au réfrigérateur pour la FAP (Flore Aérobie Psychrotrophe) pendant 5 à 10 jours.

A l'issue de ce délai, a lieu la lecture.

### ➤ Lecture

La lecture se fait sur 2 boîtesensemencées avec des dilutions successives à l'aide d'un compteur de colonies muni d'une loupe ou à l'œil nu.

Les colonies observées sont de couleur blanches- laiteuses avec une forme de grain de riz et poussent en profondeur.

Le nombre de germes par gramme de produit est obtenu selon la formule suivante :

$$N = \frac{EC}{\left[ V (n_1 + 0,1) n_2 \times d \right]}$$

**N** = nombre de germes par gramme de produit

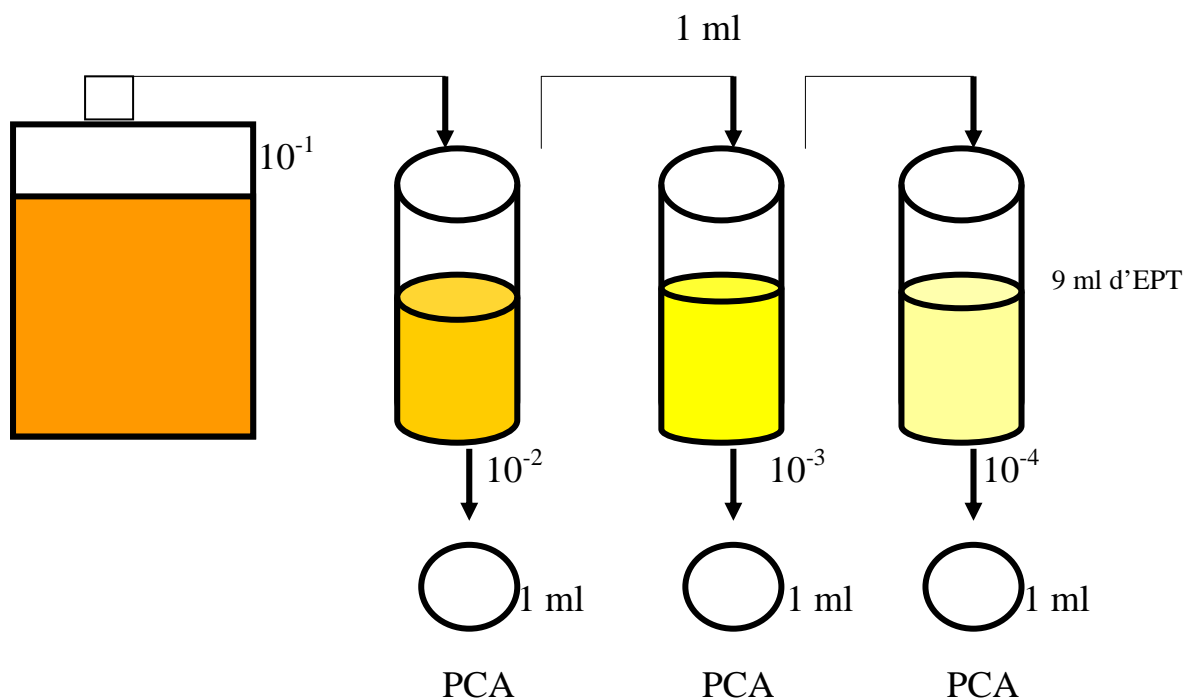
**EC** = somme des colonies caractéristiques sur les boîtes retenues

**V** = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte (en ml)

**d** = taux de dilution correspondant à la 1<sup>ère</sup> dilution retenue

**n<sub>1</sub>** = nombre de boîtes lues à la 1<sup>ère</sup> dilution

**n<sub>2</sub>** = nombre de boîtes lues à la 2<sup>ème</sup> dilution.



L'incubation se fait à 30°C pour la FMAT et 5 °C pour la FAP.

**Figure 4 : Dénombrement de la FMAT à 30°C et de la FAP à 5°C.**

NF.V. 08-051 (déc.1992)

#### 2.4.3. Dénombrement des entérobactéries

NF V. 08-054 (Oct. 93)



Les bactéries de la famille des entérobactéries ont été recherchées aussi bien au niveau de la chair, qu'au niveau des branchies.

#### ➤ Milieu de culture utilisée

La gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre est utilisée pour le dénombrement des entérobactéries (VRBG).

Elle inhibe la croissance des bactéries à Gram positif et pratiquement celle des autres bactéries à Gram négatif.

Les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  ont été utilisées pour la recherche des *enteriobacteriaceae* dans la chair, alors que dans leur recherche au niveau des branchies, les dilutions ont été poussées jusqu'à  $10^{-3}$ .

#### ➤ Lecture

Après 24 h d'incubation, on dénombre sur la gélose VRBG, les colonies rondes rouges violacées, ayant un diamètre d'au moins 0,5 mm.

Le résultat est apporté à l'unité de produit (1g) selon la précédente formule.

#### - Le test de **MACKENZIE**

Les bactéries du genre *Echerichia Coli* peuvent être caractérisés par le test de **MACKENZIE** (fermentation du lactose et dégagement de gaz).

#### • Production d'indole :

Elle est mise en évidence à partir d'une suspension bactérienne. Une goutte de cette suspension est introduite dans un tube de BLBVB contenant une cloche de Durham et dans un tube d'EPI stérile.

Après incubation du BLBVB pendant 24 h à 44°C et de l'EPI pendant 24 h à 37 °C, on procède à la lecture de la manière suivante :

- Le tube de BLBVB est positif (présence d'E. Coli) quand il y a croissance bactérienne au fond du tube, turbidité du milieu et dégagement gazeux dans la cloche de Durham.

La recherche de la production d'indole s'effectue en introduisant quelques gouttes de réactifs de Kovacs dans le tube d'EPI. Un résultat positif se manifeste par l'apparition d'un halo rouge.

#### 2.4.4. La recherche des bactéries du genre *Pseudomonas* XP V08-059 (Nov. 1995)

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont les principaux germes d'altération du poisson stocké sous glace.

Pour l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique, la gélose *pyocyanosel* a été utilisée.

Les boîtes préalablement coulées sont inoculées en surface à l'aide des dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ . Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h.

#### ➤ Lecture

Les colonies obtenues sont vertes. Cette coloration est due à la production d'un pigment vert, la pyoverdine par la bactérie.

## CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

### I- RESULTATS

Tableau IX : Contamination du Pagre par la FMAT

Valeur en nombre de germes/ gramme	Sites ou localisations	
	Chair	Branchies
Valeur minimale	00	$5,10^2$
Moyenne	$3,10.10^2$	$0,98.10^4$
Valeur maximale	$1,1.8.10^3$	$3,34.10^4$

D'après ce tableau, nous constatons que la FMAT est présente aussi bien dans la chair que dans les branchies du poisson frais, avec une moyenne de  $3,10.10^2$  au niveau de la chair et  $0,98.10^4$  au niveau des branchies.

La valeur maximale au niveau de la chair qui est de  $1,18.10^3$  germes/gramme reste de loin plus faible que celle des branchies qui est de  $3,34.10^4$  germes/ gramme.

**Tableau X : Contamination du Pagre pour la FAP**

Valeur en nombre de germes/ gramme	Sites ou localisations	
	Chair	Branchies
Valeur minimale	00	00
Moyenne	$1,56.10^2$	$2,78.10^2$
Valeur maximale	$1,61.10^3$	$1,81.10^3$

Ce tableau nous montre que la contamination du Pagre par la FAP est plus importante au niveau des branchies qu'au niveau de la chair avec une moyenne de  $1,56.10^2$  pour la chair et  $2,78.10^2$  pour les branchies.

**Tableau XI : Contamination du Pagre par les bactéries du genre Pseudomonas**

Valeur en nombre de germes/ gramme	Sites ou localisations	
	Chair	Branchies
Valeur minimale	0	0
Moyenne	$0,26.10^2$	$0,13.10^2$
Valeur maximale	$0,6.10^2$	$3,1.10^2$

Nous constatons dans ce tableau que le Pagre est faiblement contaminé par les bactéries du genre *Pseudomonas*, aussi bien au niveau des branchies qu'au niveau de la chair.

**Tableau XII: Contamination du Pagre par les entérobactéries**

Valeur en nombre de germes/ gramme	Sites ou localisations	
	Chair	Branchies
Valeur minimale	0	0
Moyenne	0	$7,08.10^2$
Valeur maximale	0	$5.10^2$

**Tableau XIII : Contamination du Pagre par les bactéries du genre *Vibrio***

Résultats	Pourcentages correspondants au niveau des deux sites	
	Chair	Branchies
Présence	55%	60%
Absence	45%	42%

**Tableau XXIV : Contamination globale des 102 échantillons de Pagre à Points bleus par les bactéries du genre *Vibrio***

Nombre d'échantillons contaminés				Nombre d'échantillons non contaminés
Total 79 échantillons				23 échantillons
Par V. alginolyticus : 44	Par V. parahaemolyticus : 18	N.I : 05	Par V. cholerae : 12	Absence totale : 20

**N.I** : Non Identifié (les colonies obtenues sur TCBS caractéristiques sont également sensibles au composé 0/129, sont à Gram négatif poussent sur EPI salée, mais n'ont pas pu être identifiées par les autres tests (galerie API 20 E).

## **II- DISCUSSION**

### **1. METHODOLOGIE**

L'étude de la contamination initiale du poisson, en zone tropicale n'a été envisagée que récemment (*FAYE*, 2002, *MIASSAGOUMOUKA*, 2002), d'où les difficultés à choisir une méthodologie.

Le choix de la méthodologie a d'abord porté sur les types de prélèvements à effectuer sur le poisson puis sur les types de bactéries à rechercher et sur leur température d'incubation.

Toutefois, les études antérieures réalisées en zone tempérée nous ont guidé dans le choix de la méthodologie adoptée.

Ainsi, les types de prélèvements sélectionnés ont concerné la chair, produit de consommation et les branchies.

Le prélèvement des branchies se justifie par le fait que, comme l'ont affirmé de nombreux auteurs, les bactéries retrouvées au niveau de la chair ont pour origine les sites initiaux de la contamination (tube digestif et branchies).

En ce qui concerne les types de bactéries recherchées (Vibrios, FMAT, FAP, Pseudomonas, Entérobactéries), nous avons choisi d'étudier la flore dominante de la contamination primaire du poisson représentant 90% de celle-ci. (2).

Par ailleurs, les études réalisées par *SEYDI* et *COLL* au Sénégal. (34) par), au Japon et aux U.S.A (20) nous ont amené à rechercher et à accorder une importance particulière à la famille des *vibrionaceae*.

La recherche des entérobactéries se justifie par la bonne survie des salmonelles et des coliformes dans le milieu marin.

Toutefois, cette recherche serait plus intéressante dans l'étude de la contamination secondaire des denrées manipulées tels que les filets.

## **2. CONTAMINATION BACTERIENNE DU PAGRE A POINTS BLEUS**

La discussion des résultats des analyses bactériologiques consistera à apprécier le niveau de contamination (global) pour chaque groupe de germes recherché par rapport aux critères microbiologiques relatifs aux produits de la pêche d'une part, et par rapport aux sites de prélèvement (chair et branchies), afin de comparer les résultats obtenus au niveau des deux types de flores bactériennes.

### **2.1. APPRECIATION DU NIVEAU DE CONTAMINATION DU PAGRE A POINTS BLEUS PAR LES ENTEROBACTERIES ET LES BACTERIES DU GENRE PSEUDOMONAS**

#### **2.1.1. Contamination du Pagre par les entérobactéries**

⇒ Contamination de la chair par les entérobactéries

Comme l'indique le tableau XII d'une manière générale, la chair des échantillons analysés ne renferme pas d'entérobactéries.

Ceci vient confirmer les travaux de nombreux auteurs comme *SEYDI* (35) et *HUSS* (14), qui affirment que la chair du poisson vivant ou venant d'être capturé est tout à fait stérile.

Des travaux effectués par *TAYLOR* cité par *PETIT* (28), ont montré que les entérobactéries ne se retrouvent ni dans la chair, ni dans les intestins du poisson.

L'absence d'entérobactéries au niveau de la chair, montre que ces derniers contaminent la chair de manière secondaire.

⇒ Contamination des branchies par les entérobactéries  
Figure 7

L'analyse bactériologique de 102 échantillons de branchies a permis de déceler une moyenne de  $7,8.10^2$  germes/gramme. (Tableau XII)

Les résultats obtenus pour la contamination initiale des branchies sont compris dans l'intervalle donnée par certains auteurs comme *SEYDI* (35) :  $10^3$  à  $10^6$  germes/ gramme de branchies.

Par rapport aux sites de prélèvements, les entérobactéries et les *Pseudomonas* se trouvent surtout au niveau des branchies.

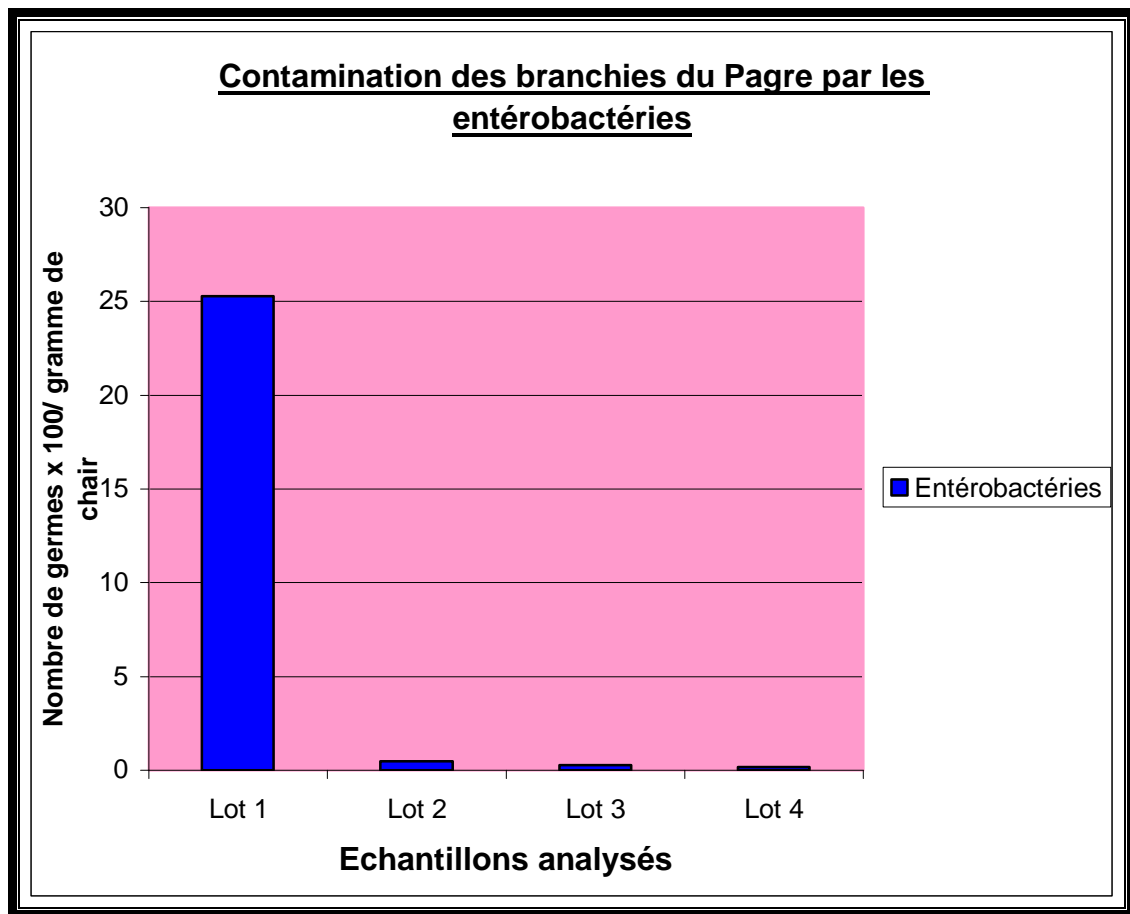


Figure 7: Contamination des branchies du Pagre par les entérobactéries

### 2.1.2. Contamination du Pagre par les bactéries du genre Pseudomonas

Ce sont les principaux germes d'altération du poisson qui sont à l'origine d'importantes pertes économiques.

Les bactéries du genre pseudomonas et celles des genres *Aeromonas*, *Moraxella* et *Alcaligenes* représentent 95% de la flore du milieu aquatique **NDIAYE (03)**.

Sur les 102 échantillons de chair analysés, il y a une très faible présence de Pseudomonas.

Seuls 27 échantillons ont permis d'isoler Pseudomonas avec un nombre de colonies tout à fait négligeable en moyenne  $0,06.10^2$  germes/gramme de chair, contre une moyenne de  $1,3.10^2$  germes/gramme de branchies.

Ainsi, ceci vient confirmer les travaux de nombreux auteurs **(14)**, **(28)** et **(15)** qui montrent que, la localisation initiale de la flore d'altération du poisson en particulier des Pseudomonas, est surtout branchiale ou intestinale.



C'est au cours de l'altération que les branchies envahissent la chair à travers les fibres de collagène.

## **2.2. CONTAMINATION DE LA CHAIR PAR LES DEUX TYPES DE FLORES FMAT ET FAP**    **Figure 8**

FMAT ou la flore mésophile aérobie totale représente, si elle est réalisée par les méthodes traditionnelles, le nombre total de micro-organismes capables de former des colonies visibles sur un milieu de culture à une température donnée. Ce chiffre est rarement un bon indicateur de la qualité sensorielle ou de la durée espérée de conservation du produit (*HUSS et al.*, 1974).

Si une numération faite après un échantillonnage systématique et une connaissance parfaite de la manutention du poisson avant l'échantillonnage et des conditions de température, elle peut donner une mesure comparative du degré général de contamination bactérienne et de l'hygiène mise en œuvre.

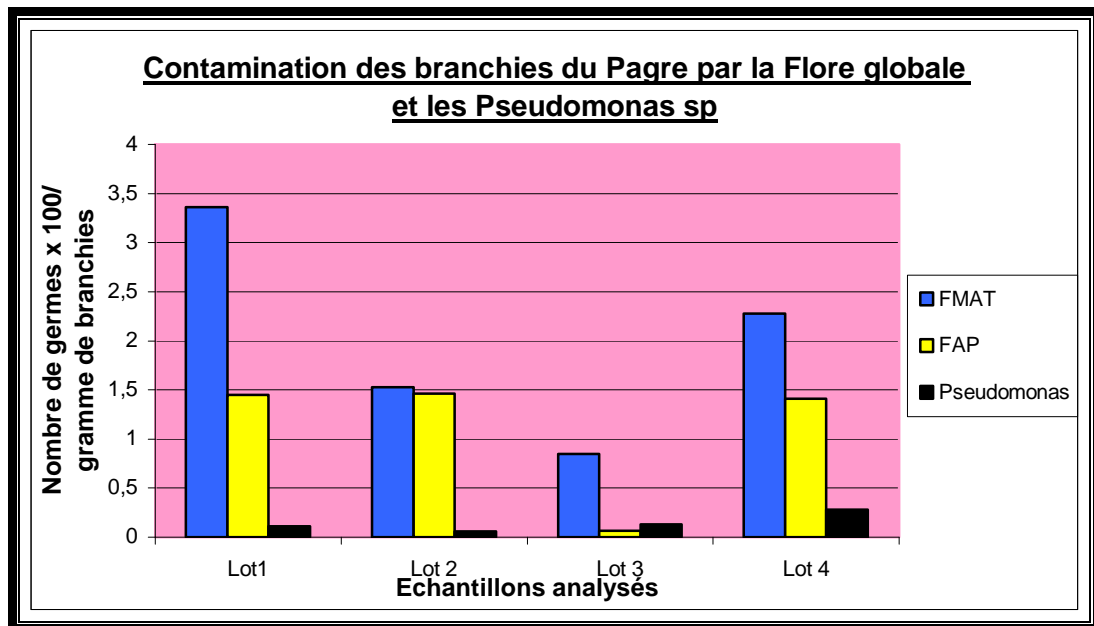
Il faut cependant noter qu'il n'y a pas de rapport entre la flore aérobie totale et la présence de bactéries pathogènes.

Par contre, les géloses courantes (PCA) sont encore les substrats les plus utilisés pour la détermination de la FMAT. (14)

Les résultats des analyses de ce groupe de germes comparés aux normes consignés dans le Tableau XX montre que :

- Les échantillons de la chair et des branchies sont contaminés respectivement à 99 et 100% par la flore mésophile aérobie totale.

Selon *SHEWAN* (1977) cité par *HUSS* (14), seuls 5 % de la flore des poissons des pays tempérés sont mésophiles alors que pour ceux capturés aux larges des côtes Mauritanienes, les mésophiles et les psychrophiles représentent respectivement 55% et 45%.



**Figure 8 : Contamination des branchies du Pagre par la flore globale et les Pseudomonas sp**

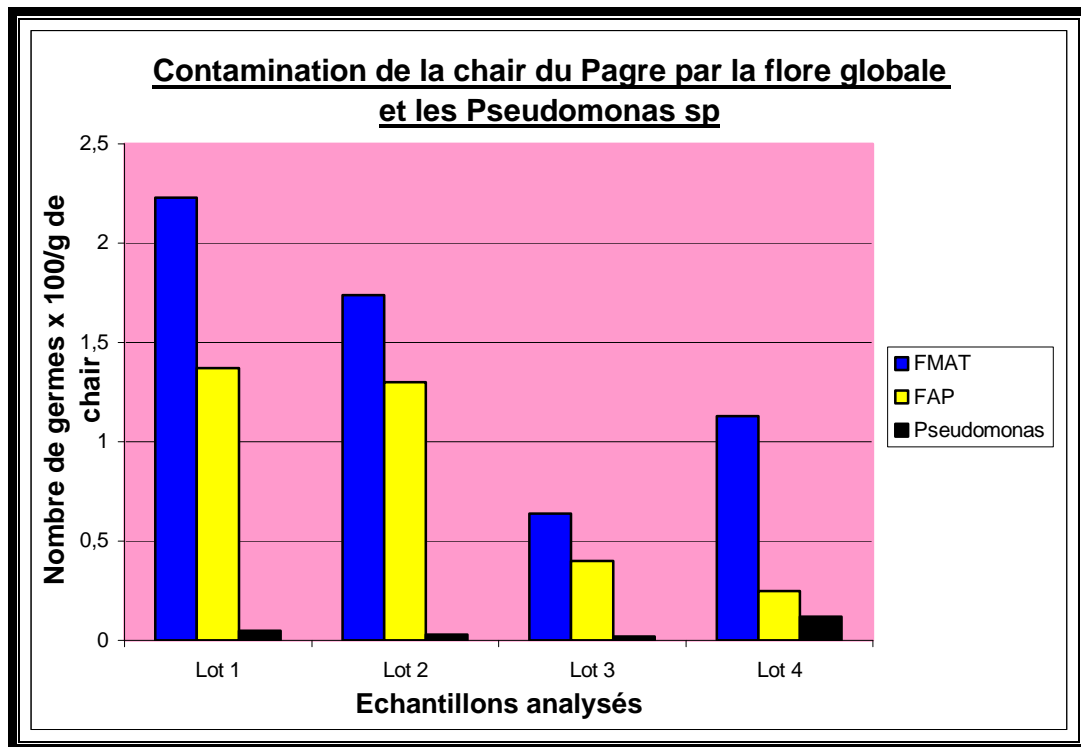
### **2.3. CONTAMINATION DU PAGRE A POINTS BLEUS PAR LA FLORE GLOBALE (FMAT ET FAP)**

Les moyennes obtenues pour la FMAT sont de  $3,10.10^2$  pour la chair et  $0,98.10^4$  pour les branchies.

Les branchies sont donc plus contaminées que la chair. Les résultats obtenus pour la FAP sont similaires au précédent (prédominance des bactéries au niveau des branchies) avec une moyenne de  $1,56.10^2$  pour la chair et  $2,78.10^2$  germes/gramme pour les branchies.

Les figures 8 et 9 montrent le niveau de contamination bactérienne du Pagre par lot de 25 à 26 échantillons analysés au niveau de la chair et des branchies.

Dans l'ensemble, on note une prédominance de la FMAT. Rappelons que les résultats enregistrés pour la FMAT le sont au bout de 72 heures d'incubation alors que pour la FAP, les résultats obtenus sont compris entre 5 et 10 jours d'incubation.



**Figure 9 : Contamination de la chair du Pagre par la flore globale et les Pseudomonas sp**

#### **2.4. CONTAMINATION DU PAGRE PAR LES VIBRIONS**

Les vibrions sont présents à un taux de 55 % dans la chair, alors que pour les branchies, la contamination est plus importante avec un taux de portage de 60 %.

Les test d'identification effectués sur les 79 échantillons, ont montré que :

- 56 % des échantillons sont porteurs de *Vibrio alginolyticus* aussi bien dans la chair que sur les branchies
- 14 échantillons sont porteurs de *Vibrio alginolyticus* au niveau de la chair uniquement.
- 11 échantillons sont porteurs de *Vbri*o alginolyticus au niveau des branchies.
- 18 échantillons sont porteurs de *Vibrio parhaemolyticus*

- aussi bien sur les branchies que sur la chair.
- 3 échantillons sont porteurs de *Vibrio parahaemolyticus* au niveau de la chair uniquement.
- 23% des échantillons sont porteurs de *Vibrio parahaemolyticus* au niveau des branchies.
- 12 échantillons sont porteurs de *V. cholerae*.

Les vibrions sont enfin absents dans 23 échantillons.

Le taux de portage de *Vibrio parahaemolyticus*, 0,18% chez le Pagre est inférieur à celui trouvé par **SEYDI** et **COLL.** qui ont pu l'isoler chez différentes espèces, avec un taux de 7,64 % légèrement supérieur au taux obtenu par **FAYE.** (10)

La fréquence élevée des vibrions dans le Pagre est liée à son milieu. En effet, ce dernier est une espèce benthique qui vit aussi bien en profondeur qu'en surface.

Mais, il faut noter aussi que la température et la salinité entre autres ne sont pas négligeables et peuvent également être déterminantes dans la contamination du poisson par les vibrions.

### **3. PROPOSITIONS D'AMELIORATION**

La contamination initiale du poisson est déterminée par un certain nombre de facteurs : Intrinsèques (liés à l'espèce) et extrinsèques (liés à l'environnement). Les propositions seront apportées au niveau de ces différents facteurs.

- Par rapport aux facteurs intrinsèques

Ces facteurs sont liés à l'espèce notamment à sa biologie (habitat, alimentation, respiration, reproduction etc.). En effet, l'animal marin vit en équilibre avec son environnement. Ce dernier est caractérisé par une multitude de facteurs physico-chimiques qui déterminent la nature de la flore de contamination.

Cependant, l'homme ne peut guère agir sur ces facteurs, sources de l'équilibre biologique du milieu marin.

- Par rapport aux facteurs extrinsèques

→ La zone de pêche

La zone de pêche a une influence notoire sur la contamination bactérienne du poisson.

Les zones littorales, qui reçoivent les divers affluents, provenant de l'activité humaine ou animale, sont les plus polluées.

On peut prévenir la contamination du poisson par :

- la réglementation de l'exploitation de pêche
- le traitement du produit, pour le rendre à la consommation.

→ Mode de capture

La plupart des espèces utilisées en Industrie Halieutique est capturée au chalut (espèces de petite taille).

Avec cette méthode de pêche, le poisson est traîné durant des heures, entraînant son écaillage et sa contamination par les bactéries des sables et des boues marines.

Les actions préconisées à ce niveau sont :

- la réduction au minimum du temps de capture
- l'élimination total ou l'éclatement des viscères.

→ Manutention à bord des engins de pêche

En premier lieu, les caisses, lorsqu'elles sont vides et avant d'être réutilisées, doivent être lavées avec des détergents et désinfectants à effet rémanent. Ce qui permettrait, après le séjour en mer, de ramener des caisses propres. Cette méthode est également utilisée, pour l'entretien quotidien du matériel de lavage et de convoyage du poisson jusqu'à la transformation industrielle.

Les cales de chalutiers de pêche, dès que le poisson est déchargé, doivent être soumises à cette même méthode de lavage par propulsion mécanique sur les parois et diverses séparations et au niveau des emplacements de stockage.

→ Traitement appliqué juste après la capture

Compte tenu de la localisation initiale des bactéries du poisson (peaux, branchies et intestins), des mesures d'hygiène doivent être préconisées pour éviter l'altération de la chair par les bactéries et pour allonger la durée de conservation du produit.

- le poisson, tout juste après la capture, doit être saigné. Cette saignée est plus efficace lorsqu'elle est suivie d'une éviscération, d'un ébranchage, puis d'un lavage externe et interne soigneux.

Cependant, une éviscération mal faite est pire qu'une absence d'éviscération. De plus, il faut utiliser pour le lavage du poisson déjà éviscéré et ébranché, une eau contrôlée de qualité microbienne connue.

#### → Le stockage du poisson

C'est l'étape déterminante pour prévenir l'invasion microbienne, source d'altération du poisson.

Il est essentiel d'utiliser de la glace de bonne qualité bactériologique et en quantité suffisante dès le début du stockage.

Pour se faire, il faut utiliser des caisses appropriées permettant l'élimination de l'eau provenant de la fonte de la glace.

Le maintien de la chaîne de froid est nécessaire au cours de toute la vie économique du poisson.

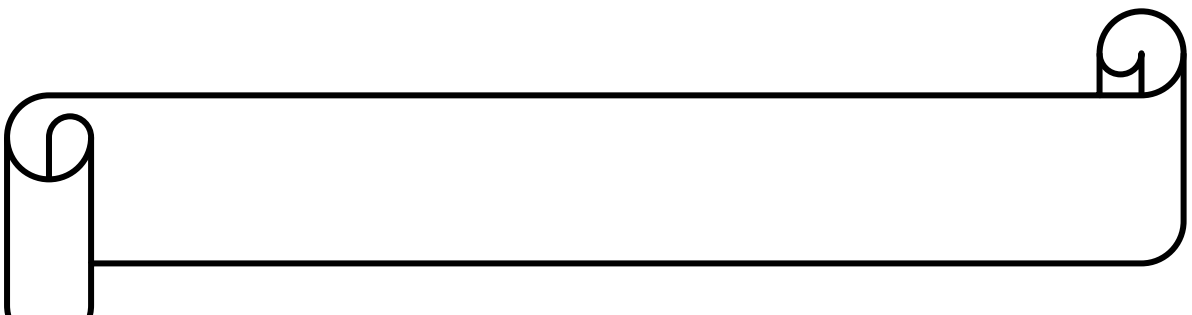
Ces mesures d'hygiène, lorsqu'elles sont respectées, contribueront à l'obtention d'un poisson de qualité microbienne satisfaisante.

Toutes ces suggestions ne trouveront leur réelle utilité que si les responsables sont sensibilisés.

Cette sensibilisation passe par des campagnes de formation du personnel sur les bonnes pratiques d'hygiène. A cet égard, la mise en place d'un service de qualité est indispensable.

Un tel service en collaboration avec le laboratoire sera en mesure non seulement d'assurer la qualité des produits exportables, mais également d'apporter des éclaircissements plus approfondis sur la contamination initiale du poisson des mers tropicales par rapport à la contamination surajoutée.

Il serait également judicieux d'avoir des normes définies à partir des types de bactéries rencontrées dans le poisson frais des mers tropicales.



# CONCLUSION GENERALE

## ***CONCLUSION GENERALE***

L'exploitation des produits de la pêche constitue une source non négligeable de devises pour le Sénégal.

En effet elle dégage un excédent annuel de 24 milliards de francs CFA.

Toutefois, la qualité bactériologique souvent non-conforme, des produits exportés est le principal facteur limitant de l'industrie halieutique sénégalaise. Cette qualité bactériologique est la résultante des deux types de contamination, initiale et surajoutée.

Or, peu de travaux ont été réalisés sur les poissons des mers tropicales, pour déterminer le niveau de contamination initiale.

L'objectif de cette étude a été d'apprécier le niveau de contamination initiale des poissons de mers, en choisissant comme espèce « Le Pagre à points bleus » ou *Pagrus Coeruleostictus* des mers tropicales.



A partir des 102 échantillons prélevés, les flores mésophiles psychrophiles, les entérobactéries et les *Vibrios* ont été recherchés au niveau de la chair et des branchies.

Des résultats obtenus, il ressort ce qui suit :

- ⇒ La chair du poisson frais contient une flore globale composée aussi bien de mésophiles que de psychrotrophes, avec une prédominance des mésophiles. Le niveau moyen de contamination est de  $3,10.10^2$  germes/g de chair pour la FMAT et  $1,56.10^2$  pour la FAP.
- ⇒ La contamination des branchies est plus importante avec une moyenne de  $0,98.10^4$ / gramme pour la FMAT et de  $2,78.10^2$  pour la FAP.
- ⇒ *Pseudomonas* se retrouve d'abord au niveau des branchies et secondairement dans la chair. Le niveau moyen de contamination des branchies est de  $1,3.10^2$  germes/g.

Les Entérobactéries sont absentes dans la chair et présentes dans les branchies avec un niveau moyen de  $7,8.10^2$  germes/gramme

- ⇒ Les bactéries du genre *Vibrio* ont été isolées aussi dans la chair que sur les branchies, avec une prédominance au niveau des branchies.

79 échantillons sur 102 analysés sont contaminés par *Vibrion* aussi bien dans la chair que sur les branchies, alors que 55 % des 79 échantillons sont contaminés dans la chair uniquement.

23 échantillons ne sont pas contaminés par les *Vibrions*.

L'identification des Vibrons dans les 79 échantillons contaminés a révèlè que :

- φ 55 % d'entre eux correspondent à *Vibrio alginolyticus* aussi bien au niveau de la chair que sur les branchies, avec une prédominance au niveau des branchies ;
- φ 23 % des échantillons sont porteurs de *Vibrio parahaemolyticus* au niveau des branchies ;

- φ 15 % des échantillons sont porteurs de Vibrio cholerae aussi bien au niveau de la chair que des branchies ;
- φ dans 6,32 % des échantillons l'identification de l'espèce du genre *Vibrio* n'a pas été possible.

De cette étude, il résulte que les bactéries prédominantes de la contamination initiale du poisson frais sont les vibrions et la flore mésophile. Les entérobactéries et pseudomonas se retrouvent particulièrement au niveau des branchies.

L'absence des entérobactéries, au niveau de la chair, montre que ces dernières contaminent la chair de manière secondaire.

L'utilisation soigneuse de méthodes de capture appropriées, associée à une manutention à bord des engins de pêche et l'utilisation précoce et continue de la chaîne de froid permettront d'obtenir des produits paucimicrobiens à l'entrée de l'usine.

Cependant, l'utilisation de matières premières paucimicrobiennes n'est pas suffisante pour garantir la qualité bactériologique du produit fini. Il faut en plus, appliquer les Bonnes Pratiques de Fabrication (hygiène et technologie) et les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

## *DEUXIEME PARTIE*

### *ETUDE EXPERIMENTALE*

## **CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES**

### **III- MATERIEL**

Le matériel utilisé est constitué du matériel biologique ou animal du matériel de laboratoire.

#### **3. PRODUITS ANALYSES**

Ce sont des poissons de l'espèce « Pagre à points bleus » entier (*Sparus Coeruleostictus*), capturé le même jour par des piroguiers débarquant à la plage de Hann.(Dakar)

Ces poissons sont communément appelés par les mareyeurs : « des pièces du jour ».

##### **□ Justification du choix de la plage de Hann**

La plage de Hann est située au Km 5, Boulevard du Centenaire de la Commune de Dakar.

Le choix de cette plage comme site de prélèvement se justifie par :

- Sa proximité du laboratoire d'analyses (HIDAOA) de l' EISMV
- L'avantage d'y trouver des mareyeurs sensibilisés sur l'importance du stockage sous glace du poisson.

En effet, ces derniers fournissent la matière première à certaines sociétés de pêche de la place.

- L'assurance de pouvoir trouver quotidiennement chez le mareyeur, l'espèce utilisée dans notre étude.

##### **□ Choix de l'espèce (*Sparus Coeruleostictus*)**

La plupart des *Sparidae* et plus particulièrement les pagres ou *Sparus* ont une excellente chair.

Du point de vue des quantités pêchées, l'espèce *Sparus* occupe le 6<sup>e</sup> rang des tonnages débarqués avec 1900 tonnes, en provenance des côtes Sénégalaises et Africaines de l'Ouest. D'où la demande très forte de ces poissons, traduisant leur importance économique. (22)

#### □ **Etat du poisson à l'achat**

Aussitôt après leur capture, les pagres sont mis dans des boîtes en PVC contenant de la glace de bonne qualité bactériologique.

#### **4. MATERIEL DE LABORATOIRE**

Le matériel de travail est celui communément utilisé dans tous les laboratoires de bactériologie alimentaire.

- **Matériel de stérilisation, de préparation de milieu de culture**

- autoclaves
- fours ou réchauds

- **Matériel de prélèvement**

- glacière
- 3 générateurs de froid ou carboglace fortement congelés pour le transport des échantillons sous régime de froid
- thermomètre infrarouge

- **Matériel utilisé pour les prises d'essai et les analyses**

- hotte à flux laminaire
- couteaux, ciseaux, pinces
- balances électroniques
- sachets stériles et « STOMACHER<sup>ND</sup> »
- broyeur
- portoirs pour sachets
- brûleurs (bunsen)
- bains-marie
- tubes à essais, pipettes
- boîtes de pétri
- milieux de culture
- réactifs.

- **Matériel d'incubation**

- étuves à (30°C, 37 °C, 44° et 46°C) et réfrigérateurs

- **Matériel de lecture**

- compteur de colonies.

## **IV- METHODES**

### **1. ECHANTILLONNAGE**

Les échantillons sont achetés le jour même de l'analyse. Chaque échantillon comprend 5 poissons entiers choisis au hasard.

Au total, 102 échantillons ont été prélevés et conservés sous régime de froid à l'aide de flacons de carboglace et d'une enceinte isotherme (glacière). Leur acheminement de la plage au laboratoire se fait en taxi, pour réduire au minimum, le temps séparant la capture des poissons et le début des analyses.

### **2. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE**

#### **Photo 1**

#### **3.1. PRISE DE TEMPERATURE**

Chaque échantillon est disposé dans un plateau en inox, préalablement nettoyé et désinfecté. La prise de température est effectuée à l'aide d'un thermomètre à infrarouge permettant l'obtention de la température à cœur. La température à cœur du poisson frais, stocké sous glace de 7° à 8°C.

#### **2.5. ECAILLAGE DU POISSON**

L'écaillage du poisson se fait à l'aide d'un couteau adapté. Le rinçage et l'égouttage succèdent l'écaillage.

Ces opérations ont pour but, de diminuer la flore microbienne au niveau de la peau, afin d'éviter toute contamination croisée avec la chair lors des prises d'essai.

#### **2.6. PREPARATION DE LA SUSPENSION MERE ET DES PRISES D'ESSAIS**

### **2.6.1. Prises d'essai**

La prise d'essai est la quantité de chair et de branchies prélevées pour l'analyse microbiologique.

Deux types de prélèvements ont été effectués au niveau de la chair et au niveau des branchies.

Ces prélèvements de font en commençant par le site le moins contaminé (la chair) vers le site le plus contaminé (les branchies).

#### **□ Prélèvement de la chair (Photo 2)**

C'est le protocole défini par l'arrêté du 21 décembre 1979 de la réglementation française qui a été utilisée. (25)

Mais nous nous sommes aussi inspirés des normes AFNOR (Association Française de Normalisation) qui sont appliquées dans le laboratoire d'hygiène Alimentaire de l'EISMV.

Dés l'arrivée de l'échantillon au laboratoire, on prélève de la chair sous la hotte à flux laminaire comme suit ; à l'aide d'un scalpel préalablement stérilisé, on délimite la zone à prélever pour incision de la peau.

Le prélèvement de la chair s'effectue ensuite, en profondeur à côté de l'arête centrale, à l'aide d'un couteau et de ciseaux stériles.

#### **□ Prélèvement des branchies**

Le prélèvement au niveau des branchies a été effectué selon deux méthodes :

- La première méthode consiste à faire un écouvillonnage. Dans ce cas, c'est le mucus recouvrant les branchies qui est récupéré dans des écouvillons contenant 5 ml de BCC (Bouillon Cœur Cervele).

Le tout est homogénéisé par agitation mécanique au vortex. Cet écouvillonnage branchial est utilisé pour la recherche des *vibrionaceae*.

- La deuxième méthode consiste à sectionner les branchies au niveau de leur insertion. Les branchies ainsi prélevées serviront à la recherche des types de flores suivantes : entérobactéries, flore globale et Pseu

### 2.6.2. Préparation de la suspension mère

#### Figure 4

10 g de chair ou de branchies sont introduits dans un sachet stomacher<sup>ND</sup> stérile.

On y ajoute 90 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) ou de (BBC). On obtient ainsi une suspension mère au 1/10. Le contenu du sachet est homogénéisé par broyage pendant 3mn au stomacher<sup>ND</sup>.

La suspension ainsi obtenue est laissée au repos pendant 30 mn, pour assurer la revivification des bactéries, stressées par le choc provoqué lors du broyage.

### 2.6.3. Dilution

On obtient la dilution de la suspension mère en établissant le rapport :

<b>Poids de l'aliment</b> ----- <b>Volume total (diluant + aliment)</b>
---

Ainsi 1 ml de la solution mère est prélevé et mis dans 9 ml d'eau peptonée tamponnée, la dilution  $10^{-2}$  est réalisée.

Pour réaliser la dilution  $10^{-3}$ , 1 ml de la précédente dilution est ajoutée dans 9 ml d'eau peptonée tamponnée et ainsi de suite pour réaliser les dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , etc.

## 2.7. ANALYSES BACTERIOLOGIQUES

### 2.7.1. Recherches des bactéries du genre Vibrio

Norme NFISO 8914 (Mai 1991)

#### figure 5

Ce sont des germes typiques qui peuvent être isolés du poisson fraîchement capturé et n'ayant subi aucune manipulation.

Leur recherche est, de ce fait, primordiale dans l'étude de la contamination initiale du poisson. Il s'agit essentiellement :

- des bactéries du genre vibrion



- des entérobactéries
- de la flore globalement constituée de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) à 30°C et de la flore psychrotrophe (FAP) à 5°C
- des Pseudomonas

### □ Etapes de la recherche de bactéries du genre *Vibrio*

La recherche des bactéries du genre *Vibrio* se fait en 4 étapes. A chacune de ces étapes, correspond un milieu de culture bien déterminé.

#### ➤ **Isolement**

A l'aide d'une pipette, Pasteur ou d'une öse, préalablement trempée dans la solution d'enrichissement, on réalise l'isolement par stries en surface sur le milieu TCBS.

Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24 h.

#### ➤ **Lecture**

Après incubation, 2 types de colonies peuvent être obtenus sur les boîtes de TCBS.

- des colonies rondes jaunâtres, saccharose positif :  
*V. alginolyticus*, *V. cholerae*.
- des colonies rondes vertes, saccharose négatif :  
*V. parahaemolyticus*.

Sur certaines boîtes, on peut avoir une coexistence des 2 types de colonies.

#### ➤ **Purification**

La gélose GNS (Gélose Nutritive Salée) est utilisée pour la purification des vibrios.

A l'aide d'une pipette Pasteur, on prélève une colonie sur TCBS pour ensemer les boîtes de GNS, en réalisant des stries superficielles. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h.

On obtient des colonies blanchâtres qui seront ensuite identifiées.

#### ➤ **Identification**

L'identification des vibrios est basée sur l'exploitation des caractères morphologiques et biochimiques de la famille.

Plusieurs techniques ont, de ce fait, été utilisées :

- La coloration de Gram

Elle a été réalisée à l'aide d'un Kit à Gram comprenant quatre éléments :

- Violet de Gentiane phénique
- Solution iodo – iodurée (Lugol)
- Solution d'alcool – acétone
- Solution de Fushine de Ziehl diluée.

On observe à l'immersion au microscope optique à l'objectif x 100, des bactéries colorées en rose à Gram négatif.

- Etat frais

L'état frais permet une observation directe des vibrions qui, sur le champ microscopique disparaissent et réapparaissent.

Ces mouvements rapides attestent de la mobilité des vibrions grâce à la présence d'un flagelle polaire (bactérie monotriche).

- Recherche de l'oxydase OX

La recherche de l'oxydase permet de différencier au sein des bactéries à Gram négatif, les vibrions ( $OX^+$ ) et les entérobactéries.

Des disques imprégnés d'oxalate de diméthyl –Para-Phénylène – diamine ont été utilisés pour la recherche de l'oxydase.

- Composé vibriostatique 0/129

Il permet de faire un diagnostic différentiel au niveau de la famille des vibrionaceae entre les Aeromonas et vibrio.

La sensibilité ou la résistance à l'action vibriostatique de la 2,4 diamino – 6,7 diisopropylptéridine, encore appelée « composé vibriostatique 0/129 », est recherchée dans ce test à l'aide de disques imprégnés.

- Mode opératoire

On ensemence, par inondation, une gélose Mueller –Hinton (MH) ou GNS.



Après séchage, au bout de 15 minutes à l'étuve 37 °C, on dépose un disque en appuyant légèrement à l'aide d'une pince, pour en assurer l'adhérence avec la gélose.

Après incubation, l'absence de zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur ou égal à 15 mm, montre la sensibilité au composé 0/129 : vibrio.

#### - Test de l'halophilie

Elle permet l'identification des vibrions halophiles tels que (V. parahaemolyticus et V. alginolyticus) par rapport à V. cholerae non halophile.

Le milieu utilisé est le milieu E.P.I (Eau Peptonée exempte d'Indole) à différentes concentrations de NaCl.

#### • Mode opératoire

Dans chaque tube, 5 ml d'EPI sont introduits à une concentration donnée de NaCl.

Parallèlement, une suspension de vibrions est effectuée comme suit :

- Une colonie prélevée sur la gélose GNS est mise dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

- Après Homogénéisation, une goutte de cette suspension sert à inoculer chaque tube d'EPI.

La lecture se fait après 24 h d'incubation.

Tableau VIII : Interprétation du test de l'halophilie

% NaCl	3% NaCl	7% NaCl	10 %NaCl	Vibrio correspondant
-	+	+	-	<u>V. parahaemolyticus</u>
-	+	+	+	<u>V. alginolyticus</u>
+	-	-	-	<u>V. cholerae</u>

+ = Croissance ;    - = Pas de croissance

- Gélose chromagar

Les colonies de vibrions, purifiées sur GNS, sont repiquées sur cette gélose en surface. On obtient après 24 h d'incubation :

- soit des colonies pourpres : V. parahaemolyticus
- soit des colonies blanchâtres : V. alginolyticus.

**2.7.2. Dénombrement de la flore globale (Fig 6)**  
NFV08-051 (déc.1992)

Deux types de flores ont été dénombrés en fonction de la température d'incubation : la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) à 30 °C et la Flore Aérobie Psychrotrophe à 5 °C ( FAP).

➤ **Milieu de culture utilisé**

La gélose Plate Count Agar (PCA) a permis le dénombrement des deux flores.

En raison de sa faible sélectivité, elle est utilisée en double couche pour éviter l'envahissement de la surface de la boîte par des germes contaminants comme *Proteus*.

La composition des différents milieux de culture est donnée en annexe.

➤ **Mode opératoire**

Les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  sont réalisées pour la chair, alors que pour les branchies qui ont un niveau de contamination plus important, les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-3}$  sont utilisées.

On prélève aseptiquement 1 ml de chaque tube de dilution que l'on dépose dans des boîtes de Pétri ; on coule ensuite dans chaque boîte, 15 ml de PCA.

L'homogénéisation se fait par des mouvements circulaires, pour mélanger l'inoculum au milieu PCA.

Après solidification de la première couche, on coule la deuxième couche, à raison de 5 ml de PCA pour éviter l'envahissement de la surface par les *Proteus* et les *Bacillus*.

A l'incubation, les boîtes sont retournées, couvercles vers la clayette de l'étuve à 30 °C pour la FMAT, pendant 48 à 72 h à 5°C au réfrigérateur pour la FAP (Flore Aérobie Psychrotrophe) pendant 5 à 10 jours.

A l'issue de ce délai, a lieu la lecture.

### ➤ Lecture

La lecture se fait sur 2 boîtes ensemencées avec des dilutions successives à l'aide d'un compteur de colonies muni d'une loupe ou à l'œil nu.

Les colonies observées sont de couleur blanches- laiteuses avec une forme de grain de riz et poussent en profondeur.

Le nombre de germes par gramme de produit est obtenu selon la formule suivante :

$$N = \frac{EC}{\left[ V (n_1 + 0,1) n_2 \times d \right]}$$

**N** = nombre de germes par gramme de produit

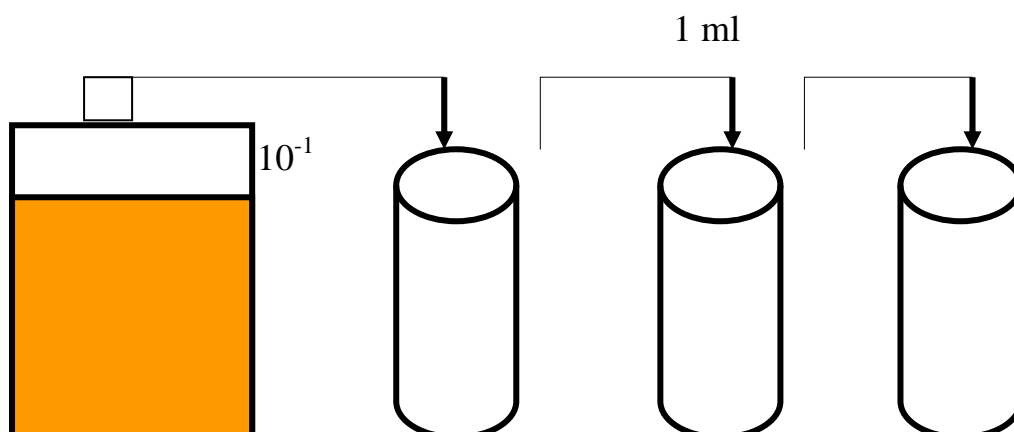
**EC** = somme des colonies caractéristiques sur les boîtes retenues

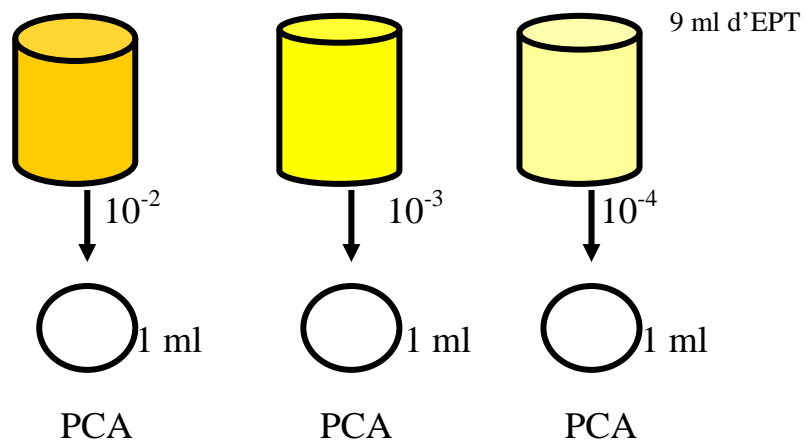
**V** = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte (en ml)

**d** = taux de dilution correspondant à la 1<sup>ère</sup> dilution retenue

**n<sub>1</sub>** = nombre de boîtes lues à la 1<sup>ère</sup> dilution

**n<sub>2</sub>** = nombre de boîtes lues à la 2<sup>ème</sup> dilution.





L'incubation se fait à 30°C pour la FMAT et 5 °C pour la FAP.

**Figure 4 : Dénombrement de la FMAT à 30°C et de la FAP à 5°C.**  
NF.V. 08-051 (déc.1992)

### 2.7.3. Dénombrement des entérobactéries

NF V. 08-054 (Oct. 93)

Les bactéries de la famille des entérobactéries ont été recherchées aussi bien au niveau de la chair, qu'au niveau des branchies.

#### ➤ Milieu de culture utilisée

La gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre est utilisée pour le dénombrement des entérobactéries (VRBG).

Elle inhibe la croissance des bactéries à Gram positif et pratiquement celle des autres bactéries à Gram négatif.

Les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  ont été utilisées pour la recherche des *enteriobacteriaceae* dans la chair, alors que dans leur recherche au niveau des branchies, les dilutions ont été poussées jusqu'à  $10^{-3}$ .

#### ➤ Lecture

Après 24 h d'incubation, on dénombre sur la gélose VRBG, les colonies rondes rouges violacées, ayant un diamètre d'au moins 0,5 mm.

Le résultat est apporté à l'unité de produit (1g) selon la précédente formule.

- Le test de **MACKENZIE**

Les bactéries du genre *Echerichia Coli* peuvent être caractérisés par le test de **MACKENZIE** (fermentation du lactose et dégagement de gaz).

- Production d'indole :

Elle est mise en évidence à partir d'une suspension bactérienne. Une goutte de cette suspension est introduite dans un tube de BLBVB contenant une cloche de Durham et dans un tube d'EPI stérile.

Après incubation du BLBVB pendant 24 h à 44°C et de l'EPI pendant 24 h à 37 °C, on procède à la lecture de la manière suivante :

- Le tube de BLBVB est positif (présence d'E. Coli) quand il y a croissance bactérienne au fond du tube, turbidité du milieu et dégagement gazeux dans la cloche de Durham.

La recherche de la production d'indole s'effectue en introduisant quelques gouttes de réactifs de Kovacs dans le tube d'EPI. Un résultat positif se manifeste par l'apparition d'un halo rouge.

#### 2.7.4. **La recherche des bactéries du genre *Pseudomonas*** XP V08-059 (Nov. 1995)

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont les principaux germes d'altération du poisson stocké sous glace.

Pour l'isolement de *Pseudomonas aeruginose* ou bacille pyocyanique, la gélose *pyocyanosel* a été utilisée.

Les boîtes préalablement coulées sont inoculées en surface à l'aide des dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ . Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h.

#### ➤ **Lecture**

Les colonies obtenues sont vertes. Cette coloration est due à la production d'un pigment vert, la pyoverdine par la bactérie.

## **CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION**

### III- RESULTATS

**Tableau IX : Contamination du Pagre par la FMAT**

Valeur en nombre de germes/ gramme	Sites ou localisations	
	Chair	Branchies
Valeur minimale	00	$5,10^2$
Moyenne	$3,10.10^2$	$0,98.10^4$
Valeur maximale	$1,1.8.10^3$	$3,34.10^4$

D'après ce tableau, nous constatons que la FMAT est présente aussi bien dans la chair que dans les branchies du poisson frais, avec une moyenne de  $3,10.10^2$  au niveau de la chair et  $0,98.10^4$  au niveau des branchies.

La valeur maximale au niveau de la chair qui est de  $1,18.10^3$  germes/gramme reste de loin plus faible que celle des branchies qui est de  $3,34.10^4$  germes/ gramme.

**Tableau X : Contamination du Pagre pour la FAP**

Valeur en nombre de germes/ gramme	Sites ou localisations	
	Chair	Branchies
Valeur minimale	00	00
Moyenne	$1,56.10^2$	$2,78.10^2$
Valeur maximale	$1,61.10^3$	$1,81.10^3$

Ce tableau nous montre que la contamination du Pagre par la FAP est plus importante au niveau des branchies qu'au niveau de la chair avec une moyenne de  $1,56.10^2$  pour la chair et  $2,78.10^2$  pour les branchies.

**Tableau XI : Contamination du Pagre par les bactéries du genre**



### **Pseudomonas**

<b>Valeur en nombre de germes/ gramme</b>	<b>Sites ou localisations</b>	
	<b>Chair</b>	<b>Branchies</b>
Valeur minimale	0	0
Moyenne	$0,26.10^2$	$0,13.10^2$
Valeur maximale	$0,6.10^2$	$3,1.10^2$

Nous constatons dans ce tableau que le Pagre est faiblement contaminé par les bactéries du genre *Pseudomonas*, aussi bien au niveau des branchies qu'au niveau de la chair.

**Tableau XII: Contamination du Pagre par les entérobactéries**

<b>Valeur en nombre de germes/ gramme</b>	<b>Sites ou localisations</b>	
	<b>Chair</b>	<b>Branchies</b>
Valeur minimale	0	0
Moyenne	0	$7,08.10^2$
Valeur maximale	0	$5.10^2$

**Tableau XIII : Contamination du Pagre par les bactéries du genre Vibrio**

Résultats	Pourcentages correspondants au niveau des deux sites	
	Chair	Branchies
Présence	55%	60%
Absence	45%	42%

**Tableau XXIV : Contamination globale des 102 échantillons de Pagre à Points bleus par les bactéries du genre Vibrio**

Nombre d'échantillons contaminés				Nombre d'échantillons non contaminés
<b>Total</b>				<b>79 échantillons</b>
Par V. alginolyticus : 44	Par V. parahaemolyticus : 18	N.I : 05	Par V. cholerae : 12	Absence totale : 20

**N.I** : Non Identifié (les colonies obtenues sur TCBS caractéristiques sont également sensibles au composé 0/129, sont à Gram négatif poussent sur EPI salée, mais n'ont pas pu être identifiées par les autres tests (galerie API 20 E).

## **IV- DISCUSSION**

### **1. METHODOLOGIE**

L'étude de la contamination initiale du poisson, en zone tropicale n'a été envisagée que récemment (*FAYE*, 2002, *MIASSAGOUMOUKA*, 2002), d'où les difficultés à choisir une méthodologie.

Le choix de la méthodologie a d'abord porté sur les types de prélèvements à effectuer sur le poisson puis sur les types de bactéries à rechercher et sur leur température d'incubation.

Toutefois, les études antérieures réalisées en zone tempérée nous ont guidé dans le choix de la méthodologie adoptée.

Ainsi, les types de prélèvements sélectionnés ont concerné la chair, produit de consommation et les branchies.

Le prélèvement des branchies se justifie par le fait que, comme l'ont affirmé de nombreux auteurs, les bactéries retrouvées au niveau de la chair ont pour origine les sites initiaux de la contamination (tube digestif et branchies).

En ce qui concerne les types de bactéries recherchées (*Vibrios*, *FMAT*, *FAP*, *Pseudomonas*, *Entérobactéries*), nous avons choisi d'étudier la flore dominante de la contamination primaire du poisson représentant 90% de celle-ci. (2).

Par ailleurs, les études réalisées par *SEYDI* et *COLL* au Sénégal. (34) par), au Japon et aux U.S.A (20) nous ont amené à rechercher et à accorder une importance particulière à la famille des *vibrionaceae*.

La recherche des entérobactéries se justifie par la bonne survie des salmonelles et des coliformes dans le milieu marin.

Toutefois, cette recherche serait plus intéressante dans l'étude de la contamination secondaire des denrées manipulées tels que les filets.

### **2. CONTAMINATION BACTERIENNE DU PAGRE A POINTS BLEUS**

La discussion des résultats des analyses bactériologiques consistera à apprécier le niveau de contamination (global) pour chaque groupe de germes recherché par rapport aux critères microbiologiques relatifs aux produits de la pêche d'une part, et par rapport aux sites de prélèvement (chair et branchies), afin de comparer les résultats obtenus au niveau des deux types de flores bactériennes.

## **2.1. APPRECIATION DU NIVEAU DE CONTAMINATION DU PAGRE A POINTS BLEUS PAR LES ENTEROBACTERIES ET LES BACTERIES DU GENRE PSEUDOMONAS**

### **3.1.1. Contamination du Pagre par les entérobactéries**

#### **⇒ Contamination de la chair par les entérobactéries**

Comme l'indique le tableau XII d'une manière générale, la chair des échantillons analysés ne renferme pas d'entérobactéries.

Ceci vient confirmer les travaux de nombreux auteurs comme *SEYDI* (35) et *HUSS* (14), qui affirment que la chair du poisson vivant ou venant d'être capturé est tout à fait stérile.

Des travaux effectués par *TAYLOR* cité par *PETIT* (28), ont montré que les entérobactéries ne se retrouvent ni dans la chair, ni dans les intestins du poisson.

L'absence d'entérobactéries au niveau de la chair, montre que ces derniers contaminent la chair de manière secondaire.

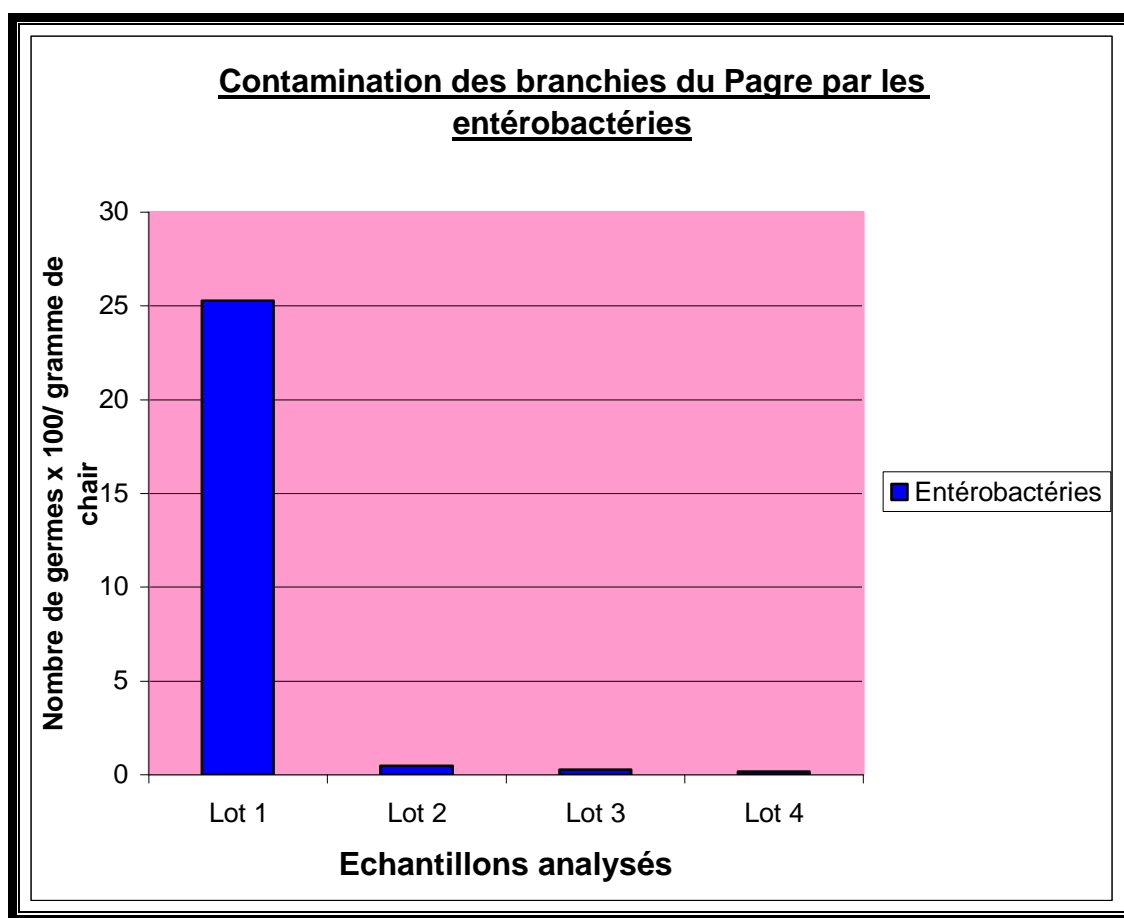
#### **⇒ Contamination des branchies par les entérobactéries**

##### **Figure 7**

L'analyse bactériologique de 102 échantillons de branchies a permis de déceler une moyenne de  $7,8.10^2$  germes/gramme. (Tableau XII)

Les résultats obtenus pour la contamination initiale des branchies sont compris dans l'intervalle donnée par certains auteurs comme *SEYDI* (35) :  $10^3$  à  $10^6$  germes/ gramme de branchies.

Par rapport aux sites de prélèvements, les entérobactéries et les *Pseudomonas* se trouvent surtout au niveau des branchies.



**Figure 7: Contamination des branchies du Pagre par les entérobactéries**

### **3.1.2. Contamination du Pagre par les bactéries du genre *Pseudomonas***

Ce sont les principaux germes d'altération du poisson qui sont à l'origine d'importantes pertes économiques.

Les bactéries du genre *pseudomonas* et celles des genres *Aeromonas*, *Moraxella* et *Alcaligenes* représentent 95% de la flore du milieu aquatique **NDIAYE (03)**.

Sur les 102 échantillons de chair analysés, il y a une très faible présence de *Pseudomonas*.

Seuls 27 échantillons ont permis d'isoler *Pseudomonas* avec un nombre de colonies tout à fait négligeable en moyenne  $0,06.10^2$  germes/gramme de chair, contre une moyenne de  $1,3.10^2$  germes/gramme de branchies.

Ainsi, ceci vient confirmer les travaux de nombreux auteurs (14), (28) et (15) qui montrent que, la localisation initiale de la flore d'altération du poisson en particulier des *Pseudomonas*, est surtout branchiale ou intestinale.

C'est au cours de l'altération que les branchies envahissent la chair à travers les fibres de collagène.

### **3.2. CONTAMINATION DE LA CHAIR PAR LES DEUX TYPES DE FLORES FMAT ET FAP**     **Figure 8**

FMAT ou la flore mésophile aérobie totale représente, si elle est réalisée par les méthodes traditionnelles, le nombre total de micro-organismes capables de former des colonies visibles sur un milieu de culture à une température donnée. Ce chiffre est rarement un bon indicateur de la qualité sensorielle ou de la durée espérée de conservation du produit (*HUSS et al.*, 1974).

Si une numération faite après un échantillonnage systématique et une connaissance parfaite de la manutention du poisson avant l'échantillonnage et des conditions de température, elle peut donner une mesure comparative du degré général de contamination bactérienne et de l'hygiène mise en œuvre.

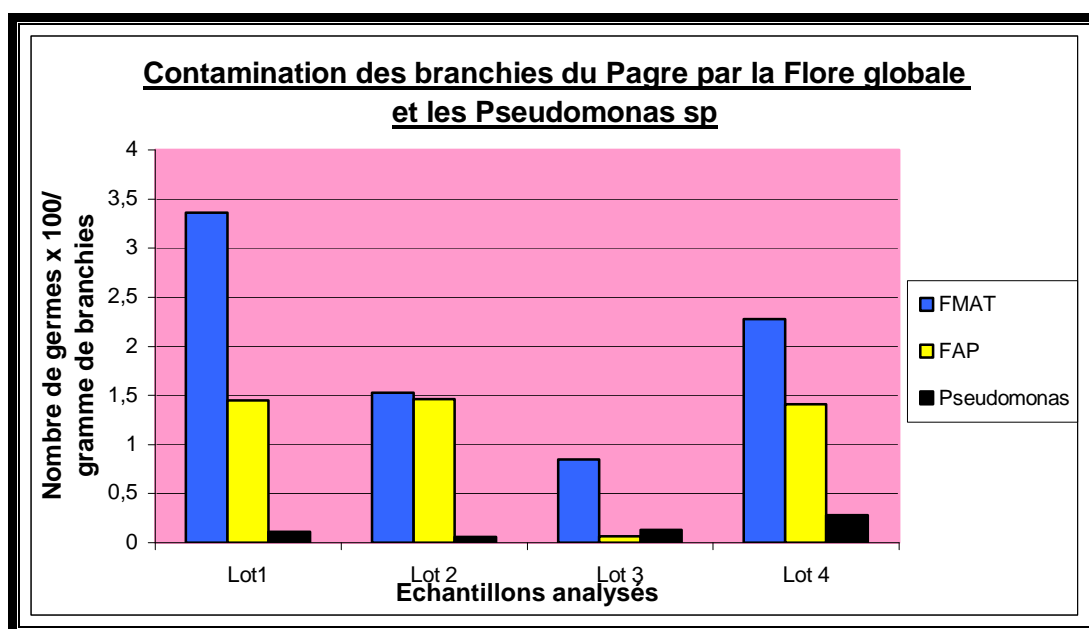
Il faut cependant noter qu'il n'y a pas de rapport entre la flore aérobie totale et la présence de bactéries pathogènes.

Par contre, les géloses courantes (PCA) sont encore les substrats les plus utilisés pour la détermination de la FMAT. (14)

Les résultats des analyses de ce groupe de germes comparés aux normes consignés dans le Tableau XX montre que :

- Les échantillons de la chair et des branchies sont contaminés respectivement à 99 et 100% par la flore mésophile aérobie totale.

Selon *SHEWAN* (1977) cité par *HUSS* (14), seuls 5 % de la flore des poissons des pays tempérés sont mésophiles alors que pour ceux capturés aux larges des côtes Mauritanienues, les mésophiles et les psychrophiles représentent respectivement 55% et 45%.



**Figure 8 : Contamination des branchies du Pagre par la flore globale et les Pseudomonas sp**

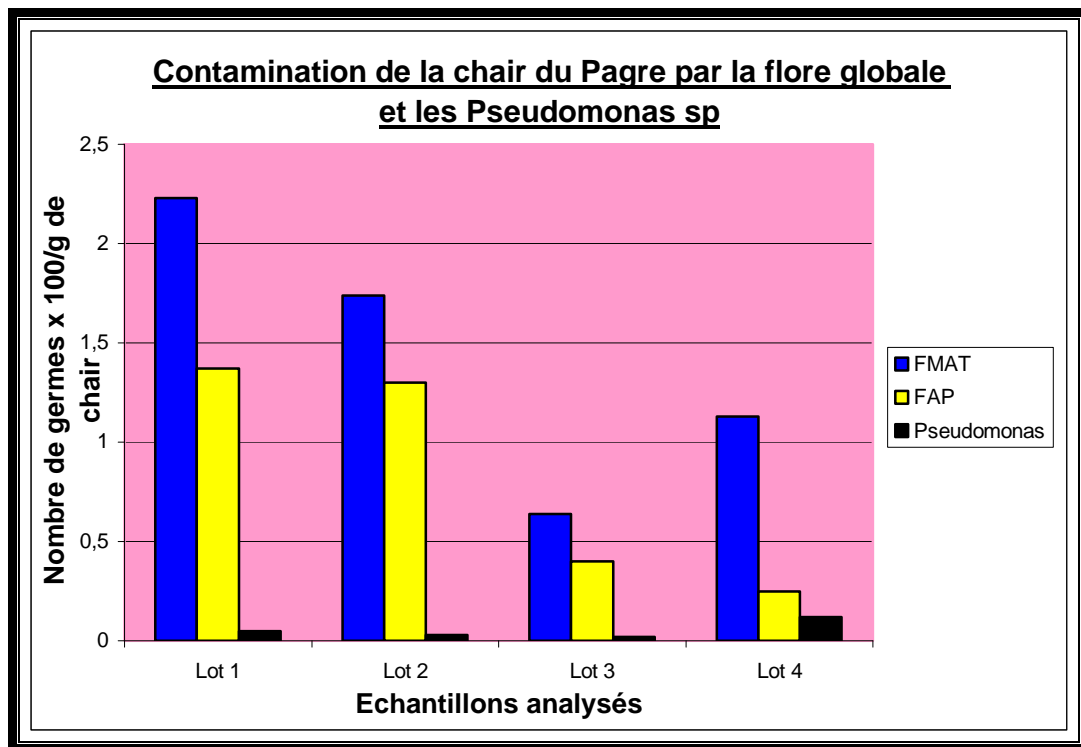
### **3.3. CONTAMINATION DU PAGRE A POINTS BLEUS PAR LA FLORE GLOBALE (FMAT ET FAP)**

Les moyennes obtenues pour la FMAT sont de  $3,10.10^2$  pour la chair et  $0,98.10^4$  pour les branchies.

Les branchies sont donc plus contaminées que la chair. Les résultats obtenus pour la FAP sont similaires au précédent (prédominance des bactéries au niveau des branchies) avec une moyenne de  $1,56.10^2$  pour la chair et  $2,78.10^2$  germes/gramme pour les branchies.

Les figures 8 et 9 montrent le niveau de contamination bactérienne du Pagre par lot de 25 à 26 échantillons analysés au niveau de la chair et des branchies.

Dans l'ensemble, on note une prédominance de la FMAT. Rappelons que les résultats enregistrés pour la FMAT le sont au bout de 72 heures d'incubation alors que pour la FAP, les résultats obtenus sont compris entre 5 et 10 jours d'incubation.



**Figure 9 : Contamination de la chair du Pagre par la flore globale et les *Pseudomonas sp***

### **3.4. CONTAMINATION DU PAGRE PAR LES VIBRIONS**



Les vibrions sont présents à un taux de 55 % dans la chair, alors que pour les branchies, la contamination est plus importante avec un taux de portage de 60 %.

Les test d'identification effectués sur les 79 échantillons, ont montré que :

- 56 % des échantillons sont porteurs de *Vibrio alginolyticus* aussi bien dans la chair que sur les branchies
- 14 échantillons sont porteurs de *Vibrio alginolyticus* au niveau de la chair uniquement.
- 11 échantillons sont porteurs de *Vbriio alginolyticus* au niveau des branchies.
- 18 échantillons sont porteurs de *Vibrio parahaemolyticus* aussi bien sur les branchies que sur la chair.
- 3 échantillons sont porteurs de *Vibrio parahaemolyticus* au niveau de la chair uniquement.
- 23% des échantillons sont porteurs de *Vibrio parahaemolyticus* au niveau des branchies.
- 12 échantillons sont porteurs de *V. cholerae*.

Les vibrions sont enfin absents dans 23 échantillons.

Le taux de portage de *Vibrio parahaemolyticus*, 0,18% chez le Pagre est inférieur à celui trouvé par **SEYDI** et **COLL.** qui ont pu l'isoler chez différentes espèces, avec un taux de 7,64 % légèrement supérieur au taux obtenu par **FAYE.** (10)

La fréquence élevée des vibrions dans le Pagre est liée à son milieu. En effet, ce dernier est une espèce benthique qui vit aussi bien en profondeur qu'en surface.

Mais, il faut noter aussi que la température et la salinité entre autres ne sont pas négligeables et peuvent également être déterminantes dans la contamination du poisson par les vibrions.

#### **4. PROPOSITIONS D'AMELIORATION**

La contamination initiale du poisson est déterminée par un certain nombre de facteurs : Intrinsèques (liés à l'espèce) et extrinsèques (liés à l'environnement). Les propositions seront apportées au niveau de ces différents facteurs.

- Par rapport aux facteurs intrinsèques

Ces facteurs sont liés à l'espèce notamment à sa biologie (habitat, alimentation, respiration, reproduction etc.). En effet, l'animal marin vit en équilibre avec son environnement. Ce dernier est caractérisé par une multitude de facteurs physico-chimiques qui déterminent la nature de la flore de contamination.

Cependant, l'homme ne peut guère agir sur ces facteurs, sources de l'équilibre biologique du milieu marin.

- Par rapport aux facteurs extrinsèques

→ La zone de pêche

La zone de pêche a une influence notoire sur la contamination bactérienne du poisson.

Les zones littorales, qui reçoivent les divers affluents, provenant de l'activité humaine ou animale, sont les plus polluées.

On peut prévenir la contamination du poisson par :

- la réglementation de l'exploitation de pêche
- le traitement du produit, pour le rendre à la consommation.

→ Mode de capture

La plupart des espèces utilisées en Industrie Halieutique est capturée au chalut (espèces de petite taille).

Avec cette méthode de pêche, le poisson est traîné durant des heures, entraînant son écaillage et sa contamination par les bactéries des sables et des boues marines.

Les actions préconisées à ce niveau sont :

- la réduction au minimum du temps de capture
- l'élimination total ou l'éclatement des viscères.

→ Manutention à bord des engins de pêche

En premier lieu, les caisses, lorsqu'elles sont vides et avant d'être réutilisées, doivent être lavées avec des détergents et désinfectants à effet rémanent. Ce qui permettrait, après le séjour en mer, de ramener des caisses propres. Cette méthode est également utilisée, pour l'entretien quotidien du matériel de lavage et de convoyage du poisson jusqu'à la transformation industrielle.

Les cales de chalutiers de pêche, dès que le poisson est déchargé, doivent être soumises à cette même méthode de lavage par propulsion mécanique sur les parois et diverses séparations et au niveau des emplacements de stockage.

→ Traitement appliqué juste après la capture

Compte tenu de la localisation initiale des bactéries du poisson (peaux, branchies et intestins), des mesures d'hygiène doivent être préconisées pour éviter l'altération de la chair par les bactéries et pour allonger la durée de conservation du produit.

- le poisson, tout juste après la capture, doit être saigné. Cette saignée est plus efficace lorsqu'elle est suivie d'une éviscération, d'un ébranchage, puis d'un lavage externe et interne soigneux.

Cependant, une éviscération mal faite est pire qu'une absence d'éviscération. De plus, il faut utiliser pour le lavage du poisson déjà éviscéré et ébranché, une eau contrôlée de qualité microbienne connue.

→ Le stockage du poisson

C'est l'étape déterminante pour prévenir l'invasion microbienne, source d'altération du poisson.

Il est essentiel d'utiliser de la glace de bonne qualité bactériologique et en quantité suffisante dès le début du stockage.

Pour se faire, il faut utiliser des caisses appropriées permettant l'élimination de l'eau provenant de la fonte de la glace.

Le maintien de la chaîne de froid est nécessaire au cours de toute la vie économique du poisson.

Ces mesures d'hygiène, lorsqu'elles sont respectées, contribueront à l'obtention d'un poisson de qualité microbienne satisfaisante.

Toutes ces suggestions ne trouveront leur réelle utilité que si les responsables sont sensibilisés.

Cette sensibilisation passe par des campagnes de formation du personnel sur les bonnes pratiques d'hygiènes. A cet égard, la mise en place d'un service de qualité est indispensable.

Un tel service en collaboration avec le laboratoire sera en mesure non seulement d'assurer la qualité des produits exportables, mais également d'apporter des éclaircissements plus approfondis sur la contamination initiale du poisson des mers tropicales par rapport à la contamination surajoutée.

Il serait également judicieux d'avoir des normes définies à partir des types de bactéries rencontrées dans le poisson frais des mers tropicales.

## CONCLUSION GENERALE

### ***CONCLUSION GENERALE***

L'exploitation des produits de la pêche constitue une source non négligeable de devises pour le Sénégal.

En effet elle dégage un excédent annuel de 24 milliards de francs CFA.

Toutefois, la qualité bactériologique souvent non-conforme, des produits exportés est le principal facteur limitant de l'industrie halieutique sénégalaise. Cette qualité bactériologique est la résultante des deux types de contamination, initiale et surajoutée.

Or, peu de travaux ont été réalisés sur les poissons des mers tropicales, pour déterminer le niveau de contamination initiale.

L'objectif de cette étude a été d'apprécier le niveau de contamination initiale des poissons de mers, en choisissant comme espèce « Le Pagre à points bleus » ou *Pagrus Coeruleostictus* des mers tropicales.

A partir des 102 échantillons prélevés, les flores mésophiles psychrophiles, les entérobactéries et les *Vibrios* ont été recherchés au niveau de la chair et des branchies.

Des résultats obtenus, il ressort ce qui suit :

- ⇒ La chair du poisson frais contient une flore globale composée aussi bien de mésophiles que de psychrotrophes, avec une prédominance des mésophiles. Le niveau moyen de contamination est de  $3,10.10^2$  germes/g de chair pour la FMAT et  $1,56.10^2$  pour la FAP.
- ⇒ La contamination des branchies est plus importante avec une moyenne de  $0,98.10^4$ /gramme pour la FMAT et de  $2,78.10^2$  pour la FAP.
- ⇒ *Pseudomonas* se retrouve d'abord au niveau des branchies et secondairement dans la chair. Le niveau moyen de contamination des branchies est de  $1,3.10^2$  germes/g.

Les Entérobactéries sont absentes dans la chair et présentes dans les branchies avec un niveau moyen de  $7,8.10^2$  germes/gramme

- ⇒ Les bactéries du genre *Vibrio* ont été isolées aussi dans la chair que sur les branchies, avec une prédominance au niveau des branchies.

79 échantillons sur 102 analysés sont contaminés par *Vibrio* aussi bien dans la chair que sur les branchies, alors que 55 % des 79 échantillons sont contaminés dans la chair uniquement.

23 échantillons ne sont pas contaminés par les *Vibrions*.

L'identification des Vibrons dans les 79 échantillons contaminés a révèlé que :

- φ 55 % d'entre eux correspondent à Vibrio alginolyticus aussi bien au niveau de la chair que sur les branchies, avec une prédominance au niveau des branchies ;
- φ 23 % des échantillons sont porteurs de Vibrio parahaemolyticus au niveau des branchies ;
- φ 15 % des échantillons sont porteurs de Vibrio cholerae aussi bien au niveau de la chair que des branchies ;
- φ dans 6,32 % des échantillons l'identification de l'espèce du genre Vibrio n'a pas été possible.

De cette étude, il résulte que les bactéries prédominantes de la contamination initiale du poisson frais sont les vibrions et la flore mésophile. Les entérobactéries et pseudomonas se retrouvent particulièrement au niveau des branchies.

L'absence des entérobactéries, au niveau de la chair, montre que ces dernières contaminent la chair de manière secondaire.

L'utilisation soigneuse de méthodes de capture appropriées, associée à une manutention à bord des engins de pêche et l'utilisation précoce et continue de la chaîne de froid permettront d'obtenir des produits paucimicrobiens à l'entrée de l'usine.

Cependant, l'utilisation de matières premières paucimicrobiennes n'est pas suffisante pour garantir la qualité bactériologique du produit fini. Il faut en plus, appliquer les Bonnes Pratiques de Fabrication (hygiène et technologie) et les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

## BIBLIOGRAPHIE

1. **ABABOUCHE L.**  
Assurance de la qualité en industrie halieutique.  
Rabat : Ed. Actes, 1995, 127 – 214p.
2. **AZIBE M.**  
Contribution à l'étude de la qualité parasitologique bactériologique et chimique des filets de poissons congelés produits au Sénégal.  
Th. Méd. Vét. Dakar 1991, 19. 96p.
3. **BERRUYER J.P.**  
Contribution à l'étude de la contamination des farines de poisson par les salmonella. Etude des propriétés biochimiques de la sensibilité aux antibiotiques de salmonella isolées dans les farines de poisson marocains.  
Th. Méd. Vét. Toulouse : 1975 ; 56p.
4. **SERET B.**  
Poissons de mer de l'Ouest Africain Tropical. Initiations – Documentations techniques N° 49.  
Paris ORSTOM : 1981 – 234 p.
5. **BOURGEOIS G.N. ; LEVEAU J.Y.**  
Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires : vol. 3. Le contrôle microbiologique.  
Paris : Lavoisier : Technique et documentation 198 ...331p.
6. **BUCHANAN R.E ; GIBBONS N.E.**  
Bergey's manual of determination bacteriology. 8<sup>e</sup> edit.  
Baltimore: The Williams and Wilking Company, 1974, 1268 p.
7. **DEKINKELIN P. ; MICHEL CH. ; GHITTINO P.**  
Précis de pathologie des poissons.  
Paris : INRA ; OTE ; 1985 – 240p.
8. **DHAOUI**  
Aspects sanitaires particuliers des produits de la pêche.  
N° spécial Recherche des germes pathogènes dans les aliments.  
Juin 1994, 113. 122.  
Microbiologie hygiène alimentaire.
9. **DIONE A.**  
Contribution à l'étude de la qualité bactériologique de quelques denrées alimentaires d'origine animale commercialisées sur le marché dakarais.



Th. Méd. Vet – Dakar 2000 – N° 3 - 114p.

**10. FAYE C.**

Contribution à l'étude de la contamination initiale du poisson des mers tropicales.  
Th. Méd.Vêt. – Dakar 2002- N° 26- 96p.

**11. FOURNAUD J.**

Types de germes rencontrés aux différents stades de la filière  
in « hygiène et technologie de la viande fraîche ».  
Paris : Edition du CNRS 1982. 352p.

**12. LECLERC H. ; BUTTIAUX J. ; GUILLAUME P. ; WATTRE R.**

Microbiologie appliquée.  
Paris édition : 1977 - 228p.

**13. HUMBERT F.**

Les salmonelloses in manuel de bactériologie alimentaire.  
Paris édit. Polytechnica 1998 - 132p.

**14. HUSS H. H.**

Le poisson frais : sa qualité et altération de qualité. Collection FAO ; 29.  
Rome : FAO. Danida 1988 - 132p.

**15. International Commission on Microbiological Specifications for Foods  
(I. C. M. S. F.)**

Fish and shellfish and their products foods commodities in microbial ecology of  
food.  
New York : Ed. Académic. Press, vol.2, Food Commodities 1980 - 605 p.

**16. International Commission on Microbiological Specifications for Foods  
(I. C. M. S. F.)**

Microorganisms in foods = their signification and methods of enumeration –  
2ème ed.Toronto- University of Toronto Press: 1978 - 434p.

**17. JAMET J. ; LAGOIN Y.**

Manuel d'instruction et de perfectionnement des agents des services des pêches  
maritimes des pays tropicaux. Tome I.  
Paris : Ed. Ministère de la coopération ; 1974 ; 447p.

**18. CLUCAS J.**

Manutention, conservation et transformation du poisson sous les tropiques.  
Ed. Française CTA.  
G 145: Ed : Tropical Development and Research Institute 1986  
London septembre ; 102p.

**19. MAIGRET J. et LY B.**

Les poissons de mer de Mauritanie.  
Nouackchott : 82 – 133p.

**20. LISTON J.**

Health and safety of sea –  
Foods in food Technol -1980, 32 (9): 428 – 436p

**21. BAUCHOT M. L. et PRAS A.**

Guide des poissons d'Europe.  
Paris Ed : 1980 ; 280 à 291p.

**22. MIASSANGOUMOUKA J. P.**

Contribution à l'étude de la qualité bactériologique des poissons utilisés comme matières premières dans les entreprises sénégalaises exportatrices de produits halieutiques.  
Th : Méd. Vét. Dakar ; 2002 –N°6 - 23 – 69p.

**23. NDIAYE A.**

Contribution à l'étude de l'évolution de la qualité bactériologique des produits de la pêche destinés à l'exportation en 1996 et 1997.  
Th : Méd. Vét. Dakar ; N°17-1998

**24. NIANG P. N.**

Etude de la qualité de la qualité hygiénique et commerciale des fruits de mer Sénégalais destinés à l'exportation.  
Th. Méd. Vét. Dakar 2002 –N°29- 23 – 25p.

**25. PETRANSXIENE D. et LAPIED L.**

Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers. Analyse et tests.  
2<sup>ème</sup> édition  
Paris. Technique et documentation, 1981, 225p.

**26. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE : série de rapports techniques**

Aspects microbiologiques de l'hygiène des denrées alimentaires.  
Rapport d'un comité OMS d'experts réuni avec la participation de la FAO.  
Genève OMS, 1976 N° 598, 11p.

**27. OUATTARA B.**

Etude de la qualité bactériologique des filets de poissons congelés.  
Th. Méd. Vét. Dakar ; 1986 ; 20p.

**28. PETIT A.**

Microbiologie des poissons.  
R.V.T.A. 1987 (227) ; 22 – 25p.

**29. ROSSET R.**

Effet du froid sur les organismes.  
R.V.T.A. JANVIER – FEVRIER, 1987 ; 20 – 26.

**30. ROSSET R. BEAUFORT A.**

Nature et description des intoxications alimentaires.

In : Restauration Sociale et Commerciale.

Paris ; Informations Techniques Services Vétérinaires Français 1983; 39 .

**31. ROZIER J.**

Comprendre et pratiquer l'hygiène en cuisine. 2<sup>ème</sup> édition.

Paris Ed. cuisine collective 1992, 236p.

**32. ROZIER J. ; CARLIER V. ; BOLNOT F.**

Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments.

Paris - Ed – SEPAIC, 1985 ; 225p.

**33. SEYDI Mg.**

Stratégie de santé en situation de développement – Point de vue vétérinaire : contamination des D.A.O.A. , incidences sanitaires et économiques.

Médecine d'Afrique Noire ; 1982; 29.6 – 387 – 414.

**34. SEYDI Mg ; KONE A.L. ; GAYE A. ; DAVID M.P. ; MBOUP S. ; SAMB A.**

Poissons porteurs de *Vibrio parahaemolyticus* : étude sur les poissons frais des côtes du Sénégal.

R.T.V.A. ; 1985 (213)p 1924.

**35. VERON M.**

La position taxonomique des vibrio et de certaines bactéries comparables.

CR. Acad. Sci. (Paris).

## ANNEXE

### MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS (15)

Formules indiquées en gramme par litre d'eau  
distillée

**1. BOUILLON CŒUR-CERVELLE**

**FORMULE :**

Protéase peptone----- 10

Infusion de cervelle de veau-----	12,5
Infusion de cerveau de bœuf-----	5
Chlorure de sodium-----	5
Phosphate disodique-----	2,5
Glucose-----	2
pH : 7,4 environ	

## 2. **BOUILLON SELENITE DE SODIUM**

### *FORMULE :*

Peptone-----	
-----	5
Phosphate de sodium-----	
-----	10
Lactose-----	
-----	4

## 3. **EAU PEPTONNEE TAMPONNEE**

### *FORMULE :*

Peptone-----	10
Chlorure de sodium-----	5
Hydrogeno-Orthophosphate dissodique dodécahydraté	9
Dihydrogeno-Orthophosphate de potassium-----	1,5
Eau distillée-----	1000 ml
pH final : 7,0 ± 0,2	

## 4. **GÉLOSE BAIRD PARKER**

### *FORMULE :*

Peptone-----	10
Extrait de viande bœuf-----	4
Extrait de levure-----	2
Pyruvate de sodium-----	10
Glycocolle-----	12
Agar-----	14
Eau distillée-----	1000 ml
pH : 7,2	

Préparation : Ajouter les solutions suivantes

- Tellurite de potassium à 1 %----- 1 ml
- Emulsion de jaune d'œuf à 10 % en eau physiologique 5 ml
- Sulfaméthazine----- 2,5 ml

## 5. GELOSE AU CRISTAL VIOLET AU ROUGE NEUTRE ET A LA BILE

### *FORMULE :*

Peptone-----	7
Extrait de levure-----	5
Sels biliaires-----	1,5
Glucose-----	10
Chlorure de sodium-----	5
Agar-----	11
Rouge neutre-----	0,03
Cristal violet-----	0,002

pH final : 7,4

## 6. GELOSE HEKTOEN

### *FORMULE :*

Bio-Thione-----	12
Extrait de levure-----	3
Sels biliaires-----	9
Lactose-----	12
Saccharose-----	12
Salicine-----	2
Chlorure de sodium-----	5
Hyposulfite de sodium-----	5
Citrate de fer ammoniacal-----	1,5
Bleu de Bromothymol-----	0,060
Fuschsine acide-----	0,040
Gélose-----	13,5

pH : 7,6

## 7. GELOSE GLUCOSE A L'OXYTETRACYCLINE

### *FORMULE :*

Extrait autolytique de levure-----	5
Glucose-----	20

Oxytétracycline-----	0,1
Agar-agar bactériologique-----	15
pH final : $6,6 \pm 0,2$ à $25^{\circ}\text{C}$	

#### 8. **GELOSE TRYPTICASE-SULFITE-NEOMYCINE**

##### ***FORMULE :***

Tryptone-----	16
Sulfate de néomycine-----	0,02
Sulfate de polymixine-----	0,05
Extrait de levure-----	10
Agar-----	13,5
pH final : 7,2	

#### 9. **GELOSE AU VERT BRILLANT**

##### ***FORMULE :***

Extrait de viande-----	5
Extrait de levure-----	3
Dihydrogéo-Orthophosphate de sodium-----	0,6
Saccharose-----	10
Vert brillant-----	0,0032
Peptone-----	10
Hydrogeno-Orthophosphate dissodique-----	1
Lactose-----	10
Rouge de phénol-----	0,09
Agar A-----	12,5
pH approximative : 6,9	

#### 10. **MILIEU CLARCK ET LUBS**

##### ***FORMULE :***

Peptone-----	5
Phosphate bipotassique-----	5
Glucose-----	5
pH : 7,5 (environ)	

#### 11. **MILIEU KLIGLER HAJNA**

**FORMULE :**

Extrait de viande-----	3
Extrait de levure-----	3
Peptone-----	20
Chlorure de sodium-----	5
Citrate ferrique-----	0,3
Lactose-----	10
Glucose-----	1
Rouge de phénol-----	0,05
Agar-----	12
Eau distillée-----	1000 ml
pH final : 7,4	

**12. MILIEU LYSINE FER**

**FORMULE :**

Peptone bactériologique-----	5
Extrait de levure-----	3
Citrate de fer ammoniacal-----	0,5
Thiosulfate de sodium-----	0,04
L-Lysine-----	10
Glucose-----	1
Pourpre de bromocrésol-----	0,02
Agar-----	14,5
pH : 6,7 (environ)	

**13. MILIEU RAPPAPORT-VASSILIADES**

**FORMULE :**

Peptone-----	4,54
Chlorure de sodium-----	7,2
Dihydrogeno-phosphate de potassium-----	1,45
Chlorure de magnésium anhydre-----	13,4
Vert de malachite oxalaté-----	0,036
pH final : 5,1 ± 0,2 à 25°C	

**14. MILIEU UREE-INDOLE**

**FORMULE :**

L. Tryptophane-----	0,3
KH <sub>2</sub> PO-----	0,1
NaCl-----	0,5
Urée-----	2,0
Alcool 95°-----	1,0
Rouge de phénol à 1 %-----	0,25
Eau distillée-----	100 ml