

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

Faculté des Sciences  
et Techniques

Ecole Inter-Etats  
des Sciences et Médecine  
Vétérinaires (EISMV)



*Année : 2002*



N° 02

***ETUDE COMPARATIVE DE LA FERTILITE DE  
DEUX MILIEUX DE CULTURE D'ORIGINE  
DIFFERENTE, UTILISES POUR LA RECHERCHE  
DES COLIFORMES THERMOTOLERANTS DANS  
LES FILETS DE POISSON CONGELES***

**MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES  
DE PRODUCTIONS ANIMALES**

**Présenté et soutenu publiquement  
15 juin 2002 à 10 h à l'EISMV**

**par**

***ABDELSALAM ADOUM DOUTOUM  
Né le 09 décembre 1970 à ABECHÉ (Tchad)***

**MEMBRES DU JURY :**

**Président : Monsieur François Adébayo ABIOLA  
Professeur à l'EISMV**

**Membres : Messieurs : Malang SEYDI  
Professeur à l'EISMV  
Bhen Sikina TOGUEBAYE  
Professeur à l'UCAD**

**AU NOM D'ALLAH  
LE TOUT PUISSANT, LE MISERICORDIEUX  
ET SON PROPHETE MOUHAMMAD (P.S.L.)**

**Je dédie ce travail :**

- ❖ **A mon grand frère feu lieutenant YOUSOUF (In memoriam) et à ses enfants SOULEYMANE, FATIMA et ACHTA, très tôt privés de l'affection paternelle.**

C'est vous qui avez parachevé l'éducation des parents en nous enseignant la rigueur, l'excellence, la labueur.

Je me rappelais de votre vivant que vous m'appelez souvent « le Professeur ». Je pense que, très tôt, vous avez décelé en moi des valeurs intrinsèques. C'est le chemin que nous avons pris et avec l'aide de Dieu, cela va se réaliser.

Que votre âme repose en paix au paradis.

- ❖ **A mon père**

Nous tenons de vous notre leçon de modestie, de discrétion et de persévérance dans l'effort.

Puissiez-vous trouver dans ce travail l'expression de notre reconnaissance pour tous les sacrifices que vous avez faits pour nous.

- ❖ **A ma mère**

Je vous dois tout, ce travail est le fruit de tant d'années de sacrifices que vous avez consentis pour nous.

- ❖ **A mon grand frère, le Docteur MAHAMAT et à son épouse**

Je pense également infiniment à vos enfants AIMANA, IBRAHIM et NASSIR « le Professeur ». Mon départ pour les études post-universitaires a laissé un vide très difficile à combler surtout que je suis l'un des oncles les plus écoutés par mes neveux sus-désignés.

- ❖ **A tous mes frères et sœurs**

- ❖ **A tous les miens**

- ❖ **Au Directeur Général de la GER, Ali TAHIR qui s'est engagé pour moi pour que ma vie familiale soit un succès. En dépit du problème qui s'est posé, vous demeurerez toujours un grand frère consulté et suivi.**

- ❖ **Au Directeur Général de l'IUSTA, le Docteur Mahmoud YOUSSEF et Secrétaire Général de l'IUSTA, Mr Daboulaye DJIMOU DJEBAYE**  
Vous avez tout fait pour que je puisse bénéficier de cette première formation post-universitaire et donc concourir aux différents grades du CAMES.
- ❖ **A tous les cadres de l'IUSTA**
- ❖ **A mon jeune frère et ami AHMAT ABOULMALI** qui, malgré sa jeunesse, a été doté par Dieu, de valeurs humanitaires et scientifiques qui le prédisposent à un avenir radieux.
- ❖ **A la famille SALEH KHARIFENE**
- ❖ **A la famille SOW**
- ❖ **A tous mes amis**, je n'ose citer de noms de peur d'en oublier.
- ❖ **A mes camarades de promotion**
- ❖ **A toute la colonie tchadienne à Dakar**
- ❖ **A tous ceux qui ont participé à ma formation**
- ❖ **A tout le personnel du service HIDA OA**
- ❖ **Au Sénégal, pays hôte et de Téranga**, pays dans lequel nous avons eu la chance d'effectuer des études universitaires (doctorales) et post-universitaires (spécialisation) dans d'excellentes conditions. Nous sommes en fait un produit tout fait du Sénégal.
- ❖ **Au Tchad, ma patrie** qui ne cesse de soucier pour que les jeunes enseignants-chercheurs arrivent à accéder à des grades du CAMES pour exceller dans la sphère du savoir.
- ❖ **Enfin à la Science** : Nous ne pouvons occulter ce savoir universel qui, chaque jour que Dieu fait, apporte des améliorations pour le bien-être de l'homme mais également pour comprendre des mécanismes nouveaux. A travers cette discipline, nous dédions ce modeste travail à tous les scientifiques du Nord comme du Sud qui travaillent quelquefois laborieusement pour arriver à des résultats inouïs. Ils constituent un jalon pour la génération à venir de manière que la recherche scientifique va évoluer inexorablement et à jamais vers un processus infini dans l'espace et dans le temps.

# REMERCIEMENTS

- ❖ **Madame Isabelle PAIN** a bien voulu faire la première correction du manuscrit. Merci infiniment pour tout cela.
- ❖ **Monsieur Lamine KONE** qui a été de tout temps mon complice. Tout le travail de manipulation a été fait en duo. Il me manque de mots pour le remercier.
- ❖ **Monsieur Nalla BA** aussi, doit être remercié autant car il a été de tout temps sollicité. En plus de cela, pendant les vacances de Mr KONE, il est venu nous donner un coup de main déterminant pendant une semaine alors qu'il était en congé.
- ❖ **Madame DIEYE** a apporté des corrections fort utiles car elle s'est familiarisée au vocabulaire d'hygiène alimentaire.  
Merci infiniment.
- ❖ **Madame MAR** doit être remerciée pour le fait qu'elle a fait montre d'une gestion rigoureuse en termes de réactifs et de produits et cela, malgré le nombre très important de stagiaires pour que nos travaux donnent des résultats excellents.
- ❖ **Monsieur SANE** a toujours nettoyé et désinfecté les laboratoires pour que nos résultats soient fiables.
- ❖ **Monsieur DIEDHIOU** doit être remercié pour le fait qu'il a beaucoup contribué pour que l'atmosphère devienne vivable. En plus de par ses tournées, toutes les trente minutes, la sécurité est plus que garantie, sécurité qui a été un gage pour un travail dans la sérénité et le calme.
- ❖ **Docteur Abdoulaye SOW, Mamadou TRAORE, Thiémokho TRAORE, Abdoulaye BA** qui, grâce à leurs échanges fructueux, ont fait en sorte que je ne suis pas loin du pays. C'est pourquoi un voyage prévu pendant les vacances pour se ressourcer s'est révélé superflu. Comme le monde est petit, ces retrouvailles nous seront beaucoup utiles ultérieurement.

## **A NOS MAITRES ET JUGES**

- **A notre Président du jury, Monsieur François Adébayo ABIOLA  
Professeur à l'EISMV de DAKAR**

Vous nous faites l'insigne honneur de présider notre jury de mémoire de DEA malgré vos multiples occupations.  
Soyez assuré que votre disponibilité et votre simplicité nous ont profondément marqué.

Hommages respectueux.

- **A notre Directeur de mémoire, Monsieur Malang SEYDI,  
Professeur à l'EISMV de Dakar**

Vous nous avez séduit par la rigueur de votre raisonnement scientifique, votre ardeur, votre ardeur, votre simplicité et votre disponibilité.

Vos qualités d'homme de sciences et d'homme pieux forcent au respect, à l'admiration et constituent pour nous un modèle.

Veillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements et de notre profonde gratitude.

- **A notre maître et juge, Monsieur Bhen Sikina TOGUEBAYE,  
Professeur à la Faculté des Sciences et Technique de l'Université Ch. A.  
Diop de Dakar**

Nous gardons de vous un souvenir vivace d'un grand scientifique, disponible, ouvert envers tous. Vous avez spontanément accepté de juger ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de nos sentiments les meilleurs.

## **TABLE DES MATIERES**

	<b>Pages</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	2
<b><u>Chapitre premier</u> : PREPARATION ET MODES DE CONTAMINATION DES FILETS DE POISSON</b> .....	2
1. Préparation des filets de poisson .....	2
2. Modes de contamination .....	3
3. Conséquences des traitements sur les bactéries .....	4
3.1. Action du filetage .....	4
3.2. Action du froid .....	4
<b><u>Chapitre deuxième</u> : COLIFORMES et COLIFORMES THERMOTOLERANTS</b> .....	5
1. Définitions .....	5
2. Relation entre Entérobactéries et Coliformes .....	5
3. Principaux genres d'entérobactéries coliformes en hygiène alimentaire et santé publique .....	6
3.1. Escherichia .....	6
3.2. Klebsiella .....	6
3.3. Enterobacter .....	6
3.4. Citrobacter .....	7
4. Signification des coliformes thermotolérants .....	7
<b><u>Chapitre troisième</u> : LES MILIEUX DE CULTURE</b> .....	8
1. Définition .....	8
2. Facteurs d'appréciation de la qualité des milieux de culture .....	8
2.1. Fertilité .....	8
2.2. Stérilité .....	8
2.3. Sélectivité .....	8
2.4. Le pH .....	8
3. Milieux d'isolement sélectif pour les coliformes et <i>Escherichia coli</i> .....	9
3.1. Milieux liquides .....	9
3.1.1. Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant (BLBVB) .....	9
3.1.2. Bouillon Lactosé Bilié au Bromo-Crésol Pourpre (BLBCP) .....	9
3.1.3. Bouillon de Schubert .....	9
3.2. Milieux solides .....	10
3.2.1. Gélose Lactosée au Chlorure de triphényl tétrazolium et au Tergitol 7 .....	10

3.2.2. Gélose au Désoxycholate Citrate Lactose et Saccharose (DCLS) .....	10
3.2.3. Gélose Lactosée de DRIGALSKI .....	11
3.2.4. Gélose Lactosée à l'éosine et au bleu de méthylène (EMB) de Levine .....	11
3.2.5. Gélose au Violet cristal au Rouge neutre à la Bile et au Lactose (VRBL) .....	11

**DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES** ..... 13

**Chapitre premier : MATERIEL** ..... 13

1. Cadre des analyses .....	13
2. Produits analysés .....	13
3. Matériel de prélèvement .....	13
4. Matériel de laboratoire .....	13

**Chapitre deuxième : METHODES** ..... 14

1. Dénombrement des coliformes thermotolérants .....	14
1.1. Références normatives .....	15
1.2. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales .....	15
1.3. Préparation des milieux de culture .....	15
1.3.1. Fertilité .....	16
1.3.2. Stérilité .....	16
1.3.3. Sélectivité .....	16
1.3.4. Le pH .....	16
1.3.5. Préparation des deux milieux de culture .....	16
1.4. Mode opératoire .....	16
1.5. Comptage des colonies .....	17
1.6. Expression des résultats .....	17
1.6.1. Cas général .....	17
1.6.2. Boîtes contenant moins de 15 colonies caractéristiques au niveau de la suspension mère .....	17
1.6.3. Boîtes contenant aucune colonie caractéristique au niveau de la suspension mère .....	18
2. Traitement des données .....	18
3. L'analyse de variance (ANOVA) .....	18

**TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION** ..... 19

**Chapitre premier : RESULTATS** ..... 19

1. Le pH .....	19
2. La flore .....	20

	<b>Pages</b>
3. La Stérilité .....	20
4. La température .....	21
5. Comparaison directe de deux milieux .....	21
<b><u>Chapitre deuxième : DISCUSSION</u></b> .....	<b>23</b>
1. Le pH .....	23
2. La flore .....	23
3. La stérilité .....	24
4. La température .....	24
5. Milieux de culture .....	24
<b><i>CONCLUSION GENERALE</i></b> .....	<b>26</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>27</b>

## INTRODUCTION

Pour les pays côtiers en général, et pour les pays côtiers africains en particulier, la pêche est la principale source de protéines d'origine animale. En outre, pour certains pays comme le Sénégal, elle constitue un secteur vital de l'activité économique. C'est pourquoi, au cours des deux dernières décennies, le tissu industriel sénégalais a vu naître de nouvelles unités que sont les sociétés exportatrices de produits de la pêche. Les industries traitant les filets de poisson occupent une place considérable. Elles sont approvisionnées essentiellement par la pêche industrielle (70%) mais également par la pêche artisanale (30 %) (23).

Les grands consommateurs de filets de poisson sont les pays européens, très exigeants en matière d'hygiène alimentaire.

C'est pour protéger la santé publique contre les risques de toxico-infections alimentaires que les pays de l'Union Européenne (UE) ont adopté des normes fixant les modalités de contrôle sanitaire des produits de la pêche. Ainsi la **directive 91/493/CEE du 22 juillet 1991 (12)** fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché européen des produits de la pêche destinés à la consommation humaine. Cette directive impose aux entreprises aussi bien des obligations de moyens que de résultats.

Plusieurs usines de pêche sénégalaises s'y conforment pour arriver à des résultats microbiologiques satisfaisants.

Pour rechercher des coliformes thermotolérants dans les aliments, le milieu recommandé par les normes internationales est le VRBL. Ce milieu étant fabriqué par différents laboratoires, il a été constaté des disparités dans les résultats obtenus au cours des analyses. C'est pour trouver l'origine de ces disparités et aboutir à des résultats fiables que nous avons choisi de travailler sur le thème suivant : **« Etude comparative de la fertilité de deux milieux de culture d'origine différente, utilisés pour la recherche des coliformes thermotolérants dans les filets de poisson congelés ».**

Cette étude comprend trois parties :

- Dans la première partie, la synthèse bibliographique présente la préparation et les modes de contamination des poissons, les coliformes thermotolérants et enfin les milieux de culture.
- Dans la seconde partie, sont précisés le matériel utilisé et la méthodologie employée.
- La troisième partie traite les résultats, leur discussion et propose des améliorations.



## 2. Modes de contamination

Si de nombreux auteurs s'accordent à dire que le poisson de son vivant présente une chair paucimicrobienne grâce à son épithélium cutané, il se contamine toutefois relativement facilement du fait de la présence de nombreux germes dans ses branchies, dans son appareil digestif et son revêtement cutané (2, 24).

Selon DHAOUI (7), les animaux aquatiques se contaminent dans l'eau au cours de leur déplacement, leur respiration et leur alimentation. La double contamination endogène et exogène a été constatée par beaucoup de chercheurs (19) (voir tableau I).

Tableau I : Contamination bactérienne des poissons

Type de contamination	Bactéries		Taux
	Groupes		
<p><b>Primaire :</b> Bactéries propres aux poissons</p>	<p><b>Gram (+)</b> Mésophiles : (2-3 %) - <b>Micrococcus</b> - Corynéformes - <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> = (Bacille du rouget) - <i>Clostridium botulinum</i> de type E - - <b>Listeria</b></p>	<p><b>Gram (-)</b> 1 - Psychrotrophes : 95 % - <b>Pseudomonas</b> - <b>Aeromonas</b> - <b>Flavobacterium</b> <b>Moraxella</b> <b>Alcaligenes</b> <b>Acinetobacter</b> <b>Cytophaga</b> <b>Photobacterium</b> 2 - Entérobactéries rares : (2-3 %) <b>Surtout coliformes</b></p>	<p><b>Tube digestif :</b> <math>10^6 - 10^8/\text{ml}</math>  <b>Branchies :</b> <math>10^3 - 10^6/\text{g}</math></p>
<p><b>Secondaire :</b> Bactéries surajoutées <math>\Rightarrow</math> par contamination fécale</p>	<p>- <b>Staphylococcus</b> - <b>Clostridium</b> - <b>Streptococcus</b></p>	<p><b>D'origine humaine :</b> 1 - Entérobactéries <b>Morganella (ex Proteus)</b> <b>Klebsiella-Enterobacter</b> <b>E.coli - Salmonella</b> 2 - Psychrotropes moins nombreuses apportés surtout par l'eau</p>	<p><b>Peau :</b> <math>10^3 - 10^6/\text{cm}^2</math>  <b>Branchies :</b> <math>10^2 - 10^3/\text{cm}^2</math></p>

Source (24)

### **3. Conséquences des traitements sur les bactéries**

#### **3.1. Action du filetage**

Compte tenu du fait que les filets de poisson entrent en contact avec le personnel et avec le matériel souillé (caisses, tables de filetage, eaux contaminées), ils pourraient se contaminer, même s'il existe différents traitements qui ont pour but de réduire de façon significative la flore de contamination.

Le lavage qui est réalisé en début de production, permet de diminuer la contamination superficielle. Selon **ROZIER et coll. (21)**, c'est une étape très importante car elle conditionne la durée de vie commerciale du produit.

#### **3.2. Action du froid**

Le froid est un procédé qui a une action bactériostatique mais non bactéricide stricto-sensu. En effet, la congélation peut détruire électivement une population bactérienne, en particulier à Gram positif. Mais pour les bactéries à Gram négatif, il faut maintenir l'état de congélation pendant un temps assez long pour les détruire (4).

Cependant, cette proportion détruite pendant la congélation est insignifiante. Lors de la décongélation, les bactéries peuvent retrouver leur niveau initial de contamination.

Le traitement par le froid est tout de même indispensable pour limiter le développement microbien et l'activité des enzymes bactériennes et tissulaires responsables de l'altération des poissons.

Selon **ROSSET (20)**, toute baisse de température de 5°C peut diminuer de deux fois la vitesse de croissance des germes de contamination superficielle. Le froid permet ainsi d'assurer une conservation par inhibition ou arrêt total des différents processus de dégradation, mais son action varie selon son intensité.

La réfrigération permet une conservation de courte durée, car son effet n'est pas bactéricide mais bactériostatique alors que la congélation (-18°C, température de référence) inhibe le développement de plusieurs groupes bactériens et le blocage de réactions enzymatiques.

Il ressort de ces notions, deux applications principales : la réfrigération permet une conservation à court terme, tandis que la congélation assure une conservation à long terme.

## **Chapitre deuxième : COLIFORMES ET COLIFORMES THERMOTOLERANTS**

L'une des causes les plus fréquentes de rejet des filets de poisson à l'exportation est la présence de coliformes thermotolérants, d'où nécessité de connaître bien ce groupe bactérien.

### **1. Définitions**

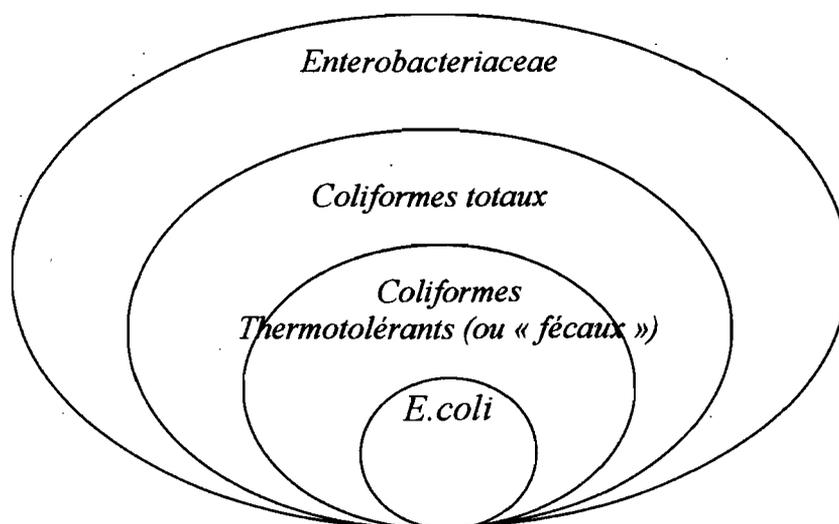
Selon l'ISO (International Standardisation Organisation), les coliformes se définissent comme étant des bacilles à Gram négatif, non sporulés, oxydase (-), aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de se multiplier en présence de sels biliaires ou d'agents de surface ayant les mêmes propriétés et capables de fermenter le lactose avec production d'acide, de gaz et d'aldéhyde en 48 h à une température comprise entre 35 et 37°C (NF ISO 4832 – juillet 1991). C'est donc des entérobactéries Lactobre (+)

En microbiologie alimentaire, les coliformes thermotolérants (ou « fécaux ») sont des coliformes qui, incubés à une température de 44°C ± 1°C, pendant 24 heures au moins, présentent les mêmes propriétés (12).

### **2. Relation entre Entérobactéries et Coliformes**

La figure 2 indique la relation entre les entérobactéries et les coliformes.

**Figure 2 : Relations Enterobacteriaceae – coliformes – E. coli**



**SOURCE : (13, 14)**

### **3. Principaux genres d'Entérobactéries coliformes en hygiène alimentaire et santé publique**

#### **3.1. Escherichia**

Ce sont des bactéries qui ont comme habitat naturel le tube digestif de l'homme et des animaux notamment le colon et le rectum.

Elles ont été découvertes en 1885 par **ESCHERICH** et sont largement répandues dans le milieu extérieur, par l'intermédiaire des excréments (24).

L'espèce d'origine fécale la plus répandue est *E. coli*. Grâce à son pouvoir de multiplication dans certains endroits pollués, ce germe peut constituer une source de contamination dans les industries agro-alimentaires. Sa présence dans les aliments est indicatrice de la présence de certaines bactéries pathogènes de la famille des germes entériques (*Salmonella spp*, *Shigella spp*). En effet, beaucoup d'études ont montré la forte corrélation positive qui existe (1, 2) entre ces germes.

- Selon **CHANTAL** (4), certaines souches d' *E.coli* sont très pathogènes et sont responsables de maladies graves chez l'homme.

#### **3.2. Klebsiella**

Les bactéries de ce groupe sont fréquemment de coloration bipolaire dont les dimensions sont comparables à celles d'*E. coli* (03, - 1,5 x 0,6 - 6µm) (17) et présentant en outre une grande spécificité.

Le chef de file de ce groupe est représenté par *Klebsiella pneumoniae* qui vit à l'état commensal dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Leur pouvoir pathogène chez l'homme s'exprime par des pneumonies aiguës avec fonte purulente, des otites, des méningites, des infections de l'appareil urinaire (néphrites, cystites...), des diarrhées aqueuses persistantes ( $\geq$  à 14 jours) sans fièvre ni vomissement associés (15, 26) et des colites hémorragiques (6).

#### **3.3. Enterobacter**

Les espèces composant ce genre sont très répandues dans le sol et les égouts. Elles mènent une vie commensale dans le tube digestif de l'homme et des animaux, mais deviennent pathogènes quand les hôtes sont

sensibles (surmenage, sous-alimentation, immunodépression, etc...) et sont alors à l'origine de pleurésies, méningites et pyélonéphrites.

### **3.4. Citrobacter**

D'une manière générale, ce sont des espèces commensales de l'intestin de l'homme et des animaux, mais elles peuvent également devenir opportunistes et dans ce cas, elles sont à l'origine de gastro-entérites, en particulier Citrobacter freundii.

## **4. Signification des coliformes thermotolérants**

*Escherichia coli* est en général considéré comme bon témoin de contamination fécale. Sa présence est constante dans les fèces humaines. Chez les animaux, il représente également les coliformes intestinaux majoritaires. Dans les eaux, il est considéré comme peu fragile et disparaît en général avec les pathogènes qu'il accompagne.

La température de 44°C sélectionne principalement les coliformes thermotolérants tels que *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter cloacae*. Certains coliformes intestinaux ne cultivent pas à 44°C, inversement certains coliformes cultivant à cette température ne sont pas d'origine fécale : ces observations sont fréquentes dans les végétaux en particulier (13) ; cette culture se fait sur des milieux spécifiques.

## **Chapitre troisième : LES MILIEUX DE CULTURE**

### **1. Définition**

Les milieux de culture se définissent comme étant la préparation de substances, sous forme liquide, semi-solide ou solide, qui contiennent des composants naturels et/ou synthétiques destinés à permettre la multiplication (avec ou sans inhibition de certains micro-organismes) ou l'identification ou à préserver la viabilité de micro-organismes (NF T 90-461 juillet 2001). Un bon milieu de culture s'apprécie par un certain nombre de facteurs

### **2. Facteurs d'appréciation de la qualité des milieux de culture**

Certaines qualités sont indispensables à un milieu pour favoriser le développement bactérien. Ainsi un milieu de culture doit être conforme à certains paramètres.

#### **2.1. Fertilité**

C'est la capacité d'un milieu de culture à récupérer quantitativement certains micro-organismes cibles (NF T 90-461 juillet 2001).

#### **2.2. Stérilité**

C'est l'absence de culture dans des conditions données (NF T90-461 juillet 2001). Elle doit concerner le matériel, le milieu, l'environnement et le manipulateur.

#### **2.3. Sélectivité**

C'est la capacité d'un milieu de culture à favoriser la croissance de certains micro-organismes spécifiques cibles au détriment de certains micro-organismes non cibles, (NF T90-461 juillet 2001).

#### **2.4. Le pH**

Il traduit le potentiel d'hydrogène de chaque milieu.

Les bactéries se développent en général en milieu neutre (7,3 – 7,4) ou légèrement alcalin (7,5 – 7,6).

### **3. Milieux d'isolement sélectif pour les coliformes et *Escherichia coli*** (11)

#### **3.1. Milieux liquides**

##### **3.1.1. Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant (BLBVB)**

Il est utilisé pour rechercher et dénombrer les coliformes dans le lait, les produits alimentaires et l'eau. Pour dénombrer *Escherichia coli* au moyen du test de Mackenzie dans les mêmes produits au cours de l'analyse bactériologique des eaux.

C'est un milieu composé de Peptone bactériologique, de la bile de bœuf, du lactose et du vert brillant pour un pH optimum de  $7,2 \pm 0,2$ , le milieu est placé dans un tube contenant une cloche dite « cloche de durham » permettant de recueillir éventuellement le gaz formé au cours de la multiplication des coliformes. Pour permettre le développement des bactéries, ce milieu doit être incubé à  $44^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) pendant 48 heures au moins.

##### **3.1.2. Bouillon Lactosé Bilié au Bromo-Crésol Pourpre (BLBCP)**

C'est un milieu qui est utilisé en bactériologie alimentaire principalement au cours de l'analyse de l'eau. Il permet de rechercher et de dénombrer les coliformes, par la fermentation du lactose et la production de gaz.

##### **3.1.3. Bouillon de Schubert**

Le milieu de Schubert, modifié par Fennel, est un milieu permettant d'identifier rapidement *Escherichia coli*. Sa formule est composée de tryptophane, d'acide glutamique, de sulfate d'ammonium, de citrate de sodium, de peptone de mannitol et d'eau distillée. Son pH optimum est de 7,4. Comme le milieu précédent, après l'avoir préparé, il faut le stériliser.

Le dénombrement des *Escherichia coli*, en milieu liquide, s'effectue habituellement en deux temps : un premier dénombrement permet d'apprécier la présence de coliformes : il s'effectue habituellement sur bouillon lactosé au BCP dans le cas de l'analyse de l'eau. Chaque bouillon lactosé au BCP positif est ensuite soumis à un test permettant de mettre en évidence la présence d'*E. coli*. Le test de Mackenzie est fréquemment utilisé.

Dans le domaine du contrôle bactériologique de l'eau, le milieu de Schubert peut être avantageusement choisi.

### **3.2. Milieux solides**

#### **3.2.1. Gélose Lactosée au Chlorure de triphényl tétrazolium et au Tergitol 7**

La gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7 est utilisée pour le dénombrement par filtration sur membrane des coliformes thermotolérants (à 44°C pendant 24 heures) dans l'eau.

Il est composé de peptone bactériologique, d'extrait de viande, de lactose, de bleu de bromothymol, de l'agar. Son pH optimum étant de  $7,2 \pm 0,2$ .

En outre, ce milieu contient du Tergitol 7 qui est un polyalcool inhibant certaines bactéries Gram positif. Le lactose peut être fermenté avec production d'acides organiques et abaisse le pH du milieu et virage de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol au jaune.

La préparation est identique à celle des milieux précédents.

Le TTC (chlorure de triphényl tétrazolinum) est un indicateur coloré de potentiel Redox et peut être réduit avec formation de formazon violet par certaines bactéries.

Les colonies caractéristiques des coliformes présentent des colonies dont l'aspect est le suivant : colonies jaunes avec ou sans centre orangé (pas de réduction du TTC) avec un halo autour de la colonie.

#### **3.2.2. Gélose au Désoxycholate Citrate Lactose et Saccharose (DCLS)**

Parmi tous les milieux proposés pour la recherche et le dénombrement des coliformes, c'est celui qui présente le plus d'ingrédients (Désoxycholate de sodium, Citrate de sodium, Lactose, Saccharose, Bio-polytone, Extrait de viande, Thiosulfate de sodium, rouge neutre, agar, eau distillée) avec un pH optimum de 7,2.

Contrairement aux autres milieux, celui-ci inhibe partiellement la croissance des coliformes et évite l'envahissement par Proteus (10). Il s'est révélé un milieu très sélectif destiné à la recherche et à l'isolement des Salmonella et des Shigella (11). Sa préparation est identique aux précédents milieux.

### **3.2.3. Gélose Lactosée de DRIGALSKI**

Le milieu de DRIGALSKI permet la croissance de toutes les entérobactéries. Celle des bactéries à Gram positif est inhibée par le cristal violet. Il est utilisé pour séparer dans une culture les entérobactéries lactose positives des entérobactéries lactose négatives.

Malheureusement, il n'inhibe que partiellement l'envahissement des *Proteus hauseri*. Il doit être autoclavé après sa préparation comme les milieux précédents.

### **3.2.4. Gélose Lactosée à l'éosine et au bleu de méthylène (EMB) de Levine**

C'est un milieu utilisé pour l'isolement des entérobactéries, surtout *Escherichia coli* et *Enterobacter*. Malheureusement, il n'est pas sélectif car il permet aussi le développement des levures comme *Candida albicans*.

### **3.2.5. Gélose Violet cristal Rouge neutre Bile Lactose (VRBL)**

C'est le milieu de culture le plus récent utilisé pour la recherche et l'identification des coliformes. Les anciens milieux présenteraient des inconvénients (fertilité, stérilité, sélectivité) (11). C'est ce qui a poussé les firmes à fabriquer ce nouveau milieu qui, en outre, est le seul à ne pas s'autoclaver.

En effet, selon certains auteurs (6, 28), la stérilisation pourrait dénaturer les facteurs de croissance de nature protéique ou glucidique.

Le VRBL a donc l'avantage de garder au cours de sa préparation les composants à l'état normal. C'est la raison pour laquelle beaucoup de normes le recommandent (NF ISO-7218 – Mai 1996, NF V-08-060 – Mars 1996).

Il contient deux inhibiteurs de la flore à Gram positif, des sels biliaires et le cristal violet. Ce milieu contient également du lactose qui peut être fermenté avec production d'acides organiques qui abaissent le pH du milieu et font virer l'indicateur coloré de pH, le rouge neutre, au rose rouge. Ce milieu doit être ensemencé dans la masse, entre deux couches de VRBL.

Les colonies caractéristiques des coliformes montrent l'aspect suivant : colonies de diamètre  $> 0,5$  mm, roses avec éventuellement un halo d'opacification (précipité de sels biliaries).

Ses larges diffusions et utilisations s'expliquent par le fait qu'il est recommandé par la plupart des normes mais également sa fabrication par différents laboratoires : Merck, Bio-Rad, Laboratoires Humeau, etc...

## **DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES**

### **Chapitre premier : MATERIEL**

#### **1. - Cadre des analyses**

Le laboratoire d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires et d'Origine Animale (HIDAOA) de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar a constitué le cadre de nos analyses.

#### **2. - Produits analysés**

Ce sont 300 échantillons de filets de poisson fabriqués par les différentes usines de la place : SENEGAL PECHE, IKAGEL, AFRIMEX, AFRICAMER, AMERGER, etc... mais également des échantillons prélevés par la Direction de l'Océanographie et des Pêches Maritimes (DOPM).

Tous les produits ont été soumis à une étude bactériologique (recherche et identification des coliformes thermotolérants).

#### **3. - Matériel de prélèvement**

Quelle que soit l'origine de l'échantillon, nous avons toujours les éléments suivants :

- une glacière contenant quelques packs de carboglace pour assurer le transport des échantillons sous régime de froid ;
- des produits congelés et conditionnés préalablement dans des sachets stériles et emballés ensuite dans des sachets stériles de type « Stomacher<sup>ND</sup> ». Ces sachets sont fermés par des baguettes.

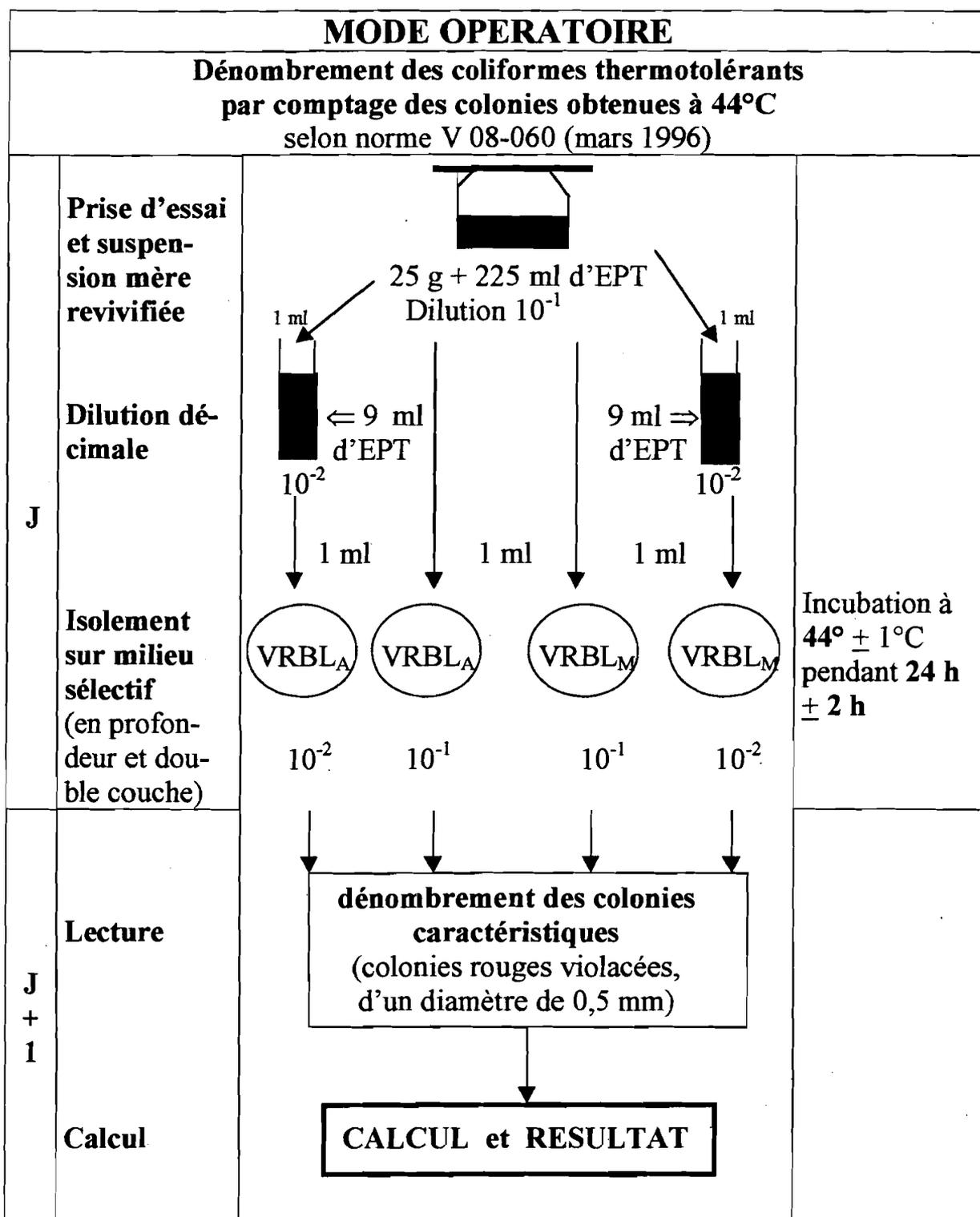
#### **4. - Matériel de laboratoire**

C'est le matériel classique utilisé dans tous les laboratoires d'analyse microbiologique de produits alimentaires.

**Chapitre deuxième : METHODES**

**1. Dénombrement des coliformes thermotolérants (fig.3)**

**Figure 3 : Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44°C**



### **1.1. Références normatives**

Nous avons utilisé les normes françaises et des normes ISO de 1996 appliquées à la recherche de coliformes thermotolérants pour les produits solides. Elles sont consignées dans le tableau suivant :

**Tableau II : Références normatives**

<b>Normes</b>	<b>Applications</b>
NF V 08-060 Mars 1996	Méthode de routine Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44°C
NF ISO 7218 Mai 1996	Règles générales pour les examens microbiologiques
NF V 08-010 Mars 1996	Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.

### **1.2. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales** (NF V 08-010 – mars 1996) (5)

25 grammes de filet de poisson sont prélevés et introduits aseptiquement dans un sachet « Stomacher<sup>ND</sup> ». Ensuite, 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) sont ajoutés. Toutes ces opérations se déroulent sous la hotte à flux laminaire. Ensuite, le contenu du sachet a été homogénéisé pendant 3 mn au « Stomacher<sup>ND</sup> ». La solution mère, ainsi obtenue, a une concentration de  $10^{-1}$

Cette suspension est laissée au repos pendant 30 mn, pour obtenir sa revivification. A partir de cette solution mère, des dilutions décimales successives sont réalisées pour faciliter les dénombrements.

### **1.3. Préparation des milieux de culture**

Au cours de cette préparation, nous avons tenu compte des facteurs d'appréciation de la qualité du milieu de culture.

### **1.3.1. Fertilité**

Pour chaque échantillon, le VRBL<sub>A</sub> et le VRBL<sub>M</sub> ont été utilisés en même temps, de manière à pouvoir comparer les résultats obtenus et en déduire la fertilité de chacun.

### **1.3.2. Stérilité**

Chaque milieu est coulé dans une boîte de pétri stérile et quelquefois mis en contact de l'environnement quelques minutes puis fermée et incubée à l'étuve 44°C pendant 24 h. Le lendemain, les boîtes sont lues.

### **1.3.3. Sélectivité**

Le VRBL, outre sa sélectivité qui est due à sa composition, est incubé à 44°C, ce qui inhibe les autres germes non thermotolérants.

### **1.3.4. Le pH**

Chaque jour, nous mesurons le pH de chaque milieu après étalonnage par un pH-mètre.

### **1.3.5. Préparation des deux milieux de culture**

C'est à quelques exceptions près le même procédé qui est utilisé. Il consiste à suspendre 41,5 g ou 39,5 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. La solution est chauffée sous agitation jusqu'à ébullition. Le milieu obtenu est refroidi au bain-marie 50°C.

## **1.4. Mode opératoire**

Compte tenu du délai de péremption (8) et de son mode de préparation (il ne doit pas être autoclavé), le VRBL est préparé le jour même des manipulations, dans des conditions très aseptiques.

1 ml de chaque dilution ( $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ ) est transféré dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre dans lesquelles sont coulés 12 à 15 ml de gélose VRBL<sub>A</sub> et VRBL<sub>M</sub> fondues et refroidies séparément dans des boîtes. Ces dernières sont laissées sur la paillasse pour solidification.

Après solidification, une deuxième couche de 4 ml de chaque VRBL est coulée dans les boîtes. Pour s'assurer de la stérilité de chaque milieu, dans deux boîtes de pétri sont coulées du VRBL<sub>A</sub> et VRBL<sub>M</sub> sans liquide de suspension.

Les boîtes de pétri sont placées retournées dans l'étuve de  $44^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , pendant 24 heures.

### **1.5. Comptage des colonies**

Après 24 h d'incubation, les colonies caractéristiques sont violacées, d'un diamètre  $\geq$  à 0,5 mm et parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile.

A l'aide du compteur, les colonies caractéristiques sont dénombrées pour chaque boîte ne contenant pas plus de 150 colonies.

### **1.6. Expression des résultats**

#### **1.6.1. Cas général**

Boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques au niveau de 2 dilutions successives, avec une boîte renfermant au moins 15 colonies caractéristiques.

Le calcul du nombre N de micro-organismes par gramme ou millilitre de produit est obtenu à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n_1 + 0,1n_2) \times d} \quad \text{ou} \quad N = \frac{\Sigma C}{1,1 \times d}$$

$\Sigma C$  = somme des colonies caractéristiques comptées sur les 2 boîtes retenues

V = volume prélevé (1 ml)

$n_1$  = nombre de boîtes à la première dilution

$n_2$  = nombre de boîtes à la deuxième dilution

d = taux de dilution correspondant à la première dilution comptée.

Les résultats sont arrondis à deux chiffres significatifs et doivent être exprimés en nombre de micro-organismes par gramme de produit.

#### **1.6.2. Boîtes contenant moins de 15 colonies caractéristiques au niveau de la suspension mère**

Le résultat doit être donné sous la forme :

$$N = C \times \frac{1}{d} \text{ /g}$$

d = taux de dilution de la suspension mère

C = nombre de colonies caractéristiques comptées.

### **1.6.3. Boîtes contenant aucune colonie caractéristique au niveau de la suspension mère**

$$\boxed{< 1 \times \frac{1}{d} / g}$$

d = taux de dilution de la suspension mère

## **2. Traitement des données**

Il a été conduit au moyen d'outils informatiques avec le tableau « EXCEL ». Dans la base de données, ont été inscrits le numéro de l'échantillon, le pH, la flore, la température d'incubation et la nature du milieu.

## **3. L'analyse de variance (ANOVA)**

Des études statistiques descriptives (étude de la moyenne, écart-type, minimum et maximum) ainsi que l'analyse de variance ont permis de présenter les résultats et d'appréhender la similarité et la dissimilarité qui existent entre les deux milieux et l'influence des différentes variables.

L'analyse de variance consiste à déterminer un paramètre F qui est le rapport de la variance inter-colonnes ( $V_e$ ) exprimant la variabilité des mesures dans une colonne à une autre sur la variance intra-colonnes ( $V_i$ ) exprimant la variabilité des mesures dans une colonne encore appelée variance résiduelle ou variance « due au hasard ». Ainsi, F exprime le rapport entre la variabilité d'une mesure à l'autre entre les diverses colonnes et la variabilité des mesures dans une même colonne (17, 22). Si F calculé est supérieur au  $[FN-C]^{c-1}$  lu sur la table statistique des F (au seuil de signification 5 %), le facteur étudié a un effet significatif sur la variabilité étudiée.

En outre, le test de student's a été utilisé pour comparer directement les deux milieux de culture et en déduire la fertilité.

## **TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION**

### **Chapitre premier : RESULTATS**

Six cents (600) résultats ont été obtenus. En plus des données microbiologiques (nombre de coliformes thermotolérants sur les deux milieux de culture utilisés), des paramètres tels que la température d'incubation, le pH, la stérilité sont relevés chaque jour pour essayer d'expliquer les résultats obtenus.

#### **1. Le pH**

Pour les deux milieux de culture utilisés (VRBL<sub>A</sub> et VRBL<sub>M</sub>), l'optimum est de 7,4. Les deux tableaux qui suivent, permettent d'établir des statistiques descriptives (moyenne, écart-type, etc...) et l'analyse de variance inter-groupes et intra-classes de 600 données enregistrées.

**Tableau III : Statistiques descriptives du pH**

<b>Milieux</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecart-type</b>	<b>N</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
1	7,259	9,751E-02	300	7,0	7,4
2	7,288	8,032E-02	300	7,0	7,4
<b>Total</b>	<b>7,274</b>	<b>9,043E-02</b>	<b>600</b>	<b>7,0</b>	<b>7,4</b>

**Tableau IV : Analyse de variance du pH en fonction du milieu**

<b>pH-Milieu</b>	<b>Variations</b>	<b>Somme des carrés</b>	<b>ddl</b>	<b>Moyenne des carrés</b>	<b>F</b>	<b>Signification</b>
	Inter-groupes	0,126	1	0,126	15,844	0,000
	Intra-classe	4,772	598	0,08		
	<b>Total</b>	<b>4,899</b>	<b>599</b>			

Il ressort de ces analyses statistiques qu'il existe une différence très significative du pH entre les deux milieux avec  $P < 0,0001$ .

Le VRBL<sub>M</sub> a un pH qui se rapproche du pH optimum (7,4) que le VRBL<sub>A</sub>.

## 2. La flore

Elle est constituée exclusivement par des coliformes thermotolérants. L'analyse de variance nous a permis de dresser les deux tableaux suivants.

**Tableau V : Statistiques descriptives de la flore**

Milieux	Moyenne de germes	Ecart-type	N	Minimum de germes	Maximum de germes
1	69,03	198,16	300	0	2040
2	221,63	986,14	300	0	15100
<b>Total</b>	<b>145,33</b>	<b>714,74</b>	<b>600</b>	<b>0</b>	<b>15100</b>

Le tableau ci-dessus fait ressortir que la moyenne de la flore du premier milieu est de 69,03 alors que celle du second milieu est de 221,63. De même, le maximum du milieu 1 (VRBL<sub>A</sub>) est de 2040 alors que celui du milieu 2 (VRBL<sub>M</sub>) est de 15100 germes.

**Tableau VI : Analyse de variance de la flore en fonction du milieu**

Flore-Milieu	Variations	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
	Inter-groupes combinés	3493166,60	1	3493166,602	6,905	0,009
	Intra-classe	302508800	598	505869,559		
	<b>Total</b>	<b>306001967</b>	<b>599</b>			

Il existe une différence très significative de la flore dans les deux milieux avec  $P < 0,005$ .

## 3. La Stérilité

Aucun coliforme thermotolérant n'a été dénombré dans les 600 boîtes VRBL<sub>A</sub> et VRBL<sub>M</sub> « témoins » qui ont été incubées à 44°C en même temps que les boîtes de pétri avec inoculum

#### 4. La température

Tableau VII : Statistiques descriptives de la température

Milieux	Moyenne	Ecart-type	N	Minimum	Maximum
1	44,38	0,55	300	43	46
2	44,39	0,54	300	43	46
<b>Total</b>	<b>44,38</b>	<b>0,55</b>	<b>600</b>	<b>43</b>	<b>46</b>

L'analyse statistique nous montre que la température d'incubation des 586 échantillons se trouve dans la fourchette.

14 échantillons ont été incubés à 46°C, mais cette augmentation de température ne semble pas influencer négativement sur les coliformes qui ont donc poussé. De plus, 14 est très négligeable par rapport à 600 échantillons.

Tableau VIII : Analyse de variance du milieu en fonction de la température

Température- Milieu	Variations	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
	Inter-groupes combinés	0,007	1	0,007	0,022	0,881
	Intra-classes	178,327	598	0,298		
	<b>Total</b>	<b>178,333</b>	<b>599</b>			

Il n'existe pas de différence significative entre la température d'incubation des deux milieux avec  $P = 0,881$ .

#### 5. Comparaison directe de deux milieux

$$N = 300 = r_1 = r_2$$

A partir du tableau V, la moyenne en germes du milieu 1 est de 69,03 alors que l'écart-type est de 198,16, la moyenne en germes du milieu 2 est de 221,63 pour un écart-type de 986,14. Ces valeurs nous permettent d'uti-

liser le test de student's et de comparer directement la moyenne en germes du **VRBL<sub>A</sub>** et du **VRBL<sub>M</sub>**.

$$t = (M_1 - M_2) / \sqrt{(S_1^2 / r_1) + (S_2^2 / r_2)}$$

$$t = 152,6 / \sqrt{\frac{(198,16)^2 + (986,14)^2}{300}}$$

$$t = 152,6 / 58,07 = \boxed{2,67}$$

$$t_{0,001 ; 298} = \boxed{2,592}$$

lu sur la table

**t** calculé est supérieur à **t** lu sur la table (0,025)

En effet :  $\boxed{2,67 > 2,592}$

La différence qui existe entre les deux moyennes est significative avec un  $P = 0,001$ .

Le milieu de culture **VRBL<sub>M</sub>** est plus fertile que le **VRBL<sub>A</sub>**.

## Chapitre deuxième : DISCUSSION

### 1. Le pH

Au cours de nos travaux, la moyenne obtenue pour le milieu A est de 7,259 avec un écart-type de  $9,751.10^{-2}$ , un minimum de 7,0 et un maximum de 7,4 (valeur optimale). C'est un pH qui ne s'écarte pas de la fourchette permettant le développement des coliformes fécaux. En effet, selon **GUIRAUD** et **GALZY** (9), les coliformes thermotolérants peuvent se développer jusqu'à un pH de 7 voir de 5 pour *E.coli*.

Enfin pour **THATCHER** et **CLARK** (28), les coliformes fécaux tolèrent les écarts de pH de 5,2 à 7,9.

Le milieu M se rapproche beaucoup plus de l'optimum avec une valeur moyenne de 7,288 ; un écart-type de  $8,032.10^{-2}$ , un maximum de 7,4 et un minimum de 7,0.

### 2. La flore

En ce qui nous concerne, les analyses ont porté sur 600 échantillons (filets de poisson) pour les deux types de milieux. Nous avons obtenu le résultat suivant :

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| ◆ <u>Pour le milieu A</u> : | ◆ <u>Pour le milieu M</u> : |
| - Moyenne : 69,03 germes/g  | - Moyenne : 221,63 germes/g |
| - Ecart-type : 198,16       | - Ecart-type : 986,14       |
| - Minimum : 0               | - Minimum : 0               |
| - Maximum : 2040 germes/g   | - Maximum : 15100 germes/g. |

Quel que soit le milieu, A ou M, la moyenne obtenue est inférieure à celle de **NDIAYE** (16) qui est de 236 germes/g de filet.

**TOURE** (29) et **SEYDI et coll.** (25) ont également trouvé des résultats supérieurs avec le même milieu et sur les mêmes produits soit respectivement une moyenne de 275 et de 625 germes/g de filet.

Par contre nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par **BAER et coll.** (3) dont la contamination des filets analysés varie de 1 à 10 germes/g de produit.

Enfin **AZIBE** (2) et **OUATTARA** (18) trouvent des résultats très différents. Le premier rapporte une moyenne de contamination de 625 germes/g alors que le second trouve une moyenne de 12 germes/g.

Avec le Désoxycholate Citrate Lactose Saccharose, **NDIAYE (16)** et **SITTI (27)** ont fait l'étude de l'évolution de la qualité bactériologique des produits de la pêche destinés à l'exportation sur plusieurs années et ont constaté qu'il y avait une amélioration significative de la qualité bactériologique. En ce qui nous concerne, d'une façon générale, quel que soit le milieu utilisé (**VRBL<sub>A</sub>** ou **VRBL<sub>M</sub>**), nos résultats seraient largement supérieurs à la plupart de ceux des auteurs, et cela en dépit de la mise en place des moyens et conditions de fabrication grâce à la méthode d'analyse HACCP ou ADMPC, même si le **VRBL<sub>M</sub>** est trois fois plus fertile que le **VRBL<sub>A</sub>**.

Avec le nouveau milieu de culture exigé par la norme européenne pour la recherche de coliformes, c'est-à-dire le **VRBL**, on trouve des résultats qui nous obligent à redoubler de vigilance et à repenser nos systèmes de fabrication.

### 3. La stérilité

Aucune présence de coliformes thermotolérants n'a été observée dans les boîtes « témoins » ce qui veut dire que ni l'environnement, ni le milieu, ni les manipulateurs n'ont biaisé les résultats obtenus.

Selon **GUIRAUD** et **GALZY (9)**, il existe de nombreux milieux de culture qui permettent le développement, la conservation, l'isolement, la sélection des micro-organismes.

### 4. La température

14 échantillons sur 600 ont été incubés à une température se trouvant au-delà de celle fixée par la norme **NF V-O8-060 mars 1996**, qui est de  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , c'est-à-dire  $46^{\circ}\text{C}$ .

**THATCHER** et **CLARK (28)** ont utilisé la norme de  $45,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  et ont obtenu les résultats suivants : le **VRBL** incubé à  $45,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$  donnait un pourcentage de coliformes de 77,2 % alors qu'à  $44^{\circ}\text{C}$ , ils n'obtenaient que 53,1 %.

### 5. Milieux de culture

Actuellement, le milieu le plus utilisé pour la recherche des coliformes thermotolérants dans les aliments solides est le **Violet Red Bile Lactose (VRBL)**. Il est fabriqué par différentes firmes (laboratoires **HUMEAU**, **MERCK**, **BIO-RAD**, etc...) mais avec la même composition mentionnée :

peptone, extrait de levure, chlorure de sodium, sels biliaries, lactose, rouge neutre, cristal violet et agar.

Les deux milieux **VRBL**, utilisés pour notre étude, ont la même composition mentionnée excepté le pourcentage d'agar qui varie de 12 à 15 % selon le milieu.

Tous les auteurs qui ont utilisé le **VRBL** pour la recherche des coliformes ont trouvé des résultats relativement supérieurs à ceux qui ont utilisé d'autres milieux de culture. Mais au sein du même milieu, il existerait des variations au cours du dénombrement. Malheureusement, au cours de notre travail, nous n'avons pas pu étudier la composition chimique des milieux pour la comparer avec les mentions de l'étiquetage. Seul le pH a pu être mesuré et il s'est avéré qu'il est plus fréquent d'atteindre le pH optimum du **VRBL<sub>M</sub>** que du **VRBL<sub>A</sub>** lors de la préparation des milieux de culture.

Pour notre travail, l'analyse de variance et le test de student's ont montré que le **VRBL<sub>M</sub>** est très fertile par rapport au **VRBL<sub>A</sub>**.

**ELLIOT et coll. (8)** ont étudié la comparaison de trois milieux (**VRBL**, Mac Conkey et la méthode Lauryl Sulfate Tryptone (LST)). Ils ont trouvé que c'est le **VRBL** incubé à  $45,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  qui donnait les meilleurs résultats.

Indépendamment des milieux de culture utilisés, on constate qu'il y a globalement une amélioration de la qualité bactérienne des coliformes thermotolérants dans les filets de poisson congelés.

Des études récentes ont été menées par **NDIAYE (16)** en 1996 et 1997 et par **SITTI (27)** de 1997 à 2000 sur l'évolution de la qualité bactériologique des produits de la pêche destinés à l'exportation. Elles ont montré une diminution importante des coliformes thermotolérants au fil des années, ce qui dénote une amélioration significative du respect des règles d'hygiène et des bonnes pratiques de fabrication dans les usines de transformation des produits de la pêche.

En effet, selon **ABABOUC (1)**, les coliformes thermotolérants, présents dans les aliments, sont témoins du non respect des règles d'hygiène (contamination fécale des produits). Cette évolution favorable de la qualité des aliments est sans nul doute le résultat de l'introduction du système Hazard Analysis Critical Control Points (**HACCP**) ou Analyse des Dangers et Maîtrise des Points Critiques (**ADMPC**) au niveau de toutes les sociétés de transformation de produits de la pêche à partir de 1996.

## CONCLUSION GENERALE

L'exportation des produits de la pêche est une source non négligeable de devises pour le Sénégal qui dégage un excédent annuel de 24 milliards de francs CFA (23).

Ces produits halieutiques commercialisés et exportés vers les pays de l'Union Européenne (UE), du Canada et des Etats-Unis d'Amérique doivent répondre à des critères microbiologiques utilisés à des fins réglementaires.

L'autorité compétente nationale a donc entre autres pour mission de faire contrôler la qualité microbiologique de ces produits par un laboratoire agréé.

Un des critères microbiologiques concerne le dénombrement des coliformes thermotolérants dans les produits de la pêche. Or, il s'est avéré que les résultats relatifs à ce dénombrement étaient très différents d'un laboratoire à l'autre, qui pourtant avait recours à un milieu de culture ayant la même dénomination commerciale (VRBL) mais provenant de fabricants différents.

Nous avons donc mené des études sur 600 échantillons de filets de poisson, dont 300 ont étéensemencés sur un milieu VRBL<sub>A</sub> et 300 sur un milieu VRBL<sub>M</sub> pour apprécier les matières.

- Pour le VRBL<sub>A</sub>, le nombre moyen de germes dénombré est de 69 avec un écart-type de 198, un maximum de 2040 germes et un minimum de 0
- Pour le VRBL<sub>M</sub>, le nombre moyen de germes dénombré est de 221 avec un écart-type de 986, un maximum de 15100 germes et un minimum de 0.

Compte tenu de ces résultats, il s'avère que le critère microbiologique des coliformes thermotolérants fixé pour les filets de poisson congelés, qui est de 10 germes/g, est toujours largement dépassé.

De plus, le milieu VRBL<sub>M</sub> se révèle trois fois plus fertile que le VRBL<sub>A</sub>, C'est pourquoi nous le recommandons pour la recherche et le dénombrement des coliformes thermotolérants.

Il serait souhaitable d'effectuer des études plus poussées permettant de compléter les résultats que nous avons obtenus. Ces travaux devraient porter sur l'analyse de la composition chimique de chaque milieu et de voir si cela correspond exactement aux mentions figurant sur l'étiquette.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ABABOUC H. L.** –  
Assurance de la qualité en industrie halieutique.-  
Rabat : Ed. Actes, 1995, 214 p.
2. **AZIBE M.** –  
Contribution à l'étude de la qualité parasitologique, chimique et bactériologique des filets de poisson congelés produits au Senegal.-  
Th. Méd. Vét. : Dakar, 1991, 19.
3. **BAER E.F. ; DURAN A.P. ; LEININGER H.V. ; READ R.B. Jr ; SCHWAB A.H. ; SWARTZEN TURBC A.**-  
Microbiological quality of frozen breaded fish and shellfish products.  
Appl. Environ. Microbiol., 1976, 31 (3) : 337-341.
4. **CHANTAL J.** –  
Eléments de bactériologie.-  
Dakar, EISMV, 1973 ; Fasc II : 152 p.
5. **DE KINKELIN P. ; MICHEL Ch. ; GHITTINO P.** –  
Précis de pathologie des poissons.-  
Paris : INRA ; OIE, 1985, 240 p.
6. **DEZUTTER M.**-  
*Escherichia coli* entéro-hémorragique.  
EHEC : Méthodes de recherche  
Cours International sur les coliformes.  
Institut Pasteur de Lille, Mai 2000, 23 p.
7. **DHAOUI S.** –  
Aspects sanitaires particuliers des produits de la pêche.-  
Recherches des germes pathogènes dans les aliments.  
Microb. Hyg. Ali. ; 1994, n° hors série, 168.
8. **ELLIOT R.P. ; CLARK D.S. ; LEWIS K.H. ; LUNDBECK H. ; OLSON J.C. ; SIMONSEN B.Jr.** –  
Microorganisms in foods : their significance and methods of enumeration.  
First edition, 1968, 434 p.
9. **GUIRAUD J. ; GALZY P.** –  
L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires.  
Paris : Edition l'usine nouvelle, 1980, 239 p.
10. **HARRIGAN W.F. ; MAC CANCE M.E.** –  
Laboratory methods in foods and dairy microbiology  
London, Acad. Press, 1976.

**11. INSTITUT PASTEUR**

Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur.  
Première édition, Institut Pasteur, 1978, 573 p.

**12. JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE FRANÇAISE .-**

Hygiène alimentaire : Produits de la mer et d'eau douce..  
Paris : JORF, 2<sup>e</sup> éd., 1985, 165 p.

**13. LECLERC H.-**

Les indicateurs coliformes : classification, identification, signification.  
Cours international sur les coliformes/*Escherichia coli*.  
Institut Pasteur de Lille – Mai 2000, p 2 à 7.

**14. LECLERCQ A.-**

Coliformes/*Escherichia coli*  
Cours international sur les coliformes.  
PAYC – 11,00 – IPLDEF –  
Institut Pasteur de Lille, Mai 2000, p 1 à 13.

**15. MALLE P. –**

Microbiologie des poissons et produits dérivés.  
Cours international sur les coliformes.  
Institut Pasteur de Lille, Mai 2000, 6 p.

**16. 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 : 1998, 17.

**17. ORSKOV I. –**

Klebsiella.  
in « Bergey's manual of determinative bacteriology ».  
8<sup>e</sup> éd. ; Baltimore : Waverly Press, 1974, 321-324.

**18. OUATTARA B. –**

Etude de la qualité bactériologique des filets de poisson congelés.  
Th. Méd. Vét. ; Dakar : 1986, 20.

**19. PILET C. ; BOURDON J.L. ; TOMA B. ; MARCHAL N. ;**

**BALBESTRE C. –**

Bactériologie médicale vétérinaire : systématique bactérienne.  
Paris : Ed. DOIN, 1981, 430 p.

20. **ROSSET R.-**  
Effets du froid sur les micro-organismes.-  
RTVA ; 1987 (223) : 26-29.
21. **ROZIER J. ; CARLIER V. ; BOLNOT F. –**  
Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments.-  
Paris : SEPAIC, 1985, 225 p.
22. **SCHWARTZ D. –**  
Méthodes statistiques à l'usage des Médecins et Biologistes.- 4<sup>e</sup> édition  
Paris : Médecine – Sciences, Flammarion, 1994, 314 p.
23. **SENEGAL/MINISTERE DES RESSOURCES ANIMALES**  
Le point de la politique sénégalaise en matière de Pêche maritime.  
Dakar, MRA, 1991, 66 p.
24. **SEYDI Mg. –**  
Stratégie de santé en situation de développement –Point de vue du vétérinaire : Contamination des DAOA – Incidence sanitaire et économique.-  
Médecine d'Afrique Noire, 1982 (6) : 307-409.
25. **SEYDI Mg. ; PANGUI L. ; AZIBE M. –**  
Qualité hygiénique des filets de poisson congelés produits au Sénégal.-  
Microb. Hyg. Ali., 1992, 9 (4) : 12-17.
26. **SIMONET M. –**  
*Escherichia coli* pathogènes : diagnostic, épidémiologie.  
Cours international sur les coliformes.  
Institut Pasteur de Lille, Mai 2000, 28 p.
27. **SITTI A. H. –**  
Contribution à l'étude de l'évolution de la qualité bactériologique des produits de la pêche destinés à l'exportation de 1997 à 2000.-  
Th. Méd. Vét. ; Dakar : 2001, 12.
28. **THATCHER F.S. ; CLARK D.S. –**  
Microorganisms in foods : Their significance and methods of enumeration.  
2<sup>nd</sup> edition, 1974, 234 p.
29. **TOURE M. H. –**  
Contribution à l'étude de l'évolution de la contamination par les coliformes des filets de poisson sénégalais destinés à l'exportation.-  
Th. Méd. Vét. ; Dakar : 1996, 17.