

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A.MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Filière : Science biologique

Spécialité : Microbiologie Fondamentale



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

***Etude de la contamination de la sardine fraîche
par certaines bactéries***

Présenté par :

NEDJAI Miriam & SAOULI Imane

Soutenu le : 13/09/2022

Devant le jury composé de :

M^{me}. BELHAMICHE . N

MAA

Président

M^{me}. YANAT . B

MCA

Examineur


M^{me}. MOUICI . K


MCB


Promoteur


Année universitaire : 2021/2022


REMERCIEMENT


 On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

 Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de M^{me} MOUICI, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

 Nos remerciements s'adresse aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

 Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leur générosité et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

 A nos familles et à nos amis qui par leurs encouragements on a pu surmonter tous les obstacles.

 Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont participé directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

- A l'homme, mon précieux offre du Dieu, qui doit ma réussite et tout mon respect : mon cher père Djamel.
- A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère Nora.
- A mon cher jumeau Abderrahim qui n'a pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu le protège et lui offre la chance et le bonheur.
- A mon adorable petite sœur Fatima Zahra qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.
- A mes grands-mères, mes oncles et mes tantes (NEDJAI & CHEURFA), que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.
- A tous les cousins, et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leurs amours et leurs encouragements.
- Sans oublier ma binôme IMANE pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

MIRIAM

DEDICACES

- A ma mère Nora et mon père Abdennacer qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.
- A mes frères, mes sœurs, et ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.
- A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.
- A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime.

IMANE

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Introduction 02

Partie I : synthèse bibliographique

1. Généralité sur la sardine	05
• Valeur nutritionnelle de la sardine	05
• Composition de la chair	05
• Anatomie	06
• Altération des poissons	08
• Les effets de l'altération	08
2. Les bactéries marines	09
• La flore bactérienne des poissons	09
○ Flore naturelle	09
○ Flore exogène (aquise)	10
3. Effets indésirables et risques	10
• Influence de l'utilisation des antibiotiques sur la diversité de la microflore bactérienne des aquacultures	10
4. La consommation de la sardine en Algérie	12
5. La conservation et commercialisation de la sardine	12

Partie II : Matériel et méthode

1. Lieu du stage	15
2. Echantillonnage	15
3. Préparation des échantillons	15
4. Analyses bactériologiques	16
5. Purification	16
6. Identification (tests biologiques)	17
7. Antibiogramme	19

Partie III : Résultats et discussion

Conclusion 26

Références bibliographique

Annexes

Liste des abréviations

BN : bouillon nutritif

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

E.coli : *Escherichia coli*

Chr : chaire

Int : intestin

BHIB : Brain-Heart Infusion Broth

TSI : three sugar Iron

Liste des tableaux

Tableau I : Composition et valeur nutritionnelle de la sardine	05
Tableau II : La phase de rigidité cadavérique du poisson	08
Tableau III: La flore endogène et exogène de la sardine	09
Tableau IV: Répartition des souches isolées (la sardine)	21
Tableau V : répartition des souches isolées (la glace)	22

Introduction

Dans l'alimentation humaine, les produits de la mer constituent un composant important dans la diète alimentaire dans la majorité des pays du monde et sont classés comme deuxième source de protéines, d'acides gras importants, de vitamines et de minéraux après les viandes rouges et blanches (**Albuquerque Costa, 2013; Samanta et Choudhary, 2019**).

Les poissons sont des denrées hautement périssables en raison de leur teneur élevée en protéines et en matières grasses par rapport aux autres produits d'origine animale et ont des durées de vie ou "shelf life" courtes, même aux basses températures de réfrigération (**Tomac et al., 2014; Najeh et al., 2016**).

La pêche et l'aquaculture demeurent, pour des centaines de millions de personnes à travers le monde, une ressource de première importance, qu'il s'agisse de l'alimentation, de la nutrition, des revenus ou des moyens d'existence. En 2014, l'offre mondiale de poisson a atteint le chiffre record de 20 kg par habitant, à la faveur de la forte croissance de l'aquaculture, qui fournit désormais la moitié du poisson destiné à la consommation humaine (**FAO, 2019**).

L'aquaculture (ou pisciculture) assurera près des deux tiers de la production mondiale de poisson destiné à l'alimentation d'ici 2030, compte tenu de la stabilisation des prises de poissons sauvages et de la demande croissante d'une classe moyenne émergente à l'échelle mondiale, et plus particulièrement en Chine (**FAO, 2019**). Elle poursuit son essor à un rythme plus rapide que celui de tous les autres secteurs de production alimentaire d'origine animale.

Les antibiotiques jouent un rôle central dans la gestion des maladies infectieuses chez l'homme, les animaux de compagnie, le bétail et en aquaculture.

Les antibiotiques sont produits, consommés et libérés dans l'environnement à grande échelle, ce qui suscite des inquiétudes quant à l'impact négatif de la présence de résidus d'antibiotiques sur les écosystèmes aquatiques et terrestres (**Brandt et al., 2015**).

Plusieurs rapports récents font état de la contamination de l'environnement par des antibiotiques, des bactéries résistantes aux antibiotiques (naturellement ou par pression de sélection liée aux activités anthropiques) et des supports génétiques de la résistance (**Anses 2021, EFSA 2021**).

L'utilisation d'agents anti-microbiens pour les poissons d'ornement, en particulier dans certains pays exportateurs, est importante et des bactéries résistantes à plusieurs types d'antibiotiques sont fréquentes chez de tels animaux. Bien que les poissons d'ornement ne

soient pas consommés, ils sont effectivement présents dans les foyers et en contact avec les humains .

Dans le but d'évaluer la qualité microbiologique du poisson frais particulièrement la sardine vendu dans les wilayas de Bejaïa et Sétif et l'influence de la glace utilisée pour sa conservation, on a entrepris ce travail, et pour se faire on a adopté la méthodologie suivante

- La récupération des échantillons (poissons et glaces) de différentes poissonneries de Bejaia et Sétif.
- Isolement et identification des bactéries contaminant les échantillons particulièrement : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella* .
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques de quelques souches de *E. coli*.

Synthèse bibliographique

synthèse bibliographique

I- Généralités sur la sardine

I- 1- Valeur nutritionnelle de la sardine

Parmi les 12000 espèces de poissons, la sardine est l'un des plus consommés. Elle a ainsi été classée parmi les 11 espèces de poisson possédant les meilleures recommandations nutritionnelles par la société américaine du cœur (**American Heart Association**) (**Sidhu, 2003**).

La sardine est un poisson gras qui contient certains principes actifs ayant des effets intéressants sur la santé, le principal étant assurément son contenu en acides gras oméga-3. Sans oublier les nutriments contenus dans ce poisson, tels que le calcium, le sélénium, le phosphore, la vitamine D et des vitamines du groupe B, ce qui en fait un aliment à intégrer plus souvent à notre alimentation. (**www.noovomoi.ca, 2021**) .

D'après **Jeant et R et al., (2007)**, cette richesse en acides gras polyinsaturés lui conférerait les propriétés nutritionnelles particulières pour prévenir les maladies cardiovasculaires. Ces acides gras insaturés sont plus digestes et donc plus facilement assimilables.

I-2- La composition de la chair (la partie comestible)

La sardine est l'un des six poissons les plus riches en acides gras EPA et DHA, avec la truite (*Oncorhynchus mykiss*), le maquereau (*Scomber scombrus*), le thon (*Thunnus alalunga*), le hareng (*Clupea harenges*) et le saumon (*Salmo salar*). Il est bon de noter que le contenu en lipides et en acides gras (n-3) de la sardine varie considérablement selon la saison. Elles sont plus riches en lipides en été et moins en hiver (**Macciola, 2004**). Tableau I

Tableau I : composition et valeur nutritionnelle de la sardine (**Santé Canada, 2005**).

Composition	Poids en g /100g de Sardine
Protéines 24 ,6	24,6
Glucides 0	0
Lipides	11,5
- Saturés	1,5
- mono insaturés	3,9

- Polyinsaturés	5,2
- oméga-3*	1,5
Cholestérol 0,142	0,142
Fibres alimentaires	0
Calories	208

* AEP, ADH et acide alpha-linolénique

I-3- Anatomie ,

Un poisson est un vertébré caractérisé par des os, et parfois des os dans la viande, avec des branchies, des nageoires et des muscles pour la respiration aquatique, idéale pour la nage. La plupart des poissons ont des écailles. Les poissons ont le sang froid et ont une mauvaise vue. Figure I .

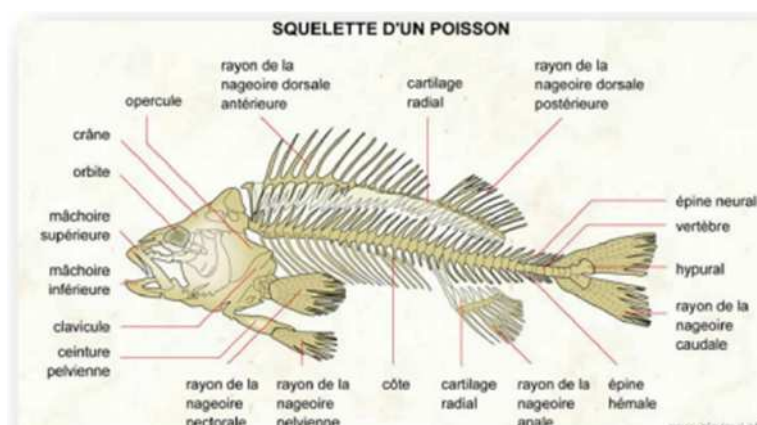


Figure I: Squelette des poissons (Claire König2018)

- **Le squelette des poissons**

Vertébrés, les poissons ont une colonne vertébrale (l'arête centrale) et un crâne. L'arête centrale va de la tête à la nageoire caudale et est composée de vertèbres. Les vertèbres sont peu spécialisées, très semblables les unes aux autres. Chacune porte, dans la région caudale, une apophyse dorsale et une épine ventrale, le tout marquant nettement le plan médian du corps. Ces vertèbres ont des développements latéraux qui portent les côtes.

Les côtes, les arêtes sont des baguettes fibreuses, plus ou moins calcifiées, acérées, qui sont noyées dans les masses musculaires. Le crâne est formé de nombreuses pièces imbriquées, auxquelles sont fixées les mâchoires. L'appareil qui supporte les branchies et la langue sera

réduit chez nous à l'os hyoïde. La ceinture scapulaire est soudée au crâne ; il n'y a pas de bassin, pas de sternum.

Les nageoires impaires, soutenues par des rayons, sont des organes caractéristiques des poissons. La proportion, la position, la forme des nageoires sont en rapport avec la forme du corps et il y a une corrélation avec la manière de nager. L'équilibre du poisson dépend des effets compensateurs de ces différents organes. Les caractères des rayons des nageoires entrent pour une bonne part dans la classification des poissons.

- **La peau des poissons**

Les poissons sécrètent un mucus visqueux qui favorise leur glissement dans l'eau et les protège des infections et des parasites. L'intégrité de cette peau muqueuse est essentielle à la régulation aqueuse du corps. On sait que l'anguille essuyée pour enlever la couche de mucus meurt sous l'effet du sel de l'eau de mer.

- **Les muscles**

L'anatomie des muscles du poisson est différente de celle des animaux terrestres : les poissons n'ont pas de tendons qui relient les muscles au squelette. Le poisson a des cellules musculaires disposées parallèlement reliées à des gaines de tissu conjonctif qui sont accrochées au squelette et à la peau : ce sont les myotomes.

La masse musculaire du poisson constitue les filets. Cette anatomie convient aux mouvements de flexion nécessaires à la propulsion du poisson.

Le tissu musculaire du poisson est composé de muscles striés (actine et myosine). La cellule musculaire est formée de sarcoplasme contenant des noyaux, des grains de glycogène, des mitochondries et des myofibrilles. La gaine de tissu conjonctif est appelée « sarcolemme ». Le gros du tissu musculaire est blanc (source d'énergie : glycogène), mais certains poissons grands nageurs peuvent avoir des muscles sombres (le thon par exemple) avec des niveaux élevés de lipides de mitochondries (métabolisme aérobie) et de myoglobine.

La couleur rougeâtre de la chair du saumon est due à un caroténoïde : l'astaxanthine que ne peut synthétiser le poisson ; il se la procure dans son alimentation. Dans l'élevage, l'astaxanthine est incluse dans la nourriture. (www.futura-sciences.com, 2012)

I-4- Altérations des poissons (la chair de la sardine)

Une fois le poisson mort, il subit un certain nombre d'altérations. Tableau II .

Tableau II : la phase de rigidité cadavérique du poisson (**Bouazzaoui , 2011**).

Phases	caractéristiques du poisson	Ph	Durée
Pré-rigor	muscle relaxé, poisson doux et pliable, texture ferme et élastique	7	0 à 1h
Rigor-mortis ou stade de rigidité cadavérique	muscle contracté et durci.	6	1h à7h
Post-rigor	muscle relaxé, chair pliable. La chair se ramollit autolyse, et altération bactérienne	>6	>7h

I-5-Les effets de l'altération

A/Sur l'odeur

Bon nombre de produits de dégradation bactérienne ont une odeur. Son intensité traduit celle de la contamination. L'odeur serait constituée à la base par les 1-1 bis pipéridine éthane, l'ammoniac et les acides gras inférieurs.

B/Sur le goût

L'altération du goût se traduit par une atténuation de la saveur spécifique qui sera remplacée par celle des autres produits lactiques, acétiques, ammoniacale...ect.

C/Sur l'aspect extérieur

La couleur de peau se ternit, les branchies se décolorent, la chair se gélifie ...ect. En même temps, la consistance change et devient plus fibreuse. **Nadir Nciri,2006**

II- les bactéries marines

Les micro-organismes se trouvent sur toute la surface externe (peau et branchies) et dans les intestins des poissons vivants et fraîchement pêchés.

La flore du poisson se distingue en exogène (acquise) et en endogène (naturelle) : Tableau III

Tableau III : La flore endogène et exogène de la sardine (Amagliani *et al.*, 2012).

Origine	Origine
Bactéries naturellement présentes dans l'environnement aquatique (indigène)	<i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Clostridium</i> <i>botulinum</i> de type E, helminthes
Origine humaine et animale (non-indigène)	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Legionella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Staphylococcus</i> Les virus entériques : entérovirus, adénovirus, norovirus, rotavirus) Parasites : <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i>

II-1- La flore naturelle :

La composition et la quantité de cette flore bactérienne dépend de l'origine, de la température, de l'eau, de l'alimentation.... etc. Les bactéries d'origine endogène peuvent être subdivisées en 3 classes :

A. Germes typiquement aquatiques :

Ils appartiennent généralement aux genres *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Acinetobacterium*, *Micrococcus*, *Corybacterium*, *Aeromonas*, *Morexella* (Billon 1976) .

B. Germes d'origine tellurique :

Ce sont des bactéries sporulées en particulier les genres *clostridium* et *Bacillus*. Leur dissémination dans les milieux aquatiques est assurée par les eaux de ruissellement et les eaux de pluie. (Bleu, 2006)

C. Germes de contamination d'origine humaine ou animale:

Ces germes proviennent du tube digestif de l'homme et des animaux. Ils se retrouvent dans les milieux aquatiques à la faveur d'une pollution par les eaux usées mal ou non traitées.

II-2- La flore acquise :

Après capture, le poisson est sujet à de nombreuses manipulations qui sont à l'origine de la contamination bactérienne (contamination par le personnel, le matériel et l'environnement).

Les germes apportés par cette contamination acquise sont des salmonelles, des coliformes thermo-tolérants, des *staphylococcus* présumés pathogènes, des bactéries anaérobies sulfite-réductrices, des levures et moisissures et la flore mésophile aérobie totale. (Anses, 2010)

III- Effets indésirables et risques

- La sardine est exposée à la pollution et à la contamination.
- Plusieurs maladies résultent de la consommation de poisson ou de produits de la mer, y compris des mollusques et des crustacés. Il s'agit notamment de maladies causées par du poisson porteur de bactéries, de leur toxines ou d'autres micro-organismes.
- Les sardines, le thon, les maquereaux font l'objet d'une surveillance spéciale : ils peuvent être les vecteurs d'une forme particulière d'intoxication alimentaire, l'empoisonnement histaminique.
- Les poissons crus, ou marinés peuvent contenir des bactéries que seule la cuisson peut détruire. Pour éviter tout risque de toxi-infections, les femmes enceintes, jeunes enfants et les personnes dont le système immunitaire est affaibli doivent éviter d'en consommer (Ministère de la santé, 2005).

Influence de l'utilisation des antibiotiques sur la diversité de la microflore bactérienne en aquaculture

Un paramètre capable de modifier considérablement l'équilibre de la population bactérienne est l'utilisation d'antibiotiques, très répandue et même abusive dans les pays en voie de développement (Sarter et al., 2007). L'antibiotique peut sélectionner la population bactérienne. Le transfert potentiel des gènes de résistance des bactéries vers les animaux ou les humains peut se produire sur la chaîne alimentaire (Van den Bogaard et Stobberingh, 2000 ; Teuber, 2001). Sarter et al. (2007) ont montré une grande résistance aux antibiotiques des bactéries des *Pangasius* du Vietnam. Une antibiorésistance multiple a été trouvée dans un éventail de bactéries pathogènes ou opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* (Ziha-

Zarifi et al., 1999), *Campylobacter spp.* (**Randall et al., 2003**), *Klebsiella pneumoniae* (**Carneiro et al., 2003**) et *Salmonella sp* (**Randall et al., 2004**) .

4. La consommation de la sardine en Algérie

L'Algérie a une ligne droite de 1 100 kilomètres le long de la côte méditerranéenne qui, compte tenu des méandres de la côte, atteint 1 300 kilomètres. Par conséquent, il est bénéfique pour le développement de la pêche maritime. De plus, la Méditerranée est un océan chaud, quasiment insensible aux courants, qui conserve d'année en année tous les éléments végétaux ou animaux nécessaires à l'alimentation d'innombrables poissons.

Le Ministère de la pêche a commandité une étude de consommation de poissons par les ménages en Algérie dont l'étude aboutit que les ménages algériens ont une préférence de consommation pour le poisson frais. Ainsi, 93,8% de la consommation moyenne par tête sont constitués de poissons frais, 2,3% de congelés et 2,7% de conserves. Ainsi que, Les espèces de poisson les plus consommées par les ménages, pour le poisson frais, sont la sardine (83,1%), le saurel (5,0%) et le rouget (1,6%). Les 10,3% restants se répartissent entre différentes espèces de poisson blanc et de poisson bleu. (MPRH ,2014).

5. Conservation et commercialisation de la sardine

La conservation est le processus de transformation des aliments en aliments temps de stockage plus long. Toutes les espèces de poissons restent fraîches plus longtemps si elles sont correctement réfrigérées , contrairement aux produits qui ne sont soumis à aucune méthode de conservation . Ces produits génèrent par conséquent un rendement économique dans le secteur de pêche dans tous les pays du monde entier. Pour les pêcheurs, la meilleure méthode de conservation des poissons et des produits de pêche est la congélation. Compte tenu des progrès de la technologie de la congélation, notamment de l'introduction de machines à glace pouvant être installées à bord .

La Congélation des poissons : la réduction de la température comme moyen de conservation du poisson et des produits de la pêche revêt une grande importance. Le but de la congélation est de prolonger la durée de conservation du poisson quelle que soit sa taille. La mise en congélation réduit l'activité enzymatique et bactérienne qui peut affecter la qualité des poissons. La congélation pour la conservation des poissons et les produits de la pêche à bord des navires de pêche est une méthode de manutention éprouvée pour les raisons suivantes :

- Température de conservation constante .
- Moins de dommages physiques pour les produits.

Le refroidissement :le poisson frais se détériore très rapidement à des températures normales. Tant qu'il est donc toujours dans les navires des pêcheurs, le poisson, tout comme les autres produits de pêche, doit-être conservé dans une température froide. La réduction de la température de stockage du poisson réduit sa vitesse de détérioration. Pendant la réfrigération, la température est ramenée à celle de la glace fondante : 0 °C. La forme la plus courante de réfrigération est l'utilisation de glace, de l'eau réfrigérée, de l'eau congelée et les mélanges fluides de glace et d'eau (eau de mer ou eau douce). **www.iceshop.fr**

La vente des produits peut se faire sur place, au Marchés locaux, foires et expositions et points de vente collectifs. L'entreprise s'engage à respecter les normes établies entre les deux partenaires, décrivez comment les faire reconnaître comme la livraison directe au consommateur final .

Matériels et méthodes

1. Lieu de stage

Au niveau du laboratoire de mycologie de l'Université de Bejaia , du mois d'Avril au mois de Juillet 2022 a été réalisé notre travail , qui consistait à récupérer de la sardine destinée à la consommation et isoler certains types de bactéries la contaminant .

2. Echantillonnage

Les échantillons étudiés (poissons et glace) ont été récupérés au niveau des poissonneries de la ville de Bejaïa centre et ses environs (Port , Kodss , les milles logements , Ighil ouazoug, Oussama , Aamriw , Baccarou , Tichy) et de la ville de Sétif (marché de Tanja , Bougaa), ainsi que des échantillons de glace de certains endroits des Wilayas de Bejaia et Sétif.

Au total 38 prélèvements de poissons (à raison de 3 poissons par prélèvement) et 23 prélèvements de glace ont été réalisés. Nos échantillons ont été déposés emballés dans des sacs en plastique stériles par le fournisseur ou le personnel lui-même. Ceux-ci ont été emmené directement au laboratoire dans une glacière pour analyse.

3. Préparation des échantillons

- Sur une planche à découper aseptisée (figure n° 1) la sardine a été découpée, les intestins ont été récupérés et mis dans des tubes contenant 7 ml de bouillon nutritif (BN) (pour l'enrichissement) et incubés à 37°C pendant 24h (figure n°2).
- La chaire aussi a été découpée en petits morceaux et mise dans des tubes contenant 7 ml du bouillon nutritif (BN) (pour l'enrichissement) et incubée à 37°C pendant 24h (figure n°3).



Figure n° 1 : Plan de travail aseptisé.

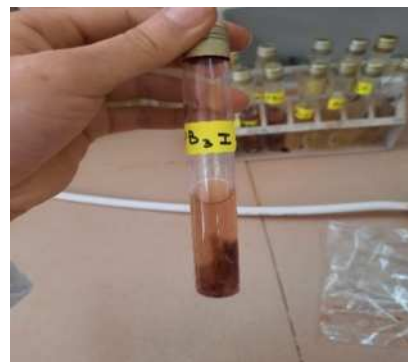


Figure n°2 : enrichissement de l'intestin dans du BN



Figure n°3 :enrichissement de la chaire dans du BN.

- Après la fusion de la glace récupérée, elle a été mise dans des tubes contenant 7 ml de bouillon nutritif pour l'enrichissement et incubée à 37°C pendant 24h, (figure n°4).
- L'apparition de trouble indique une croissance bactérienne, et l'absence de trouble est considéré comme un résultat négatif.



Figure n°4 : enrichissement de la glace dans du BN.

4. Analyses bactériologiques

Plusieurs repiquages successifs des colonies suspectes ont été réalisés sur les mêmes milieux d'isolement, et incubé à 37°C pendant 24 h afin d'obtenir des colonies pures.

5. Purification

Afin d'identifier les souches isolées, un ensemble de tests a été réalisé pour chaque souche: pour l'identification de *E.coli*, on a réalisé les tests de l'uréase et test de la mobilité (sur milieu Mannitol Mobilité) , pour l'identification de *Staphylococcus aureus*,on a réalisé le test de la catalase et test de la coagulase, et pour l'identification des salmonelles les tests qui ont été réalisés sont le test de la fermentation des sucres sue milieu TSI et le test de la nitrate réductase.

6. Identification

➤ **Recherche de l'uréase et de la production d'indole sur le milieu urée indole**

Le milieu Urée Indole permet la mise en évidence de l'**uréase**, de la **tryptophane** désaminase et de la production d'**indole** (le milieu contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des Entérobactéries). Les bactéries possédant une uréase transforment l'urée en carbonate d'ammonium entraînant une alcalinisation qui provoque une coloration rouge violacé du milieu en présence de rouge de phénol. La production d'indole est mise en évidence par l'addition du réactif de Kovacs qui agit avec l'indole en donnant une coloration rouge dans la partie supérieure du milieu en cas de réaction positive (anneau rouge).

Dans des tubes à essai stériles à l'aide d'une micropipette une quantité de 5ml du milieu urée indole a été versé et quelques colonies à tester ont été rajoutées, les tubes ont été incubés à 44°C pendant 24h.

- **Présence d'une uréase** : Le milieu vire au rouge violacé, en absence d'uréase, la coloration du milieu reste inchangée .
- **..Présence d'indole** : Après l'incubation, verser 4 à 5 gouttes de Kovacs dans le tube de milieu Urée Indole ensemencé : la présence d'indole est révélée par l'apparition d'une coloration rouge à la surface du milieu .

➤ **Test de mobilité sur le milieu mannitol mobilité**

Le **Mannitol-Mobilité-Nitrate** est un milieu utilisé lors de l'identification biochimique des entérobactéries et des coliformes. Le principe du milieu repose sur l'aptitude de certaines entérobactéries à fermenter le mannitol (virage au jaune) et à éventuellement réduire les nitrates en nitrites.

Dans des tubes contenant le milieu mannitol mobilité une anse de platine chargée de quelques colonies à tester a été ensemencé par piqure centrale dans les tubes et incubés à 37°C pendant 24h.

L'acidification du milieu est exprimée par le virage de couleur du milieu au jaune, ce résultat est considéré comme un résultat positif, l'absence du virage de couleur est considéré comme un résultat négatif.

En raison de la faible teneur en agar du milieu, les bactéries mobiles peuvent se déplacer.

➤ **Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), (produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries), en H₂O et 1/2 O₂. La présence de l'enzyme dans un isolat bactérien se manifeste par la production de bulles d'air.

Sur une lame en verre, une goutte d'H₂O₂ est déposée en utilisant une pipette pasteur, à cela s'ajoute une colonie de la souche à étudier, des bulles instantanées sur la surface de l'émulsion indique une réaction positive .

➤ **Recherche de la coagulase**

Le test de la coagulase différencie les souches de *Staphylococcus aureus* des autres espèces à coagulase négative . La coagulase est une protéine semblable à une enzyme qui provoque la coagulation du plasma sanguin.

Dans un tube à essai stérile :

- A l'aide d'une micropipette on prélève un volume de 500 µl du BHIB auquel on ajoute quelques colonies à étudier et on incube à 37°C pendant 24h .
- Rajout du plasma et incubation à 37°C pendant 24h.

La coagulation du plasma signifie que la souche est coagulase +.

➤ **Fermentation des sucres sur le milieu TSI :**

La **gélose TSI** est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H₂S.

Dans des tubes contenant du milieu TSI une anse de platine chargée de la souche à étudier a été ensemencé par piqure centrale et par des stries horizontales et incubé à 37°C pendant 24h.

- Coloration jaune du culot indique la fermentation du glucose .
- Coloration jaune de la pente indique la fermentation du lactose .
- Coloration jaune de la zone intermédiaire indique la fermentation de saccharose .
- Le précipité noir indique que les bactéries ont été capables de produire du sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir du thiosulfate de sodium .
- La production de gaz (CO₂ et O₂) est détectée par la division (décollement) de la gélose.

➤ **Recherche du nitrate réductase**

Le bouillon nitraté est un bouillon de culture donnant la possibilité de la recherche et de l'utilisation du nitrate par certains micro-organismes, surtout dans la respiration nitrate.

La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification, cette dernière conduit à la

formation de diazote à partir de nitrate. Il s'agit d'un processus biologique de respiration anaérobie, c'est-à-dire un mécanisme dans lequel l'accepteur final des électrons n'est pas le dioxygène, contrairement aux respirations aérobies, mais une autre substance minérale.

La nitrate réductase est une oxydoréductase qui catalyse la réaction : $\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + e^- \longrightarrow \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$; Il s'agit d'une famille d'enzymes essentielles dans le cycle de l'azote certains organismes bactériens permettent l'assimilation de l'azote N_2 ou la respiration anaérobie. Ce test va consister à mettre en évidence la présence ou non des nitrites dans le milieu de culture.

Dans des tubes stériles une quantité du bouillon nitraté est versée, à cela s'ajoute quelques colonies de la souche étudiée et incubé à 37°C pendant 24h.

Après incubation, des gouttes des réactifs NR1, NR2 ont été ajoutés respectivement.

- Milieu rouge : la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase.
- Milieu jaune : la bactérie ne possède pas l'enzyme nitrate réductase

En absence de coloration rouge donc absence de nitrites : rechercher la disparition des nitrates par addition de la poudre de zinc : en effet, le zinc réduit les nitrates en nitrites.

7. Antibiogramme

Les antibiogrammes sont réalisés par la méthode de diffusion des disques sur gélose Muller-Hinton . Des suspensions bactériennes sont préparées en ensemencant les souches étudiées (*Staphylococcus aureus* et *E. coli*) dans des tubes contenant de l'eau physiologique, par la suite les suspensions sont ensemencées par des écouvillons sur les boîtes de Muller-Hinton. Les disques d'antibiotiques utilisés pour les souches de *Staphylococcus aureus* (Vancomycine (VA) 5µg , Gentamicine (CN) 10µg , Cefoxitine (FOX) 30µg , Acide fusidique (FC) 10µg) ont été déposés distant de 2 cm, puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

Après incubation, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré autour de chaque disque. En se référant aux tableaux de la norme EUCAST 2021, on obtient un rapport qualitatif de sensible, intermédiaire ou résistant.

Résultats et discussions

Au cours de cette étude, 38 sardines (29 poissons de Bejaia et 9 poissons de Sétif) ont été analysés à partir desquelles 106 bactéries ont été identifiées : 28 *Staphylococcus aureus*, 47 *Salmonelles* et 31 *Escherichia coli*. 36 échantillons de glaces (26 de

Bejaia et 10 de Sétif) servant à la conservation ont aussi été analysés, et à partir desquelles 78 bactéries ont été identifiées : 31 *Staphylococcus aureus*, 24 *Salmonelles* et 23 *Escherichia coli*. La répartition des souches isolées est mentionnée dans les deux tableaux ci-dessous :

Tableau IV : répartition des souches isolées de la sardine

Germes	Bejaia (29 poissons)		Sétif (9 poissons)		Nombre totale des souches
	intestins	chair	intestins	chair	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	4	9	9	28
<i>Salmonella</i>	13	16	9	9	47
<i>E.coli</i>	6	7	9	9	31

Selon le tableau IV, les 3 types de bactéries ont été isolées dans la chaire et dans les intestins mais avec des valeurs tout à fait différentes par exemple les *staphylococcus aureus* dans la région de Bejaia avec (6 Souches /29 poissons) pour les intestins et (4 Souches/ 29 poissons) pour la chaire, par contre pour les échantillons récupérés à Sétif , on a (9 Souches/9 poissons) pour les intestin et (9 Souches/9 Poissons) pour la chair, la même chose pour *salmonella* et *E. coli*.

Les bactéries dominantes dans les poissons c'est les *salmonelles* puis les *E.coli* suivis par les *Staphylococcus*.

La présence d'*E.coli* dans les intestins, pourrait être due à la contamination de l'environnement du poisson par les déchets industriels et d'agriculture déchargés sans traitement près de la côte maritime dans la région de Bejaia (**Brahmi et al., 2014**).

La chair du poisson sain, vivant ou fraîchement pêché est stérile car le système immunitaire du poisson empêche les bactéries de proliférer dans sa chair. À la mort du poisson, le système immunitaire s'effondre et les bactéries peuvent proliférer librement. Le poisson s'altère à des vitesses variables. Les bactéries du poisson pêché dans les eaux tempérées entreront dans la phase de croissance presque immédiatement après la mort du poisson (**Brahmi et al, 2014**).

Pour la glace, elle est fabriquée à partir de l'eau du robinet en utilisant une machine à glace pilée ou écaillé pour fabriquer une grande quantité, La glace pilée permet de préserver la qualité et la fraîcheur des aliments en stock dans le comptoir. Elle possède la capacité de conserver et rafraichir rapidement et durablement les poissons après la capture et s'il est contaminé en fondant il peut contaminer le poisson.

On a aussi isolé 3 types de bactéries de la glace récupérée des différents endroits dans les deux régions (26 échantillons de glace dans la région de Bejaia et 10 échantillons dans la région de Sétif). La répartition des souches isolées est mentionnée dans le tableau ci-dessous.

Tableau V : répartition des souches isolées à partir de la glace

Germe	Bejaia (26 glaces)	Sétif (10 glaces)	Nombre totale des souches
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	10	31
<i>Salmonella</i>	17	7	24
<i>E.coli</i>	16	7	23

Dans le tableau V, on a 78 souches au total dont 54 souches de la région de Bejaia et 24 de la région de Sétif, on remarque que les proportions des germes des deux régions (Bejaia et Sétif) sont très proches $21/26, 17/26, 16/26$ et $10/10, 7/10, 7/10$ successivement. Les bactéries pathogènes dominantes dans les glaces isolées dans cette étude sont les *Staphylococcus aureus* suivis par *salmonella* et *E. coli*.

Donc au total, on a isolé 78 souches à partir des 36 échantillons de glace dont :

- 31/36 (39,74%) sont des *Staphylococcus aureus*.
- 24/36 (30,77%) sont *salmonella* .
- 24/36 (29,49%) sont des *E. coli* .

Notre étude a montré la présence des micro-organismes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* et *E.coli*). Selon **Zamboutichini** et ses collaborateurs (**Zamboutichini et al., 2008**), la présence de ces *Enterobacteriaceas* est un signe de contamination qui survient lorsque les mesures d'hygiène lors de la conservation, du lavage ou de l'éviscération des produits de la mer sont absentes. La majorité appartient au groupe des bactéries non-indigènes qui sont dus

à une contamination humaine ou fécale. D'après une étude de **Wogu (Wogu et al.,2001)**, ce type de bactéries pathogènes est souvent associé à des altérations qui se produisent après la pêche. Cette constatation est en accord avec les résultats de **Gram et Huss (2001)** qui ont noté que ces micro-organismes sont les causes majeures de l'altération microbienne des produits halieutiques après la capture. La plupart des bactéries ont été isolées dans les échantillons de sardines. En effet, le poisson est considéré comme responsable de plus d'épidémies que les mollusques, avec un nombre de cas par épidémie toute fois moins important (**Fur et al., 2013**).

Résistance aux antibiotiques des souches d'*E.coli* :

L'antibiogramme réalisé a montré que la souche d'*E.coli* est résistante à l'antibiotique (Amoxicilline + acide clavulanique (AMC) d'un diamètre de 15 mm) et sensible aux antibiotiques (Ceftazidime (CAZ) d'un diamètre de 30 mm , Aztréoname (ATM) d'un diamètre de 35 mm , Imipenème (IMI) d'un diamètre de 29 mm , Ertapénème (ETP) d'un diamètre de 32 mm et Méropénème (MRP) d'un diamètre de 31 mm). (Figure n°1)

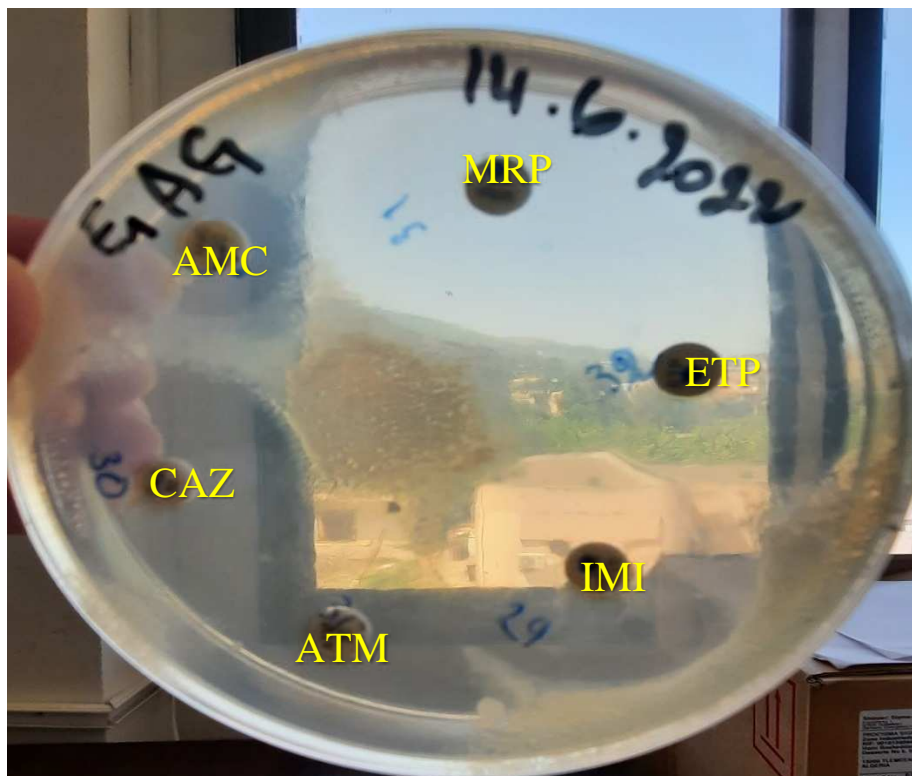


Figure n°1 : Antibiogramme d'une souche d'*E.coli* .

On comparant nos résultats à ceux de **(Brahmi et al, 2014)** on remarque que les résultats sont différents , tandis que nos résultats montre une résistance de la souche d'*E.coli* testée aux beta-lactamines contrairement à leurs résultats qui montrent une sensibilité aux beta-lactamines .

Conclusion

Conclusion :

Le poisson est un aliment consommé par de nombreuses espèces animales, dont l'homme . D'un point de vue nutritionnel, le poisson est une source de protéines hautement nutritive. Il est également un excellent vecteur d'autres micronutriments (vitamines , oligo-éléments ou provitamines). Cependant, le traitement et la consommation de poisson contaminé par des bactéries pathogènes peut provoquer des maladies aux conséquences sanitaires et économiques graves.

Au cours de notre étude, 38 sardines ont été analysées à partir desquelles 106 bactéries ont été identifiées : 28 souches de *Staphylococcus aureus* , 47 souches de *Salmonella* et 31 souche d'*Escherichia coli*, et 36 glaces aussi ont été analysées à partir desquelles 78 bactéries ont été identifiées: 31 souches de *Staphylococcus aureus* , 24 souches de *Salmonella* et 23 souches d'*Escherichia coli*.

La présence de ces bactéries peut présenter des risques pour la santé des consommateurs. La cause de cette contamination bactérienne peut être liée à une contamination de l'eau ou à une contamination des circuits de distribution du poisson. Par conséquent, les différents acteurs de la pêche doivent continuellement se concentrer sur l'identification, la prévention et la maîtrise des risques sanitaires pouvant affecter les produits de la mer afin d'améliorer les conditions d'hygiène et de manipulation. Cette approche protège la santé des consommateurs et augmente la valeur des matières premières.

Notre travail mérite d'être complété par :

- Tester la résistance des souches des *Salmonelles* et des *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques.
- Elargir le spectre des bactéries recherchées , pour réaliser une étude complète.
- L'identification génotypique des souches isolées.

Références bibliographiques

références bibliographiques

A

Albuquerque, CR., (2013). Escherichia coli in seafood: A brief overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4,450-454.

Amagliani et al., 2012 . Incidence and role of Salmonella in seafood safety *Food Research International* 45 (2):780-788.

ANSES, « Consommation des poissons, mollusques et crustacés : aspects nutritionnels et sanitaires pour l'homme., » 2010 . (Online)

Anses 2021, EFSA 2021 .

B

Billon J., 1976. Interet du froid dans la conservation du poisson et des crustacées : aspect microbiologique. *Bul. Acad. Vétérinaire de France.* 46 :333-334 .

Bleu Bazo g. (2006). Contribution à l'étude de l'évolution de la qualité microbiologique du poisson fume en Cote d'Ivoire et destiné à l'exposition. These doctorat en medcine veterinaire. Université Cheikh Anta Diop et Dakar .

S. Brahmi^{1,2}, C. Dunyach-Rémy^{1,3}, A. Touati² and J.-P. Lavigne^{1,3}, 2014 :1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Montpellier 1, UFR de Médecine, Nîmes, France, 2) Laboratoire d'Écologie Microbienne, Département de Microbiologie, FSNV, Université A/MIRA, Bejaia, Algérie and 3) Service de Microbiologie, CHU Carémeau, Nîmes, France .

Brandt et al. 2015 .

Bouazzaoui Y. 2011 Chapitre II : Altération de la qualité des produits de la mer Technologies de transformation des produits de la mer. Altération de la qualité L'Axiale de la formation spécialisée. Maroc.12p. <http://fr.scribd.com/doc/46466660/Alteration-de-la-qualite-des-produits-de-la-peche>.Consulté 18/03/14 .

C

Carneiro, L. A. M., Silva, A. P. S., Merquior, V. L. C., & Queiroz, M. L. P. (2003). Antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli isolated from infant formulas. *FEMS Microbiology Letters*, 228, 175-179 .

Claire König 2018 .

F

FAO, 2019 . Hygiène du poisson et des fruits de mer.

Rapport d'un comité d'experts de l'O.M.S. réunis en coopération avec la F.A.O

Fur et al., 2013 .

G

Gram L et Huss HH. 2001 Microbiological spoilage of fish and fish products *International Journal of Food Microbiology* 33: 121–137.

J

Jeant, R., Croguennec T., Scuck P. et Brule G. (2007). Science des aliments Biochimie-Microbiologie-Procédés-Produits (Vol.2), éd. TEC et DOC, Paris. P : 61, 64, 65, 81, 85, 90, 93.

M

Macciola, 2004, V, 2004 :A study on the lipid fraction of Adriatic sardine filets (*Sardina pilchardus*). *Nahrung* June.48(3):209-12.

MPRH ,2014 .

N

Nadir Nciri, 2006 : fabrication des conserves de sardine. Korea University of Technology and Education. Technical report January, 2006 .

Njeh, I., Tliba, I., Besbes, N., Bouslama, Z. et Sadok, S., (2016). Evaluation de la qualité de la daurade Royale (*Sparus aurata*) d'élevage sur le marché Tunisien. Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô.43p.

R

Randall, L. P., Cooles, S. W., Osborn, M. K., Piddock, L. J. V., Woodward, M. J. (2004). Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistances in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from human and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 208-216.

Randall, L. P., Ridley, A., Cooles, S. W., Sharma, M., Sayers, A. R., & Pumbwe, L. (2003). Prevalence of multiple antibiotic resistances in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 507- 510.

S

Santé Canada, 2005 : Fichier canadien sur les éléments nutritifs.

Samanta, M. et Choudhary, P., (2019). Safety of fish and seafood. In *Food Safety and Human Health* (pp. 169-187). Academic Press .

Sarter, S., Nguyen, H. N. K., Le, T. H., Lazard, J., Montet, D. (2007). Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*, 18, 1391-1396.

Sidhu, K.S., 2003. Health benefits and potential risks relate to consumption of fish or fish oil *Regul. Toxicol. Pharm.*, 38: 336-44p.

T

Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 493-499.

Tomac, A., Cova, M.C., Narvaiz, P. et Yeannes, M.I., (2014). Texture, color, lipid oxidation and sensory acceptability of gamma-irradiated marinated anchovy fillets. *Radiation Physics and Chemistry*, 106, pp.337-342.

V

Van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial*

Agents,

14, 327-335.

W

(www.elearning.univ-usto.dz, s.d, s.d.) .

(www.futura-sciences.com, 2012)

(www.iceshop.fr, s.d.) .

(www.noovomoi.ca, s.d, 2021)

Wogu *et al.*, 2001 .

Z

Zambotchini, B., Fiorini, D., Verdenelli. M.C., Orpianesi, C. & Ballini, R. (2008).- Inhibition of microbiological activity during sole (*Solea solea* L.) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. *Food Sci. Technol.*, 41, 1733-1738.

Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J. C., & Plesiat, P. (1999). In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 287-291.

Composition des milieux d'isolement
Bouillon Nutritif (pour 1L) Annexe 01

Peptone	10g
Extraire de viande	05g
Chlorure de sodium	05g

Eau peptonée (pour 1L) Annexe 02

Peptone exempte d'indole.....	15g
Chlorure de sodium.....	5g

Ph 7,2

Mannitol-mobilité Annexe 03

Peptone tryptique de viande.....	20g
Agar	4g
Mannitol	2g
KNO ₃	1g
Rouge de phénol à 1%.....	4ml
Eau distillée q.s.p.....	1000ml

Ph = 7,6-7,8

Milieu TSI Annexe 04

Extrait de viande de bœuf.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Peptone.....	20g
Chlorure de sodium.....	5g
Citrate ferrique.....	0,3g
Thiosulfate de sodium.....	0,3g
Lactose.....	10g
Glucose	1g
Saccharose	10g
Rouge de phénol	0,05
Agar	12g
Eau distillée q.s.p.....	1000ml

Ph=7,4

BHIB (pour 1l) Annexe 05

Brain infusion solids	12,5g
Beef heart infusion solids.....	5 g
Proteose peptone	10g
Glucose.....	2 g
Sodium chloride.....	5g
Disodium phosphate.....	2,5g

Ph=7,4±0,2/25°C

Réactifs de Griess(NR1 et NR2) Annexe 06

NR 1

Acide sulfanilique.....	0,8g
Acide acétique 5N.....	100ml

NR 2

Diméthyl amine.....	0,6g
Acide acétique 5N.....	100ml

Gélose Chapman Annexe 07

Peptone.....	11,0g/l
Extrait de viande.....	1,0g/l
Chlorure de sodium.....	75g/l
Mannitol.....	10g/l
Rouge de phénol.....	0,025g/l
Agar.....	15,0g/l

pH = 7,4

Gélose de Mac conkey Annexe 08

Peptone.....	20,0g
Sucre.....	10,0g
chlorure de sodium.....	5,0 g
Agar.....	15,0

Résumé :

Cette étude a pour objectif la contamination de la sardine par des bactéries pathogènes. Pour réaliser cette étude nous avons prélevés 38 échantillons de sardines et 36 échantillons de glaces dans des différents endroits de la région de Bejaia et de Sétif. Les échantillons ont été transféré au laboratoire de mycologie et analysé.

On a recherché et identifié la présence de trois types de bactéries utilisant une série de test biochimique.

On a isolé 28 souches de *Staphylococcus aureus*, 31 souches d'*E.coli* et 47 souches de *salmonella* pour les sardines et 31 souches de *Staphylococcus aureus*, 23 souches d'*E.coli* et 24 souches de *salmonella* pour les glaces. Après la réalisation d'un antibiogramme sur la souche d'*E.coli* les résultats ont montré que la souche est sensible à cinq antibiotiques (Ceftazidime, Aztréoname, Imipenème, Ertapenème et Méropenème) et résistante à l'antibiotique (Amoxicilline + acide clavulanique) . L'origine de cette contamination peut être liée à la négligence des pratiques d'hygiène durant tout le circuit de distribution du poisson.

Mots clés : sardine, bactéries, contamination, sensible aux antibiotiques.

Abstract :

The objective of this study is the contamination of sardines by pathogenic bacteria. To carry out this study, we took 38 samples of sardines and 36 samples of ice from different locations in the region of Bejaia and Sétif. The samples were transferred to the mycology laboratory and analyzed.

The presence of three types of bacteria was investigated and identified using a series of biochemical tests.

28 strains of *Staphylococcus aureus*, 31 strains of *E.coli* and 47 strains of *salmonella* were isolated from sardines and 31 strains of *Staphylococcus aureus*, 23 strains of *E.coli* and 24 strains of *salmonella* were isolated from ice. After performing an antibiogram on the *E.coli* strains, the results show that all the strains are sensitive to five antibiotics (ceftazidime, Aztreoname, Imipenem, Ertapenem and Meropenem) and resistant to amoxicillin + clavulanic acid . The origin of this contamination may be related to the neglect of hygiene practices throughout the fish distribution system.

Key Words: sardine, bacteria, contamination, antibiotic sensiti