

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Moléculaire et Médicale



Réf :.....

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

MASTER

Thème

*Recherche de quelques
bactéries pathogènes
contaminant la sardine*

Présenté par :

SLIMANI Fatiha & CHERGUI Soumia

Soutenu le : **23 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M. ADJEBLI Ahmed	MCB	Président
M ^{me} . MOUICI Kahina	MCB	Encadreur
M ^{elle} . BOUBCHIR-LADJ Kahina	MAA	Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciement



*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et
miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience
d'accomplir ce Modeste travail.*



*En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur
Mme : (MOUICI), sa précieuse conseils et s'aide durant
toute la période du travail.*



*Nos vifs remerciements vont également 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.*



*A nos familles et nos amis qui par leurs prières et leurs
encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles
Enfin, nous tenons également à remercier toutes les
personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation
de ce travail.*

Dédicaces

- *A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.*
- *A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père.*
- *Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mes frères, je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.*
- *Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, et frères de cœur, toi Wissam, Noria, Nouara et célia*
- *A ma chere binome soumia que je la souhaite que de réussit dans sa vie*

FATMA

Dédicaces

- *A mon idole, il a toujours cru en moi, son soutien dans les moments difficiles celui qui m'a guidé avec ses précieux conseils et qui m'a donné la force d'être ou je suis aujourd'hui à toi mon cher père, vous êtes le plus beau cadeau de ma vie.*
- *A ma chère maman pour sa patience avec moi surtout cette année je te dis : désolé maman sans toi je ne pouvais pas battre toute les difficultés et la maladie.*
- *A mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,*
- *A mes chers frères, pour leur appui et leur encouragement,*
- *A mes amies sahra ,fatima et fairouz .*
- *A M.Brahim et M.Issam.*
- *A ma chère binome Fatiha que je la souhaite que de réussit dans sa vie.*
- *A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*
- *Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible,*

Merci d'être toujours là pour moi.

« Le succès n'est pas final, l'échec n'est pas fatal : c'est le courage de continuer qui compte »

Soumaya

Liste des abréviations	01
Liste des tableaux	02
Introduction.....	04
Partie I : Synthèse bibliographique	05
1. Généralité sur les sardines	06
2. Production de la sardine en Algérie.....	07
3. Composition de la sardine	07
4. Microbiologie de la sardine.....	08
• Microflore de la sardine.....	08
• Sources de contamination	08
• Les bactéries contaminant les poissons.....	09
Partie II : Matériel et méthode	12
1. Lieu de stage.....	13
2. Echantillonnage.....	13
3. Préparation des échantillons.....	13
4. Analyse bactériologique.....	13
4-1. recherche de <i>staphylococcus aureus</i>	14
4-2. recherche de <i>E.coli</i>	14
4-3 .recherche de salmonelle.....	14
5. Purification.....	14
6. Identification.....	14
7. Antibiogramme des souches <i>d'E.coli</i>	16
Partie III : Résultats et discussion.....	17
Résultats et discussion	18
Conclusion.....	23

Référence bibliographique

Annexes

Liste des abréviations

AHA : American Heart Association

OMS : Organisation mondiale de la santé

ISO : Organisation internationale de normalisation

BN : Bouillon nutritif

TSI : three sugar Iron

NR : Nitrate réductase

BHIB : Brain-Heart Infusion Bouillon

Liste des tableaux

Tableau I : valeurs limites des critères bactériologique (JORADP, 1998)

Tableau II : répartition des souches isolées

introduction

Les produits de la mer constituent une denrée alimentaire importante pour une grande partie de la population du monde (Diagne et al, 1995). En dépit du prix élevé des produits de la pêche en Algérie, la consommation de ces derniers reste très importante, malgré le non-respect et la non-application des normes d'hygiène (Diop et al. 2010)

Les produits halieutiques sont un réservoir d'agents infectieux (virus, bactéries et parasites) présents d'une manière naturelle dans le milieu aquatique ou introduits à travers la manipulation. Les maladies engendrées peuvent être causées par des microorganismes pathogènes ou par des intoxications ou des intoxications provoquées par ces derniers (ANONYME 1, ANONYME 2).

Selon OLSEN et al. (2000), les poissons sont impliqués dans 25% des maladies alimentaires aux Etats-Unis (Kabre et al. 2003) rapportant que la flore microbienne du poisson constitue une menace pour la santé des consommateurs car ces germes sont responsables des maladies gastriques. Malgré ces risques potentiels et la forte consommation du poisson en Algérie, peu d'études lui ont été consacrées.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la contamination microbienne du poisson (la sardine), par trois bactéries potentiellement pathogènes à savoir *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et les salmonelles.

Pour ce, on a adopté la méthodologie suivante :

- Récupération de quelques poissons de quelques endroits de la wilaya Bejaia.
- Recherche et isolements des trois espèces recherchées : *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et les salmonelles.
- Tester la résistance aux antibiotiques des souches *E. coli* identifiées

Synthèse Bibliographique

Depuis toujours, dans de nombreuses régions du monde, les produits de la mer font partie des ressources en protéines animales. De plus en plus nombreux sont ceux qui voient dans le poisson un substitut à la viande rouge, jugé meilleure pour la santé (Martin, 2001; AFSSA, 2003) très digestes avec une grande variété de sels minéraux, d'oligo-éléments et de vitamines qui sont de constantes caractéristiques de la chair de poisson et en font de lui un produit unique dans le monde animal.

1. Généralités sur la sardine

La **sardine** est un petit poisson d'eau salé qui mesure entre 12 et 25 centimètres selon les espèces. Elle appartient à la même famille que les harengs. C'est un petit poisson qui vit en haute mer et se déplace en groupes. La sardine possède un ventre argenté et un dos bleuté. Elle se caractérise par : un opercule strié, des taches sombres sur le dos, une carène ventrale peu aigüe, des écailles sessiles, les deux derniers rayons de l'arête anale plus longs (guide-des-aliments/sardine-1.1338102).



2. La production de la sardine en Algérie

Durant l'année 2017, les Algériens ont consommé environ 90.000 tonnes de sardine, un taux légèrement supérieur à 2 kg par consommateur et par an, beaucoup moins que la moyenne mondiale, qui est de 20 kg, selon l'Association nationale des Commerçants algériens (ANCA).

Les prix excessifs du poisson, "inaccessibles" à une large gamme de consommateurs, sont la raison de cette baisse de consommation, due essentiellement au net déséquilibre entre l'offre et la demande. Selon le ministère de la pêche, la production nationale annuelle en ressources halieutiques est de 100.000 tonnes, alors que la demande est estimée à 200.000 tonnes/an.

Par ailleurs, les réserves des ressources halieutiques dans le bassin méditerranéen sont limitées, et ses 1,2 million de tonnes de ressources sont partagées par 23 pays méditerranéens.

Bejaïa ne produit que quelque 3 000 tonnes de poisson par an, les statistiques de l'année 2017 montrent qu'elle n'a produit que 1488,747 tonnes (Direction de la pêche de willaya de Bejaia. 2017).

3. Composition de la sardine

La sardine c'est un poisson riche en plusieurs éléments nutritifs :

- **Des lipides :** La sardine fait partie de la famille des « poissons gras » avec une moyenne de 10 à 12% de lipides, elle a une valeur énergétique assez importante par rapport aux poissons blancs. Parmi les lipides, la sardine renferme des oméga-3 (acides gras insaturés) favorables à une bonne santé cardiovasculaire. 3 sardines permettent de couvrir 100% des apports nutritionnels conseillés en oméga-3 pour une journée.

- **Des protéines :** La sardine est très riche en protéines complètes d'excellente qualité.

- **Des vitamines :** La sardine contient principalement des vitamines du groupe B (B3, B5, B12) et en quantité moindre de la vitamine D (pour fixer le calcium sur les os) et de la vitamine E (antioxydante, permettant de lutter contre le vieillissement cellulaire).

- **Des minéraux :** La sardine est riche en calcium, phosphore et sélénium (Le guide de la santé dans votre assiette, Que choisir, 2010).

Des études ont aussi démontré que les gens consommant plus de poisson présentaient moins de cas de dépression (Ness et al., 2004) et moins de risque d'être atteints de la maladie d'Alzheimer (Morris et al., 2003). Finalement, d'autres études ont observé un lien entre la consommation de poissons gras et la diminution de l'incidence de l'arthrite (Pedersen et al., 2005.).

L'American Heart Association (AHA) recommande aux adultes en bonne santé de consommer au moins deux repas de poisson par semaine, principalement les poissons gras, afin de profiter de leurs effets sur la santé (Krauss et al., 2005).

4. Microbiologie de la sardine

- **La microflore de la sardine**

La microflore de la sardine à l'état vivant dépend largement de l'environnement. Les microorganismes isolés des branchies, des intestins, et de la peau, appartiennent principalement aux genres : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *E.coli*

Flavobacterium, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Serratia* sont également rencontrés. Les crustacés présentent sensiblement la même flore, avec une proportion plus forte de Corynebactéries (INATAA, 2006-2007)

- **Les sources de contamination**

De nombreux facteurs ambiants sont à considérer dans la surveillance de l'hygiène des poissons, ainsi que dans la prévention des maladies résultant de la consommation du poisson. Certains sont liés à la capture, à la manutention, à la transformation et au stockage des poissons, d'autres sont inhérents au milieu aquatique, d'autres encore résultent des modifications qui sont introduites par l'homme dans l'environnement et qui entraînent la présence de substances indésirables chez les poissons (Ruiro, 1972).

- **Les bactéries contaminant le poisson**

Les bactéries pathogènes contaminant le poisson peuvent être commodément classées en deux grandes catégories

Bactéries indigènes (Groupe 1)

Les bactéries du groupe 1 sont communes et un peu partout présentes dans les milieux aquatiques des différentes régions du monde. Il va de soi que la température de l'eau a un effet sélectif. Il en résulte que les organismes les plus psychrotrophes (*C. botulinum* et *Listeria*) sont répandus dans les régions arctiques et les climats froids, alors que les types mésophiles (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*) représentent une partie de la flore naturelle présente sur les poissons que l'on rencontre sur les côtes et les estuaires des zones tempérée ou tropicale chaude.

Il convient de souligner, néanmoins, que tous les genres de bactéries pathogènes cités plus haut comportent des souches environnementales non pathogènes. Dans le cas de certains organismes, il est possible d'établir une corrélation entre certaines caractéristiques et la pathogénicité.

S'il est vrai que tous les poissons et tous les produits de la pêche qui n'ont pas été soumis à un traitement bactéricide peuvent être contaminés par un ou plusieurs de ces pathogènes, le niveau de contamination est normalement extrêmement bas. Il est peu vraisemblable que le nombre d'organismes naturellement présents dans les produits de la mer à l'état cru suffisent à entraîner la maladie. La seule exception est le cas où les pathogènes sont concentrés par filtrage (mollusques). En revanche, on peut trouver des niveaux élevés de bactéries du groupe 1 sur les produits de la pêche s'il y a eu prolifération. Cette situation représente un danger sérieux, avec de forts risques d'entraîner des maladies. Il convient par conséquent d'empêcher la prolifération (et l'éventuelle production de toxines).

- **Bactéries non indigènes (Groupe 2)**

- *Salmonella sp.*

Les salmonelles appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae avec plus de 2000 sérovars connus. Ces organismes mésophiles sont distribués dans le monde entier mais se rencontrent principalement dans les intestins de l'homme et des animaux et dans les milieux naturels pollués par des excréments humains ou animaux. La survie dans l'eau dépend de nombreux paramètres, parmi lesquels des facteurs biologiques (interaction avec d'autres bactéries) et physiques (température). Rhodes et Kator (1988) ont pu montrer que *E. coli* et *Salmonella sp.* Pouvaient se multiplier et survivre pendant des semaines dans les eaux des estuaires, tandis que (Jiménez *et al.* 1989) a fait état de résultats similaires concernant la survie dans des eaux douces tropicales.

- *Escherichia coli*

E. coli est le microorganisme que l'on trouve le plus communément dans les voies intestinales de l'homme et des animaux à sang chaud. Le plus souvent, les souches d'*E. coli* qui colonisent l'appareil gastro-intestinal sont des commensaux inoffensifs lorsqu'elles ne jouent pas un rôle important dans le maintien de la physiologie intestinale. Toutefois, à l'intérieur de l'espèce on trouve au moins quatre types de souches pathogènes.

Rien n'indique que les produits de la mer soient une source importante d'infection à *E. coli* (Ahmed, 1991). La plupart des infections semblent liées à la contamination de l'eau ou à la manipulation des aliments dans des conditions non hygiéniques.

- *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des organismes ubiquistes que l'on trouve dans l'eau, l'air, les eaux usées, les sols, et, d'une manière générale, tout ce qui vient en contact avec l'homme. Toutefois, le principal réservoir et habitat est constitué par le nez, la gorge et la peau des animaux/humains (Huber *et al.*, 2004)

Les produits de la mer comestibles peuvent être contaminés par les staphylocoques, soit par l'intermédiaire de manipulateurs infectés, soit par l'environnement.

Un certain nombre de tests microbiologiques sont utilisés par les autorités pour vérifier que le statut microbiologique est satisfaisant. Le but de ces tests est de détecter les bactéries

pathogènes (*Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*) ou les organismes indicateurs de la pollution fécale (coliformes fécaux, streptocoques fécaux) ou d'autres types de contamination générale ou de mauvaises pratiques de manipulation (bactéries coliformes, streptocoques fécaux, nombre total viable) pour la qualité organoleptique, les parasites, les contrôles chimiques (TVB-N, histamine et contaminants chimiques) et l'analyse microbiologique, y compris les plans d'échantillonnage et les méthodes d'analyse. Jusqu'à présent, il n'y a que des critères pour la teneur en histamine des poissons (9 échantillons doivent être prélevés dans chaque lot. La valeur moyenne ne doit pas dépasser 100 ppm, 2 échantillons peuvent avoir une valeur supérieure à 100 ppm, mais pas 200 ppm avoir > 200 ppm). Coté microbiologiques, les normes exigent que le poisson réponde à certains critères à savoir (voir tableau I)

Tableau I : les normes microbiologiques du poisson (JORADP, 1998).

Germes	Normes
Flore totale	$<3.10^5$ ufc/g
Coliforme fécaux	<10 ufc/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	$<10^2$ ufc/g
Salmonelles	Absence dans 25 g

matériels et méthodes

1- Lieu d'étude

Notre travail a été réalisé au laboratoire de mycologie de l'Université de Bejaia durant la période allant de février à mai 2018 au cours desquels nous avons réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques des souches isolées à partir de la sardine

2- Echantillonnage

Au cours de cette étude, Les échantillons ont été récupérés au niveau des poissonneries de la ville de Bejaia centre et ses environ (ports, stade, lakhemisse, nasseria, aamriw, sidi Ali labher, aokas, tichy , souk el thnine, résidence universitaire 17 octobre 1961, et un poisson cuit). Au total 66 échantillons ont été réalisés en prélevant deux fois du même endroit, mais en périodes différentes, à raison de 3 poissons par prélèvement. Nos échantillons sont déposés par le vendeur ou le personnel lui-même dans un sac en plastique stérile. Ceux-ci ont été directement acheminés au laboratoire de mycologie dans une glacière ou ils ont été analysés.

3- Préparation des échantillons

La Sardine a été découpée aseptiquement sur une plaque en plastique, les intestins ont été extraits, un par un, et mis dans des tubes contenant 5 ml d'eau physiologique, vortexé et laissés décanter pendant 10 minutes.

Pour la chaire, environ 3 mg ont été prélevés et déposés dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique

Le prélèvement de la surface a été réalisé en tournant un écouvillon stérile sur lui-même et en balayant toute la surface de poisson, qu'on a ensuite mis dans des tubes contenant 5 ml d'eau physiologique.

Pour réaliser l'enrichissement, 1ml de chaque solution mère a été introduit dans des tubes contenant 5 ml de bouillon nutritif (**Annexe 01**) qu'on a incubés à 37 °C pendant 24 heures.

4- analyse bactériologique

Les bactéries recherchées sont :

- 1) *Staphylococcus aureus*
- 2) *E.coli*
- 3) *Salmonella sp.*

4-1)-recherche de *Staphylococcus aureus*

La recherche des souches de *staphylococcus aureus* a été faite sur gélose Chapman (**Annexe 07**). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 72 heures.

4-2)-recherche d'*Escherichia coli*

La recherche d'*E. coli* a été faite sur la gélose Mac conkey (**Annexe 08**) ou EMB (éosine méthylène-bleu agar). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 72 heures.

4-3) recherche de *Salmonella sp.*

La recherche des *Salmonella* se fait sur la gélose SS (*Salmonella-Shigella*). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 72 heures.

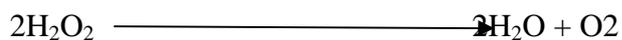
5-purification

Pour obtenir des colonies pures plusieurs repiquages successifs, des colonies suspectes, ont été effectués sur les même milieux. L'incubation se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures.

6-Identification

Recherche de la catalase

L'enzyme catalase médie la décomposition du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. La présence de l'enzyme dans un isolat bactérien est évidente lorsqu'un faible inoculum est introduit dans le peroxyde d'hydrogène, et le développement rapide des bulles d'oxygène se produit. L'absence de catalase est évidente par un manque de production de bulles



Une goutte de H₂O₂ (3%) a été déposée sur une lame en verre, à laquelle on a rajouté une colonie bien distincte d'une culture jeune. L'apparition instantanée des bulles de gaz à la surface de l'émulsion traduit une réaction positive.

Recherche de la coagulase

La coagulase ou staphylocoagulase est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin.

Dans un tube à essai stérile :

- verser 0,5 ml de bouillon BHIB (**Annexe 05**) qu'on déjà ensemencé et incubé à 37°C pendant 24 h.

- rajouter 0,5 ml de plasma humain.
- incuber à 37 °C pendant 24 heures

La coagulation du plasma avant la fin des 24 h signifie que la souche est coagulase +.

Recherche de production d'indole à 44°C

Le milieu eau peptonée exempte d'indol contient du L-tryptophane , La dégradation du L-tryptophane par les bactéries appelées « Indole +» entraîne la production d'indole, que l'on détecte par une goutte de réactif James (ou réactif de Kovacs)

plusieurs colonies sont ensemencées dans des tubes contenant l'eau peptonée exempte d'indol qu'on a incubé à 44 °C pendant 24 heures .

Après on ajoute quelques gouttes du réactif Kovacs dans chaque tube.

Si c'est positif, on observe l'apparition d'un anneau rose-rouge à la surface : la bactérie est dite alors Indole +.

Fermentation des sucres (sur le milieu TSI) (Annexe 04)

Les fermentations des sucres se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (incubation à 37°C pendant 24h)

- Une coloration jaune de la pente indique la fermentation du lactose
- Une coloration jaune du culot indique la fermentation du glucose
- Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique la fermentation de saccharose

- La production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

- La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit ou bien par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

Test de mobilité (sur le milieu mannitol mobilité) (Annexe 03)

Ensemencer par piqûre centrale à l'aide du fil droit d'une pipette pasteur chargé de suspension de la culture à étudier. Incuber 24 heures à 37°C.

La fermentation du mannitol: les bactéries mannitol + acidifient le milieu qui vire au jaune (teinte acide du rouge de phénol)

La mobilité: du fait de la faible teneur en agar du milieu, les bactéries mobiles peuvent s'y déplacer

Recherche de la nitrate-réductase

Le nitrate réductase est une enzyme capable de catalyser la réaction de réduction des nitrates. On utilise un milieu nitraté (bouillon nitraté).

Après incubation (24h à 37°C), ajouter quelques gouttes des réactifs : Nitrites 1 (acide sulfanilique) et Nitrites 2 (α -naphtylamine) (**Annexe 06**).

- Milieu rouge orangé : la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase
- Milieu jaune \Rightarrow ajout de la poudre de zinc

- Milieu rouge : présence de nitrate dans le milieu \rightarrow la bactérie ne possède pas l'enzyme.

-Coloration jaune : pas de nitrate dans le milieu \rightarrow la bactérie possède l'enzyme

7- Antibiogramme des souches de *E.coli*

Pour réaliser l'antibiogramme, on utilise la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton (**Annexe 09**). A partir d'une culture fraîche des souches d'*E. coli*, on prend 2 à 3 colonies qu'on ensemence dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique pour obtenir une charge microbienne qui correspond à 0.5 McFarland (10^7 bactéries /ml). On ensemence par la suite par écouvillonnage des boîtes contenant le milieu mueller hinton.

On dispose ensuite les disques d'antibiotiques (tobramycine 10 μ g, kanamycine 30 μ g, tetracycline 30 μ g, clindamycine 2 μ g, céfipime 30 μ g, erythromycine 15 μ g, ceftazidime 30 μ g) distant de 1.5 cm. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h, puis on mesure les différents diamètres d'inhibition.

Résultats et discussion

Au cours de cette étude, on a analysé plusieurs échantillons de sardine durant la période allant de février à mai 2018. Pour chaque poisson, on a analysé, la chair, les intestins et la surface. 61 souches bactériennes ont été isolées, dont 8 ont été identifiées comme des souches de *Staphylococcus aureus*, 12 comme *Escherichia coli* et 41 comme des salmonelles. La répartition des souches isolées est mentionnée dans le tableau ci-dessous :

Tableau II : répartition des souches isolées

Germe	Lieu d'isolement	Nombre		Total des souches
<i>Staphylococcus aureus</i>	Surface	3		8
	Chair	2		
	Intestin	3		
<i>E.coli</i>	Surface	4	5	12
	Surface de la sardine cuite	1		
	Chair	3		
	Intestin	3	4	
	Intestin de la sardine cuite	1		
Salmonelles	Surface	8		41
	Chair	7	8	
	Chair de la sardine cuite	1		
	Intestin	23	24	
	Intestin de la sardine cuite	1		

Notre étude a montré la présence de souches de *Staphylococcus aureus*, et de Salmonelles. Ces bactéries sont souvent associées à des altérations qui se produisent après la pêche (WOGU *et al.*, 2010). Cette constatation est en accord avec les résultats de GRAM & HUSS (2001), qui ont rapporté que ces micro-organismes sont les causes majeures de l'altération microbienne des produits halieutiques après la capture. La présence des *E. coli* est un signe de contamination qui survient lorsque les mesures hygiéniques lors de la conservation, du lavage ou de l'éviscération des produits de la pêche sont absentes (Zamboutchini *et al.*, 2008).

Staphylococcus aureus

Un total de 8 souches de *Staphylococcus aureus* ont été isolés ; dont 2 de la chair, 3 de la surface, et 3 des intestins.

Staphylococcus aureus est une bactérie qui ne fait pas partie de la microflore de poisson mais son habitat naturel est la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (l'ICMSF 2011). Sa présence sur la surface et la chair de poisson indique une contamination postérieure à la capture due à de mauvaises mesures d'hygiène.

Les staphylocoques sont des organismes ubiquistes que l'on trouve dans l'eau (Ahmed, 1988), dans des conditions de pH relativement élevé, ils peuvent proliférer dans l'eau de mer (Bakar et al, 2010), ce qui peut expliquer sa présence dans les intestins.

Cependant, on remarque l'absence totale de *Staphylococcus aureus* dans un poisson cuit, ce qui est peut être dû à une bonne cuisson, et/ou le respect des règles d'hygiène personnelle (lavage fréquent des mains).

Escherichia coli

Un total de 12 souches de *E.coli* ont été isolés, dont 5 de la surface, 3 de la chair et 4 des intestins.

E. coli est d'origine fécale humaine ou animale, car elle n'existe pas dans l'environnement naturel; il peut cependant survivre quelques mois dans l'eau, le sol bien qu'il se multiplie rarement dans ces milieux (Edberg *et al.*, 2000; WHO, 2011 ; Santé Canada, 2012), à moins que des conditions de température élevée et la présence de nutriments le permettent (Hardina et Fujioka, 1991 ; Brandl, 2008). Sa détection dans l'eau doit donc être considérée comme reflétant la présence possible de micro-organismes d'origine fécale ou entérique (WHO, 2011).

La présence de *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 cote maritime dans la région de Bejaia (Brahmi et al, 2014).

Leur présence aussi dans l'intestin d'un poisson cuit pourrait être due à une mauvaise cuisson et/ou le non respect des règles d'hygiène

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).

La présence d'*E.coli* sur la surface des poissons s'explique par le conditionnement des poissons à vendre dans des caisses ayant déjà servi à emporter le poisson, ce qui constitue une source de contamination et de re-contamination.

Et d'un autre côté leur présence sur la surface du poisson cuit peut être témoins de mauvaises conditions d'hygiène en l'occurrence l'hygiène du personnel.

Les Salmonelles

Un total de 41 souches de salmonelle ont été isolés, dont 8 de la surface, 4 de la chair, et 24 des intestins.

La présence des salmonelles dans les intestins des poissons peut être provoquée lors de la capture, Plusieurs travailleurs ont constaté que les poissons vivant dans ces eaux pouvaient transporter des organismes fécaux humains et animaux dans leurs intestins.

La présence de salmonelle dans la chair du poisson cuit peut s'expliquer par une mauvaise cuisson, parce que les salmonelles sont sensibles à la chaleur, comme peut aussi s'expliquer par une contamination après la cuisson.

Cette contamination élevée peut être causée par différents facteurs tels que la négligence de la température de conservation, qui favorise la multiplication des micro-organismes chez le poisson, ou le non-respect des bonnes pratiques d'hygiène par le personnel, la contamination de l'eau ou de la glace qui peuvent contenir des matières fécales (Itah *et al.*, 1996).

La présence de salmonelles sur la surface des poissons peut s'expliquer par une contamination d'origine humaine (vendeur), ou une contamination par la caisse elle-même.

La plupart des études publiées indiquent que les produits de la mer véhiculent beaucoup moins fréquemment les salmonelles que d'autres aliments et que les poissons ne sont responsables que d'une faible proportion de l'ensemble des cas de salmonellose enregistrés aux Etats-Unis ou ailleurs (Ahmed, 1991) sauf lors de contamination par manipulations dans les cuisines.

Les résultats de cette étude nous montrent que nos échantillons sont très contaminés, avec une présence massive de germe potentiellement pathogènes comme les salmonelles, et moins

contaminés par des germes de type *E.coli* et *Staphylococcus aureus*, cet état de fait peut s'expliquer par les conditions de milieu de travaille, mais surtout le non respect des règles d'hygiène par les acteurs évolues dans le secteur.

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

L'antibiogramme à montre que toute les souches de *E. coli* sont résistant à deux antibiotiques (clindamycine, érythromycine), et sensible à cinq antibiotiques (tobramycine, kanamycine , tétracycline , cefepime , ceftazidime).

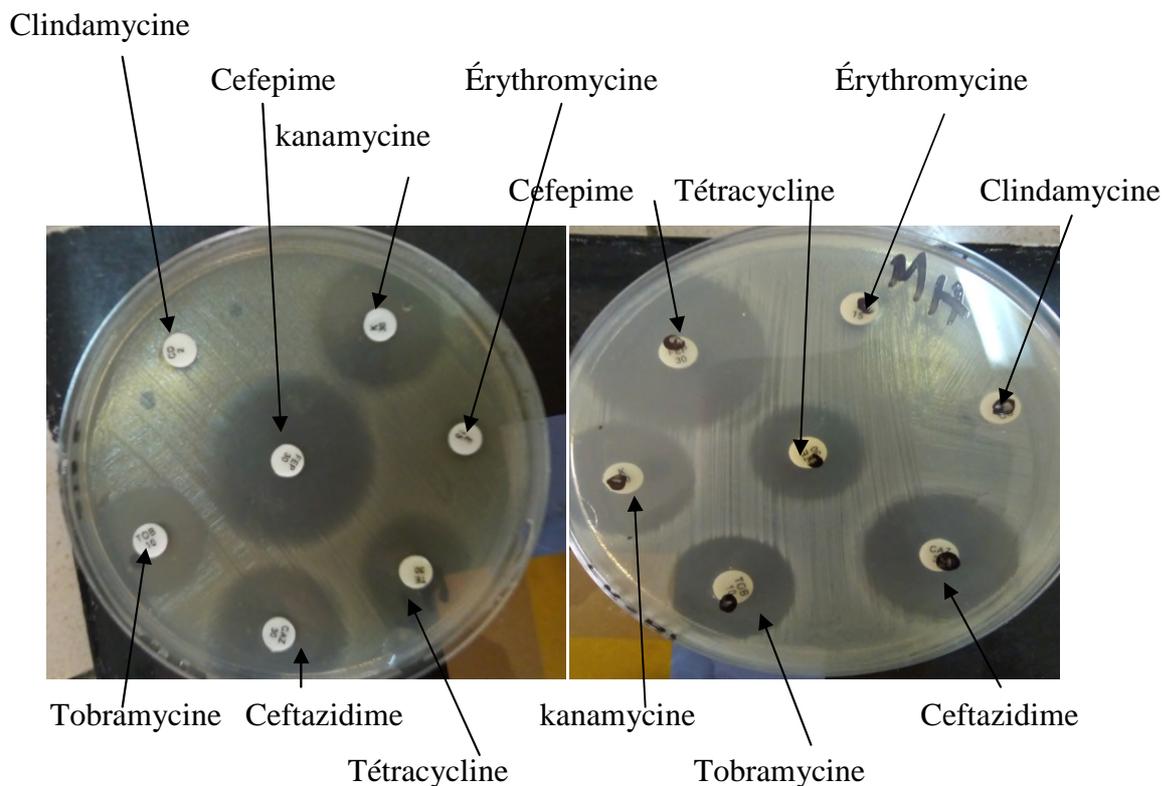


Figure 01 : *antibiogramme des souches E.coli*

La clindamycine (famille des lincosamides) et l'érythromycine (famille des macrolides) font partie d'un groupe de famille d'antibiotique, avec les streptogramines, appelé MLS pour macrolide, lincosamide et streptogramine. Le mécanisme d'action de ces antibiotiques étant très proche (action sur le ribosome empêchant la synthèse des protéines), la résistance bactérienne à l'un d'entre eux doit faire craindre l'apparition, en cours d'utilisation, d'une résistance croisée (bien qu'il existe aussi des résistances spécifiques à l'érythromycine par des

pompes à efflux). Ainsi, dans notre exemple, la clindamycine ne devrait pas être le premier choix de traitement.

Les antibiotiques Cefepime et ceftazidime sont des céphalosporines de 3^{ème} génération appartiennent au groupe des β lactamines, et *E.coli* naturellement sensible à ce dernier.

La tobramycine et kanamycine sont des antibiotiques de la famille des aminosides, Son activité bactéricide, Toutes les souches des *E.coli* sont naturellement sensible à ces deux antibiotiques.

Les tétracyclines sont des antibiotiques à spectre large actifs sur les germes à Gram négatif tel que *E.coli*.

Conclusion

Du point de vue de la nutrition humaine, les poissons constituent une source de protéines à valeur nutritionnelle élevée. Les poissons sont aussi d'excellents vecteurs d'autres micronutriments (oligo-éléments, vitamines ou pro-vitamines). Toute fois, la manipulation et la consommation d'un poisson contaminé par des bactéries pathogènes peut être à l'origine de maladies avec des conséquences graves à la santé publique et à l'économie.

Au cours de cette étude 66 sardines ont été analysées et 61 bactéries appartenant au groupe des bactéries non indigènes ont été identifiées : 12 *Escherichia coli*, 8 *Staphylococcus aureus* et 41 salmonelles. La présence de ces bactéries peut représenter un risque pour la santé du consommateur. Les raisons de cette contamination bactérienne peuvent être liées à la contamination de l'eau ou durant le circuit de distribution de poisson.

Ainsi, les différents acteurs de la pêche doivent avoir le souci permanent d'identifier, de prévenir et de maîtriser les risques sanitaires pouvant affecter les produits de la mer, dans le but d'améliorer les conditions d'hygiène et de manipulation. Cette démarche permet de protéger la santé du consommateur et de valoriser la matière première. Ces activités incluent le système HACCP (Analyse des dangers et des points critiques pour leur maîtrise).

Ce travail mérite d'être complété par :

- Identification génotypique des souches isolées.
- Tester la résistance des souches de *Staphylococcus aureus* et des salmonelles aux antibiotiques.
- Augmenter le nombre d'échantillon et le nombre de lieux et faire une étude sur l'année pour voir l'effet des saisons.
- Elargir le spectre des bactéries recherchées, afin de réaliser une étude complète.

Référence bibliographique

A

AFSSA (2003) Acides gras de la famille Oméga 3 et système cardiovasculaire : intérêt et allégations. Juillet 2003.

Ahmed, F.E., 1991. Seafood Safety. National Academy press Washington D.C., Etats-Unis.

ANCA. Association nationale des commerçants

ANONYME 1.- Bureau Veritas. Assurance qualité des produits de la mer. Belgique. Avril 1996. p. 136-138.

ANONYME 2.- Activités de la pêche et de l'aquaculture. Caractéristiques du secteur de la pêche. Ministère de la pêche et des Ressources Halieutiques en Algérie. Plan national de développement de la pêche et de l'aquaculture, édition 2003-2007.

B

Brahmi S, Dunyach-Rémy C, Touati A, Lavingne JP. (2014). CTX-M-15-Producing Escherichia coli and thd pandemic clone O25b-ST 121 isolated from wild fish in mediterranean sea. Clin microbial Infect. **21**, 18-20.

Brandl, MT (2008). Multiplication of Escherichia coli O157:H7 on Postharvest Lettuce. Appl. Environ. Microbiol. 74(17):5285-5289.

C

Cours du module Technologie des viandes et produits carnés. **INATAA**, 2006-2007.

D

DIOP M.A (2010) contribution à la détermination de l'indice de fraîcheur de quelques espèces de poissons tropicales Th. Med. Vet. Dakar, 1995, N° 24, 75 P.

E

Edberg, SC, EW Rice, RJ Karlin et MJ Allen (2000). Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 106S-116S.

G

GRAM & HUSS (2001) GRAM, L., OUNDO, J.O. & BON, J. (2000).- Shelf life of fish depends on storage temperature and initial bacteria load. *Trop. Sci.*, **25**, 28-30.
guide-des-aliments/sardine-1.1338102.

Le guide de la santé dans votre assiette, Que choisir, 2010

H

HACCP. Hazard Analysis Critical Control Pointve

Hardina, C.M. et R.S. Fujioka (1991). Soil : the environmental source of Escherichia coli and enterococci in Hawaii's streams. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 185-195

I

ICMSF(international commission on microbial spécifique for foads.2011).

INATAA 2006.2007 Institut De Nutrition, Alimentation Et Technologies Agroalimentaires, Constantine.

Itah, A. Y., Etukudo, S.M. and Enomfon, A. (1996). Bacteriological and Chemical analysis of some rural water supplies in Calabar, Nigeria. *West African Journal of Biological and Applied Chemistry* 41: 1-10.

J

Jiménez , L.J. Munir, GG. Tarauzos and T.C.Hazen1989.Survival and activity of Salmonella tiphymurium and Escherichia coli in tropical fresh water. *J. Appl. Bacterial.* 67,61-69

Journal officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire N°35 du 27 mai 1998. Critères Microbiologiques des plats cuisinés

Journal officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire N°35 du 27 mai 1998. Critères microbiologiques relatifs à certaines denrées alimentaires

K

Kabre T. A., Diarra D. F. et Traoré A., 2003. Fumage du poisson au Burkina Faso: caractéristiques du matériel utilisé et étude comparée des coûts d'exploitation et de la rentabilité de trois fumoirs améliorés. Cahiers Agricultures, 12: 409-417

Krauss RM, Eckel RH, Howard B et al. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. Stroke 2000 November; 31(11):2751-66.

M

Martin, D., Salinas, M., Lopez-Valdaliso, R., Serrano, E., Recuero, M., and Cuadrado, A. (2001) J. Neurochem. 78, 1000-1008.

Morris MC, Evans DA, Bienias JL et al. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. Arch Neurol 2003 July;60(7):940-6

N

Ness AR, Gallacher JE, Bennett PD et al. Advice to eat fish and mood: a randomised controlled trial in men with angina. Nutr Neurosci 2004 February;6(1):63-5..

O

OLSEN K.M., Wamack A., garrett A.R., Suddith J.T., Purugganan M.D., 2000 contrasting evolutionary forces in the Arabidopsis thaliana floral developmental pathway. Genetic, 160 :148-175

P

Pedersen M, Stripp C, Klarlund M, Olsen SF, Tjonneland AM, Frisch M. Diet and risk of rheumatoid arthritis in a prospective cohort. J Rheumatol 2005 July;32(7):1249-52.

R

Rhodes, M.w. and H. Kator 1988 survival of *Escherichia coli* and *salmonella* spp. In estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2902-2907.

Ruivo, M., ed. (1972) *Marine pollution and sea life*, Londres, Fishing News (Books) Ltd.

S

Santé Canada (2012). *Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada.* *Escherichia coli.*

W

WHO (2011). *Guidelines for drinking-water quality Third edition incorporating the first and second addenda, volume 1, Recommendations*

WOGU, M.D. & MADUAKOR, C.C. (2010).- Evaluation of Microbial Spoilage of Some Aquacultured Fresh Fish in Benin City Nigeria. *Ethiopian J. Environ. Stud. Manag.*, **3** (3), 18-22.

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.

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 boeuf.....	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 g

PH=7,1

Gélose Mueller-Hinton Annexe 09

Infusion de viande de bœuf 300,0 ml

Peptone de caséine 17,5 g

Amidon de maïs 1,5 g

Agar 17,0 g

pH = 7,4

Résumé

La sardine est un produit très largement consommé par les algériens et dont la qualité microbiologique doit répondre à des normes selon JORA.

Au cours de cette étude 66 échantillons de sardines prélevées de différents endroits de la ville de Bejaia et ses environs ont été analysés.

On a recherché et identifié la présence de trois types de bactéries en utilisant une série de tests biochimiques.

On a isolé 8 souches de *Staphylococcus aureus*, 12 souches d'*E.coli* et 41 souches de salmonelles. Après la réalisation d'un antibiogramme sur les souches de *E.coli* les résultats montrent que toutes les souches sont résistantes à deux antibiotiques (clindamycine et érythromycine), et sensibles à cinq antibiotiques (tobramycine, kanamycine, tétracycline, cefepime, ceftazidime). 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, résistance aux antibiotiques.

Abstract

Sardine is a product widely consumed by Algerians and whose microbiological quality must meet standards according to JORA.

In this study, 66 samples of sardines taken from different locations in the city of Bejaia and surrounding areas were analyzed.

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

8 strains of *Staphylococcus aureus*, 12 strains of *E. coli* and 41 strains of salmonella were isolated. After performing an antibiogram on *E. coli* strains, the results show that all strains are resistant to two antibiotics (clindamycin and erythromycin), and sensitive to five antibiotics (tobramycin, kanamycin, tetracycline, cefepime, ceftazidime). 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 resistance