



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

## FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

## CONTACT

Please contact [publications@unido.org](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)



XD9700068

21634

DP/ID/SER.A/1763/Add.3  
23 mai 1996  
Original: FRANCAIS

Distr. RESTREINTE

**ASSISTANCE D'URGENCE AUX INDUSTRIES DE TRANSFORMATION  
DES PRODUITS DE LA PECHE AU SENEGAL**

SI/SEN/94/801/11-51

**REPUBLIQUE DU SENEGAL**

**Rapport technique: Manuel des méthodes d'inspection et d'analyse  
des produits de la pêche au Sénégal\***

**Etabli pour le Gouvernement de la République du Sénégal par  
l'Organisation des Nations Unies pour le Développement industriel,  
Organisation chargée de l'exécution pour le compte  
du Programme des Nations Unies pour le Développement**

**Basé sur le travail de M. L. Ababouch,  
Expert en technologie alimentaire et assurance-qualité**

**Fonctionnaire chargé de l'appui: A. Ouaoouich  
Service des Agro-Industries**

**Organisation des Nations Unies pour le Développement industriel**

**Vienne**

-----  
\* Document n'ayant fait l'objet d'aucune mise au point rédactionnelle.

## SOMMAIRE

|  | Page |
|--|------|
| 1. Introduction  | 4    |
| 2. Inspection en vue de l'agrément des installations à terre   | 4    |
| 3. Inspection des conditions d'exploitation et d'hygiène   | 5    |
| 4. Echantillonnage (plans d'échantillonnage) des produits de la pêche  | 5    |
| 4.1. Matière première  | 5    |
| 4.2. Echantillonnage pour le contrôle du taux d'histamine et de mercure                                      | 11   |
| 4.3. Echantillonnage pour le contrôle microbiologique  | 12   |
| 4.4. Echantillonnage des conserves de poisson en vue de l'évaluation de la stérilité commerciale             | 12   |
| 4.5. Echantillonnage pour l'évaluation de la qualité marchande, du poids, étiquetage du produit fini emballé | 12   |
| 5. Analyse de la fraîcheur   | 15   |
| 6. Méthodes chimiques d'analyse des produits de la pêche   | 16   |
| 6.1. Détermination de l'azote basique volatile total   | 16   |
| 6.2. Détermination de la triméthylamine  | 21   |
| 6.3. Détermination de l'histamine  | 22   |
| 6.4. Détermination du dioxyde de soufre  | 25   |
| 6.4. Détermination du mercure  | 31   |
| 7. Contrôle microbiologique des produits de la pêche   | 37   |
| 7.1. Prélèvement et préparation des échantillons   | 37   |
| 7.2. Dénombrement de la flore aérobie totale   | 38   |
| 7.3. Dénombrement des coliformes, coliformes fécaux et Escherichia coli                                      | 39   |
| 7.4. Recherche de Salmonella   | 41   |
| 7.5. Recherche de dénombrement de Staphylococcus aureus  | 45   |
| 7.6. Contrôle de la stérilité commerciale des conserves de poissons  | 48   |
| 7.7. Interprétation des résultats du contrôle microbiologique  | 51   |
| ANNEXES (Milieux de culture)   | 54   |

## TABLEAUX

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tableau 1:  | Formulaire I d'inspection et d'audit des installations à terre - Exigences sanitaires relatives à la construction et au matériel d'exploitation | 6  |
| Tableau 2:  | Formulaire I d'inspection et d'audit des installations à terre - Exigences sanitaires relatives aux conditions d'hygiène et d'exploitation      | 8  |
| Tableau 3:  | Classification des installations à terre selon le degré de non-conformité   | 10 |
| Tableau 4:  | Plan d'échantillonnage de poissons pour l'évaluation de la fraîcheur au débarquement ou lors de la première vente                               | 10 |
| Tableau 5:  | Plan d'échantillonnage pour l'analyse de la fraîcheur du poisson, crustacés et mollusques à la réception à l'usine                              | 11 |
| Tableau 6:  | Plan d'échantillonnage I (Niveau d'inspection I, NQA = 6,5)   | 13 |
| Tableau 7:  | Plan d'échantillonnage II (Niveau d'inspection II, NQA = 6,5)   | 14 |
| Tableau 8:  | Evaluation de la fraîcheur du poisson   | 15 |
| Tableau 9:  | Evaluation de la fraîcheur des céphalopodes   | 16 |
| Tableau 10: | Critères microbiologiques de l'Union européenne applicables à la production des crustacés et mollusques cuits                                   | 52 |
| Tableau 11: | Critères microbiologiques préconisés par l'ICMSF pour les produits de la pêche  | 53 |

## 1- Introduction

La manutention, le débarquement, la transformation, le stockage et la commercialisation des produits halieutiques font l'objet de procédures d'inspection et de contrôle pour s'assurer que ces opérations se font en conformité avec les exigences sanitaires en vigueur. Ce chapitre décrit les modalités d'inspection en vue de l'agrément des installations à terre, les modalités d'inspection pour l'évaluation du respect des prescriptions en matière d'hygiène, les plans d'échantillonnage et les méthodes d'analyse sensorielle, chimique et microbiologique des produits halieutiques.

## 2- Inspection en vue de l'agrément des installations à terre

L'inspection des installations à terre de transformation des produits de la pêche pour vérifier leur conformité avec les exigences de la réglementation sénégalaise et de la réglementation de l'Union européenne (Directive 91/493/CEE) relatives à la construction et au matériel d'exploitation se fait selon la "check list" du tableau 1. Les définitions suivantes s'appliquent à la classification des défauts de non conformité selon leur gravité.

- Défaut critique Est considéré comme défaut de non conformité critique toute condition ou pratique qui peut conduire à l'obtention d'un produit malsain ou dangereux pour la santé du consommateur.

- Défaut grave Est considéré grave toute condition ou pratique qui entrave l'hygiène industrielle et l'obtention d'un degré de salubrité suffisant et conduit à un produit contaminé ou altéré mais sans risque direct et probable pour la santé publique.

- Défaut majeur Est considéré comme défaut majeur toute condition ou pratique qui entrave l'hygiène et la salubrité générales, et peut conduire à l'altération de la qualité du produit.

- Défaut mineur Est considéré comme défaut mineur toute condition ou pratique non conforme aux exigences sanitaires et d'hygiène sans pour autant être un défaut critique, grave ou majeur.

Les usines sont classées en plusieurs catégories selon le degré de leur conformité avec les exigences sanitaires. Pour ce faire, l'inspecteur du BCPH note pour chaque cas de non conformité une croix à l'intérieur des parenthèses qui lui sont réservées dans la fiche du tableau 1. Encas de conformité d'un élément relatif au matériel ou à la construction, l'inspecteur ne note rien à l'intérieur des parenthèses correspondantes. Dans certains cas, l'inspecteur utilise son expérience pour choisir entre deux niveaux de gravité.

Une fois l'inspection détaillée terminée, l'inspecteur additionne tous les cas de non conformité et procède au classement de l'usine selon le tableau 3. Pour ce faire, il tient compte uniquement des cas de non conformité les plus graves. Par exemple, une usine avec un total de deux défauts critiques, 5 défauts graves, 3 défauts majeurs et 4 défauts mineurs aura la cote "2 critique", alors qu'une usine avec 0 défauts critiques, 2 défauts graves, 6 défauts majeurs et 5 défauts mineurs aura la cote "2 grave". Seules les usines du type A, B ou C obtiennent l'agrément technique.

A la suite de l'inspection d'une installation à terre, un rapport est rédigé et des recommandations concernant les aménagements à faire sont émises. Autant que possible, un échéancier réaliste est établi et discuté avec les responsables de l'installation pour sa mise à niveau graduelle.

### **3- Inspection des conditions d'exploitation et d'hygiène**

L'inspection des installations à terre de transformation des produits de la pêche pour vérifier leur conformité avec les exigences de la réglementation sénégalaise et de la réglementation de l'Union européenne (Directive 91/493/CEE) relatives aux conditions d'hygiène et d'exploitation se fait selon la "check list" du tableau 2. Les définitions précédentes s'appliquent également dans ce cas pour la classification des défauts de non conformité selon leur gravité. Il en est de même de la méthode classification des usines.

A la suite de cette inspection, un rapport détaillé est établi et les mesures adéquates entreprises en cas de non respect des règles d'hygiène et de bonne pratique de fabrication.. Ces mesures peuvent aller d'un contrôle sanitaire renforcé des produits intermédiaires et/ou de produits finis, jusqu'au retrait temporaire de l'agrément technique.

### **4- Echantillonnage (plans d'échantillonnage) des produits de la pêche**

#### 4-1 Matière première

La réglementation sénégalaise prévoit le prélèvement en vue de l'évaluation de la fraîcheur selon le plan d'échantillonnage suivant:

- 2 kg par tonne pour le poisson frais,
- 500 g par tonne pour les crevettes ou les langoustes
- 10 dz pour 1000 dz pour les huîtres

Toutefois, le Bureau de contrôle des produits halieutiques (BCPH) de la Direction de l'Océanographie et des Pêches Maritimes (DOPM) prévoit d'utiliser le plan d'échantillonnage recommandé par l'Union européenne (tableau 4) pour l'évaluation de la fraîcheur du poisson au débarquement ou lors de la première vente.

**TABLEAU 1: FORMULAIRE I D'INSPECTION ET D'AUDIT DES INSTALLATIONS A TERRE  
EXIGENCES SANITAIRES RELATIVES A LA CONSTRUCTION ET AU MATÉRIEL D'EXPLOITATION**

**NOM DE L'USINE :** \_\_\_\_\_ **NUMÉRO D'AGRÈMENT:** \_\_\_\_\_  
**DATE D'INSPECTION :** \_\_\_\_\_ **TYPE D'INSPECTION:** \_\_\_\_\_  
**NOM DE L'INSPECTEUR :** \_\_\_\_\_ **NOM DU RESPONSABLE:** \_\_\_\_\_

**Gravité du défaut**

| Élément à inspecter  | Mi         | Ma                       | G                        | C   | Evaluation |
|--|------------|--------------------------|--------------------------|-----|------------|
| <b>1-CONCEPTION DES LIEUX DE TRAVAIL DU POISSON</b><br>- Surface suffisante pour travailler de façon hygiénique<br>- Séparation secteur propre/secteur souillé   |            | ( )<br>( )               | ( )<br>( )               |     | [ ]        |
| <b>2- LIEUX DE TRAVAIL DU POISSON</b>  |            |                          |                          |     |            |
| <b>2-1- sols</b><br>- matériaux imperméables et faciles à nettoyer et à désinfecter<br>- écoulement ou évacuation d'eau faciles  | ( )        | ( )<br>( )               | ( )                      |     | [ ]        |
| <b>2-2- Murs</b><br>- surfaces lisses faciles à nettoyer<br>- surfaces résistantes et imperméables   | ( )        | ( )<br>( )               | ( )                      |     | [ ]        |
| <b>2-3- Plafonds facile à nettoyer</b>   | ( )        | ( )                      |                          |     | [ ]        |
| <b>2-4- Portes</b><br>- en matériaux inaltérables<br>- faciles à nettoyer  | ( )<br>( ) | ( )<br>( )               |                          |     | [ ]        |
| <b>2-5- Ventilation</b><br>- suffisante<br>- bonne évacuation de buées   | ( )        | ( )<br>( )               | ( )                      |     | [ ]        |
| <b>2-6- Eclairage (naturel ou artificiel)</b><br>- intensité suffisante  |            | ( )                      | ( )                      |     | [ ]        |
| <b>2-7- Nettoyage et désinfection des mains</b><br>- dispositifs en nombre suffisants<br>- robinets non actionnables à la main<br>- essuie-mains à usage unique<br>- savon et désinfectant disponibles |            | ( )<br>( )<br>( )<br>( ) | ( )<br>( )<br>( )<br>( ) |     | [ ]        |
| <b>2-8- Nettoyage et désinfection des installations des outils et du matériel</b><br>- dispositifs disponibles   |            |                          |                          | ( ) | [ ]        |
| <b>3- CHAMBRES FROIDES</b>   |            |                          |                          |     |            |
| <b>3-1- sols</b><br>- matériaux imperméables et faciles à nettoyer et à désinfecter<br>- écoulement ou évacuation d'eau faciles  | ( )        | ( )<br>( )               | ( )                      |     | [ ]        |
| <b>3-2- Murs</b><br>- surfaces lisses faciles à nettoyer<br>- surfaces résistantes et imperméables   | ( )        | ( )<br>( )               | ( )                      |     | [ ]        |
| <b>3-3 Plafonds facile à nettoyer</b>  |            | ( )                      | ( )                      |     | [ ]        |
| <b>3-4 Portes</b><br>- en matériaux inaltérables<br>- facile à nettoyer  | ( )<br>( ) | ( )<br>( )               |                          |     | [ ]        |
| <b>3-5 Eclairage suffisant</b>   | ( )        | ( )                      |                          |     | [ ]        |
| <b>3-6 Puissance frigorifique suffisante</b>   |            | ( )                      | ( )                      |     | [ ]        |
| <b>4- PROTECTION CONTRE LES ANIMAUX INDESIRABLES<br/>(INSECTES, OISEAUX, RONGEURS, CHATS,...)</b><br>- Dispositifs appropriés  |            |                          | ( )                      | ( ) | [ ]        |
| <b>5- OUTILS DE TRAVAIL ( TABLES DE DECOUPE,RECIPIENTS,<br/>BANDES TRANSPORTEUSES, COUTEAUX)</b><br>- En matériaux résistants à la corrosion<br>- Facile à nettoyer et à désinfecter                   |            | ( )<br>( )               | ( )<br>( )               | ( ) | [ ]        |

| Elément à inspecter  | Mi  | Ma  | G   | C   | Evaluation |
|--|-----|-----|-----|-----|------------|
| <b>6- ELIMINATION DE PRODUITS DE LA PECHE NON DESTINES POUR LA CONSOMMATION HUMAINE)</b>   |     |     |     |     |            |
| - Conteneurs à déchets étanches, en matériaux résistants à la corrosion  |     | ( ) |     |     |            |
| - Local pour entreposer ces conteneurs si ils ne sont pas évacués au moins à la fin de la journée                                  | ( ) | ( ) |     |     | [ ]        |
| <b>7- APPROVISIONNEMENT EN EAU (EAU POTABLE DIRECTIVE 80/778, OU EAU DE MER PROPRE DIRECTIVE 79/923)</b>                           |     |     |     |     |            |
| - Eau potable (EP) ou eau de mer propre (EMP) disponible   |     |     |     | ( ) |            |
| - Pression et volume suffisants  |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Distinction entre la couleur des tuyauteries de l'EP ou EMP et eau non potable   |     |     | ( ) | ( ) | [ ]        |
| <b>8- EAUX RESIDUAIRES</b>   |     |     |     |     |            |
| - Dispositif approprié pour évacuation hygiénique des eaux résiduaires   |     |     | ( ) | ( ) | [ ]        |
| <b>9-VESTIAIRES ET CABINETS D'AISANCE</b>  |     |     |     |     |            |
| - Nombre de vestiaires appropriés  |     | ( ) |     |     |            |
| - Vestiaires à murs et sols lisses et lavables   |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Nombre approprié de lavabos  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Nombre appropriés de cabinets d'aisance  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Cabinets d'aisance n'ouvrent pas directement sur les locaux de travail   |     | ( ) | ( ) | ( ) |            |
| - Lavabos pourvus de moyens de nettoyage et désinfection des mains   |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Essuie-mains à usage unique  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Robinets de lavabos non actionnés à la main  |     | ( ) | ( ) |     | [ ]        |
| <b>10- LOCAUX POUR SERVICE D'INSPECTION (SI QUANTITE TRAITEE NECESSITE PRESENCE D'INSPECTEUR REGULIERE OU PERMANENTE)</b>          |     |     |     |     |            |
| - Local aménagé et fermant à clé   | ( ) | ( ) |     |     |            |
| - A la disposition exclusive de l'inspection   |     | ( ) |     |     | [ ]        |
| <b>11- NETTOYAGE ET DÉSINFECTION DES MOYENS DE TRANSPORT</b>   |     |     |     |     |            |
| - Equipement appropriés ou nettoyage et désinfection réalisée dans structure agréée  |     | ( ) | ( ) |     | [ ]        |
| <b>12- INSTALLATION POUR PRODUITS DE LA PECHE VIVANTS</b>  |     |     |     |     |            |
| - permet de bonnes conditions de survie  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - alimentée en eau de qualité suffisante   |     |     |     | ( ) | [ ]        |
| <b>13- INSTALLATIONS DE CONGELATION ET D'ENTREPOSAGE</b>   |     |     |     |     |            |
| - Puissance frigorifique des congélateurs suffisante   |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Puissance frigorifique des entrepôts frigorifiques suffisante (T f -18°C en général ou T f -9°C si poissons congelés en saumure) |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Entrepôts munis de système d'enregistrement de la température facile à consulter   |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Partie thermosensible du thermomètre placée dans la zone où la température est la plus élevée                                    |     | ( ) | ( ) |     | [ ]        |
| <b>14- CAS DES CONSERVERIES</b>  |     |     |     |     |            |
| - Appareils de stérilisation approuvés   |     |     |     | ( ) |            |
| - Appareils de stérilisation munis de systèmes de vérification du traitement thermique   |     |     |     | ( ) |            |
| - Equipement disponible pour examen de serti   |     |     |     | ( ) | [ ]        |
| <b>15- CAS DES INSTALLATIONS DE FUMAGE</b>   |     |     |     |     |            |
| - Local pour fumage séparé ou emplacement particulier  |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Ventilation adéquate (en cas de besoin)  |     | ( ) | ( ) |     | [ ]        |
| <b>16- CAS DES INSTALLATIONS DE SALAGE</b>   |     |     |     |     |            |
| - local pour salage différent et écarté des aires où s'effectuent les autres opérations  |     |     | ( ) |     |            |
| - Cuves de saumurage construites de façon à éviter pollution pendant saumurage   |     | ( ) | ( ) |     | [ ]        |

**TABLEAU 2. FORMULAIRE I D'INSPECTION ET D'AUDIT DES INSTALLATIONS A TERRE  
EXIGENCES SANITAIRES RELATIVES AUX CONDITIONS D'HYGIENE ET D'EXPLOITATION**

**NOM DE L'USINE:**  
**DATE D'INSPECTION:**  
**NOM DE L'INSPECTEUR:**

**No D'AGREMENT:**  
**TYPE D'INSPECTION:**  
**NOM DU RESPONSABLE:**

**Gravité du défaut**

| Elément à inspecter  | Mi  | Ma  | G   | C   | Evaluation |
|--|-----|-----|-----|-----|------------|
| <b>1-CONDITIONS GENERALES D'HYGIENE</b>  |     |     |     |     |            |
| <b>1-1 Locaux et matériels</b>   |     |     | ( ) |     |            |
| - maintenus en bon état de propreté et d'entretien   |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Destruction des rongeurs, animaux et autre vermine systématiquement effectuée                                    |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Raticides, insecticides, désinfectants ou autre substance toxique entreposés dans local ou armoire fermant à clé |     |     |     | ( ) |            |
| - Pas de risque de contamination des produits par les raticides, insecticides,...                                  |     |     |     | ( ) |            |
| - Lieux de travail utilisé uniquement pour l'élaboration des produits, sauf autorisation de l'autorité compétente  | ( ) |     | ( ) |     |            |
| - Eau potable ou eau de mer propre utilisée pour tous les usages, sauf autrement indiqué                           |     |     |     | ( ) |            |
| - Détersifs et désinfectants agréés  |     |     |     | ( ) |            |
| -Locaux et matériels nettoyés et désinfectés une fois par journée de travail au moins                              |     |     |     | ( ) | [ ]        |
| <b>1-2 Hygiène du personnel</b>  |     |     |     |     |            |
| - Certificat médical pour toute personne affectée au travail et manipulation des produits                          |     |     |     | ( ) |            |
| - Personnel affecté à la manipulation et au travail des produits soumis à suivi médical                            |     |     |     | ( ) |            |
| -Interdiction à toute personne susceptible de contaminer le produit de le manipuler/travailler                     |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Port de vêtements de travail appropriés et propres   | ( ) |     | ( ) |     |            |
| - Cheveux complètement enveloppés de coiffure propre   | ( ) |     | ( ) |     |            |
| - Mains lavées à chaque reprise de travail   |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Blessures et plaies aux mains recouvertes de pansements étanches   |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Personnel respecte interdiction de fumer, boire, cracher et manger dans les locaux de travail et d'entreposage   |     |     | ( ) | ( ) | [ ]        |
| <b>2- FABRICATION ET UTILISATION DE LA GLACE</b>   |     |     |     |     |            |
| - Glace fabriquée à partir d'eau potable ou d'eau de mer propre  |     |     |     | ( ) |            |
| - Glace entreposée hygiéniquement dans conteneurs prévus à cet effet   |     |     | ( ) | ( ) |            |
| -Conteneurs à glace propres et bien entretenus   | ( ) |     | ( ) |     | [ ]        |
| <b>3- RECIPIENTS POUR PRODUITS FRAIS</b>   |     |     |     |     |            |
| - Protègent les produits contre contamination  |     | ( ) |     |     |            |
| - Conservent les produits de façon hygiénique  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Ecoulement facile d'eau de fusion  |     | ( ) |     |     |            |
| - Filetage et tranchage sans contamination ou souillure des filets   |     | ( ) | ( ) |     | [ ]        |
| <b>4- EVACUATION DES DECHETS</b>   |     |     |     |     |            |
| - Déchets évacués au moins une fois par journée  | ( ) | ( ) |     |     |            |
| - Conteneurs/local à déchets nettoyés et désinfectés après chaque utilisation                                      |     | ( ) |     |     |            |
| - Déchets entreposés ne sont pas une source de contamination ou nuisance pour établissement                        |     |     | ( ) |     | [ ]        |
| <b>5- PRODUITS FRAIS</b>   |     |     |     |     |            |
| - Produits réfrigérés non travaillés immédiatement sont glacés et réfrigérés                                       |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Produits glacés sont reglacés régulièrement  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Produits frais préemballés sont glacés ou réfrigérés mécaniquement   |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Étêtage et eviscération hygiéniques  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - poissons étêtés ou éviscérés bien lavés immédiatement à l'eau potable ou de mer propre                           |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Filetage et tranchage dans emplacement différent de celui pour étêtage et éviscération                           |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Filets et tranches ne séjournent pas longtemps   |     | ( ) |     |     |            |
| - Filets et tranches pour vente en frais rapidement réfrigérés   |     | ( ) |     |     |            |
| - Viscères et parties dangereuses pour le consommateur rapidement écartées du produit                              |     | ( ) |     |     | [ ]        |

| Element à inspecter   | Mi  | Ma  | G   | C   | Evaluation |
|---|-----|-----|-----|-----|------------|
| <b>6- ENTREPOSAGE DES PRODUITS CONGELES</b>   |     |     |     |     |            |
| -Température enregistrée sur thermographe   |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Enregistrements conservés au moins pendant la période de durabilité du produit  |     | ( ) | ( ) |     | [ ]        |
| <b>7- PRODUITS DECONGELES</b>   |     |     |     |     |            |
| - Produit décongelés de façon hygiénique  |     | ( ) |     |     |            |
| - Pas de risque de contamination pendant la décongélation   |     | ( ) |     |     |            |
| - Ecoulement efficace de l'eau de fusion  |     | ( ) |     |     |            |
| - Température des produits décongelés appropriée  |     | ( ) |     |     |            |
| - Identification appropriée des produits décongelés destinés à être mis sur le marché   |     |     | ( ) |     | [ ]        |
| <b>8- PRODUITS TRANSFORMES</b>  |     |     |     |     |            |
| - Traitement d'inhibition des germes pathogènes approuvé, notamment pour bivalves non vivants   |     |     |     | ( ) |            |
| - Traitements thermiques appliqués enregistrés  |     |     |     | ( ) |            |
| - Paramètres du produit (pH, sel, Aw) enregistrés   |     |     |     | ( ) |            |
| - Registres bien tenus et gardés pendant la période de conservation du produit au moins   |     |     |     | ( ) |            |
| - Emballages des produits salés, fumés, séchés, marinés (à durée de conservation limitée) sont identifiés conformément à directive 79/112/CEE |     |     | ( ) |     | [ ]        |
| <b>9- CONSERVES DE POISSON</b>  |     |     |     |     |            |
| - Traitement thermique approprié et approuvé  |     |     |     | ( ) |            |
| - Récipients stérilisés refroidis à l'eau potable   |     |     |     | ( ) |            |
| - Tests d'incubation (37°C, 7j ou 35°C, 10j) effectués régulièrement (chaque lot au moins)  |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Produits finis soumis à examen microbiologique régulièrement  |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Examens de serti réalisés régulièrement   |     |     |     | ( ) |            |
| - Contrôles réguliers pour s'assurer que les récipients ne sont pas endommagés  |     |     |     | ( ) |            |
| - Allotement approprié (récipients du même lot stérilisés de façon identique (dir 89/396/CEE)   |     |     |     | ( ) | [ ]        |
| <b>10- FUMAGE</b>   |     |     |     |     |            |
| - Matériaux utilisés pour la production de fumée entreposés à l'écart du lieu de fumage   |     | ( ) |     |     |            |
| - Production de fumée ne présent pas de risque de contamination des produits  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Production de fumée n'utilise pas bois peint, vernis, collé ou traité chimiquement  |     |     | ( ) | ( ) |            |
| - Produit fumé refroidi rapidement à sa température de conservation avant emballage   |     | ( ) |     |     | [ ]        |
| <b>11- SALAGE</b>   |     |     |     |     |            |
| - Sel propre et entreposé correctement  | ( ) | ( ) |     |     |            |
| - Le sel n'est pas réutilisé  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Cuves de saumurage et aires de salage nettoyées avant emploi  |     | ( ) | ( ) |     | [ ]        |
| <b>12- PRODUITS DE CRUSTACES ET DE MOLLUSQUES CUITS</b>   |     |     |     |     |            |
| - La cuisson est rapidement suivi d'un refroidissement jusqu'à température de la glace  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - L'eau de refroidissement est de l'eau potable ou de l'eau de mer propre   |     |     |     | ( ) |            |
| - Décortiquage et décoquillage hygiéniques  |     |     |     | ( ) |            |
| - Produits cuits rapidement congelés ou réfrigérés à température appropriée   |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - Produits cuits entreposés dans salles adéquates   | ( ) | ( ) |     |     |            |
| - Contrôles microbiologiques régulièrement effectués (Décision 93/25/CEE)   |     | ( ) |     |     | [ ]        |
| <b>13- PULPE DE POISSON (CH IV)</b>   |     |     |     |     |            |
| - Matières premières exemptes de viscères   | ( ) | ( ) |     |     |            |
| - Séparation mécanique est réalisée sans délai après filetage   | ( ) | ( ) |     |     |            |
| - Le poisson entier est eviscéré et lavé au préalable avant extraction de la pulpe  |     | ( ) |     |     |            |
| - Les machines d'extraction sont nettoyées au moins une fois toutes les 2 heures  |     | ( ) | ( ) |     |            |
| - La pulpe est immédiatement congelée ou stabilisée par une autre méthode   |     | ( ) | ( ) |     | [ ]        |

| Elément à inspecter  | Mi | Ma  | G   | C | Evaluation |
|--|----|-----|-----|---|------------|
| <b>14- CONDITIONS CONCERNANT LES PARASITES</b>   |    |     |     |   |            |
| - Poissons sont soumis à contrôle visuel pour rechercher et enlever parasites visibles   |    | ( ) |     |   |            |
| - Poissons ou parties de poissons manifestement parasités non commercialisés pour humains  |    | ( ) | ( ) |   |            |
| - Contrôle des parasites effectué selon décision 93/140/CEE  |    | ( ) |     |   |            |
| - Poissons à consommer crus ou hareng, sprat, maquereau, saumon sauvage fumés à froid (Tf 60°C) sont soumis à un traitement de congélation: Tf-20°C pendant 24h au moins |    | ( ) | ( ) |   |            |
| - Fabricant vérifie que ces poissons subissent ce traitement de congélation  |    | ( ) |     |   |            |
| - Poissons congelés ou débarassés de parasites sont accompagnés d'une attestation le spécifiant  |    | ( ) | ( ) |   | [ ]        |

**TABLEAU 3. CLASSIFICATION DES INSTALLATIONS A TERRE SELON LE DEGRE DE NON CONFORMITE**

| Catégorie de l'usine | Nombre de défauts Mi (Mineurs) | Nombre de défauts Ma (Majeurs) | Nombre de défauts G (Graves) | Nombre de défauts C (critiques) |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| A                    | 0 à 6                          | 0 à 5                          | 0                            | 0                               |
| B                    | 7 ou plus                      | 6 à 10                         | 1 à 2                        | 0                               |
| C                    | NA                             | 11 ou plus                     | 3 à 4                        | 0                               |
| D                    | NA                             | NA                             | 5 ou plus                    | 1 ou plus                       |

NA : non applicable dans ce cas

**TABLEAU 4 PLAN D'ECHANTILLONNAGE DE POISSONS POUR L'EVALUATION DE LA FRAICHEUR AU DEBARQUEMENT OU LORS DE LA PREMIERE VENTE**

| Quantité destinée à être mise en vente (tonnes) | Poids minimal de l'échantillon (kg) |
|---|-------------------------------------|
| au dessous de 5                                 | 8                                   |
| 5 à 15 exclu                                    | 20                                  |
| 15 à 40 exclu                                   | 40                                  |
| 40 à 60 exclu                                   | 60                                  |
| 60 à 80 exclu                                   | 80                                  |
| 80 à 100 exclu                                  | 100                                 |
| 100 et plus                                     | 120*                                |

\* Pour autant que le poids de l'échantillon soit supérieure à 0,08% de toute quantité supérieure à 120 tonnes.

Dans le cadre de la mise en place des auto-contrôles dans les installations à terre, il est recommandé aux responsables contrôle de la qualité des installations agréées d'utiliser le plan d'échantillonnage du tableau 5

**TABLEAU 5 PLAN D'ECHANTILLONNAGE POUR L'ANALYSE DE LA FRAICHEUR DU POISSON, CRUSTACES ET MOLLUSQUES A LA RECEPTION A L'USINE**

| Nombre de poissons dans le lot (N) | Nombre de poissons dans l'échantillon (n) | Nombre de défectueux (c) limite pour accepter le lot |
|------------------------------------|---|--|
| 2 à 15                             | 2   | 0  |
| 16 à 25                            | 3   | 0  |
| 26 à 90                            | 5   | 0  |
| 91 à 150                           | 8   | 1  |
| 151 à 500                          | 13  | 1  |
| 501 à 1200                         | 20  | 2  |
| 1201 à 10000                       | 32  | 3  |
| 10001 à 35000                      | 50  | 5  |
| 35001 à 500000                     | 80  | 7  |
| 500001 et plus                     | 125                                       | 10   |

Pour évaluer le nombre de poissons dans un lot, il faut prélever de façon aléatoire au moins dix poissons, mesurer leur poids et déterminer le poids moyen d'un poisson. Le nombre de poisson dans le lot est le poids du lot divisé par le poids moyen d'un poisson.

#### 4-2 Echantillonnage pour le contrôle du taux d'histamine et de mercure

Des échantillons de thon (matière première) sont prélevés à bord des bateaux avant débarquement pour l'analyse de l'histamine et de mercure. Pour les bateaux pourvus de moins de 9 cuves glacières ou de congélation à la saumure, un poisson est prélevé par cuve. Pour les autres bateaux (avec 9 cuves ou plus), au minimum 9 poissons sont prélevés. Les dosages de l'histamine et du mercure se font séparément sur tous les poissons prélevés.

Concernant les conserves de poisson (thon et sardines), la recherche de l'histamine et du mercure se fait en prélevant 9 échantillons/lot de fabrication.

Dans le cas de l'analyse du mercure, le BPCCH prévoit d'adopter le plan d'échantillonnage préconisé par la décision 93/351/CEE. Celui-ci préconise de prélever 10 échantillons (de poisson frais ou congelé) sur 10 individus différents de requins (toutes espèces), thon (*Thunus spp.*), thonine (*Euthynus spp.*), bonite (*Sarda spp.*), palomète (*Ocynopsis unicolor*), espadon (*Xiphias gladius*), voilier (*Istiophorous platypterus*), marlin (*Makaira spp.*), anguille (*Anguilla spp.*), bar (*Dicentrarchus labrax*), esturgeon (*Acipenser spp.*), flétan (*Hipoglossus hypoglossus*), sébastes (*Sébastes marinus*, *S. mentella*), lingue bleu (*Moltea dipterygia*), loup (*Anarhicas lupus*), brochet (*Esox lucius*), niger princeps (*Centroscymnes coclolepis*), raies (*Raja spp.*), sabres (*Lepidopus caudatus*, *Aphanopus carbo*), baudroie (*Lophius spp.*). Pour les autres espèces de poisson, il faut prélever 5 échantillons sur 5 individus différents. L'analyse est effectuée sur le mélange des échantillons finement homogénéisé pour obtenir la teneur moyenne en mercure.

Toutefois, la DOPM a démarré un programme de surveillance de la pollution du milieu par les métaux lourds. Les résultats obtenus lors de ce programme serviront à adapter les plans d'échantillonnage pour l'analyse du mercure.

#### 4-3 Echantillonnage pour le contrôle microbiologique

Pour les produits de la pêche congelés et emballés, les analyses microbiologiques sont effectuées sur 5 boîtes prélevées par lot.

Des analyses microbiologiques de l'eau et de la glace sont effectuées régulièrement au niveau des installations à terre. A cet effet, les agents du BPOCH prélèvent aseptiquement environ 5 litres d'eau. Si l'eau est chlorée, l'échantillon est mélangé à du thiosulfate de sodium stérile à raison de 0,1 ml/100 ml d'eau pour que le chlore résiduel n'interfère pas avec la revivification des germes.

#### 4-4 Echantillonnage des conserves de poisson en vue de l'évaluation de la stérilité commerciale

Les conserveurs sont tenus de faire le test de la stabilité des conserves de poisson sur 5 boîtes par lot qui sont incubées à 37°C pendant 7 jours et 5 boîtes par lot qui sont incubées à 55°C pendant 7 jours. En cas de suspicion, la réglementation sénégalaise prévoit de prélever un nombre de boîtes équivalent à 5% du lot, avec un minimum de 7 boîtes par lot en vue d'investiguer plus profondément la stérilité commerciale ou la cause de défaut.

Toutefois, conscient du fait que les traitements de stérilisation des conserves de poisson sont conçus pour permettre un taux de défectueux (non stérile) très bas (de l'ordre de  $10^{-9}$ ), et que même 5 échantillons restent insuffisants pour avoir une probabilité acceptable de détecter des problèmes de non stérilité, le BPOCH prévoit de renforcer la mise en place des auto-contrôles dans les conserveries, notamment l'enregistrement de la stérilisation sur des thermographes pour démontrer que le lot en question a subi un traitement thermique adéquat selon un barème de stérilisation préalablement approuvé par l'autorité compétente.

#### 4-5 Echantillonnage pour l'évaluation de la qualité marchande, du poids, étiquetage du produit fini emballé.

La qualité du produit fini congelé ou en conserves fait l'objet d'une évaluation pour s'assurer de sa conformité par rapport à des normes de qualité relatives à la couleur, texture, odeur,... Il n'existe pas actuellement de plan d'échantillonnage défini dans ce but, toutefois, le BPOCH prévoit d'adopter le plan d'échantillonnage CAC-RM 42-1969 préconisé par le *Codex Alimentarius* (tableaux 6 et 7). Ce dernier fait appel à un niveau de qualité acceptable (NQA) = 6,5.

**TABLEAU 6. PLAN D'ECHANTILLONNAGE I.  
(NIVEAU D'INSPECTION I, NQA = 6,5)**

**CAS DE CONTENEURS DE POIDS NET EGAL OU INFERIEUR à 1 KG**

| Nombre N de conteneurs/lot | taille de l'échantillon<br>(n) | critère d'acceptation<br>(c) |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 4800 ou moins              | 6                              | 1                            |
| 4801 à 24000               | 13                             | 2                            |
| 24001 à 48000              | 21                             | 3                            |
| 48001 à 84000              | 29                             | 4                            |
| 84001 à 144000             | 48                             | 6                            |
| 144001 à 240000            | 84                             | 9                            |
| plus de 240000             | 126                            | 13                           |

**POIDS NET SUPERIEUR à 1 KG MAIS INFERIEUR A 4,5 KG**

| nombre N de conteneurs par lot | taille de l'échantillon<br>(n) | critère d'acceptation<br>(c) |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 2400 ou moins                  | 6                              | 1                            |
| 2401 à 15000                   | 13                             | 2                            |
| 15001 à 24000                  | 21                             | 3                            |
| 24001 à 42000                  | 29                             | 4                            |
| 42001 à 72000                  | 48                             | 6                            |
| 72001 à 120000                 | 84                             | 9                            |
| plus de 120000                 | 126                            | 13                           |

**POIDS NET SUPERIEUR A 4,5 KG**

| nombre N de conteneurs par lot | taille de l'échantillon<br>(n) | critère d'acceptation<br>(c) |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 600 ou moins                   | 6                              | 1                            |
| 601 à 2000                     | 13                             | 2                            |
| 2001 à 7200                    | 21                             | 3                            |
| 7201 à 15000                   | 29                             | 4                            |
| 15001 à 24000                  | 48                             | 6                            |
| 24001 à 42000                  | 84                             | 9                            |
| plus de 42000                  | 126                            | 13                           |

Le plan d'échantillonnage du tableau 6 est utilisé lors d'une première inspection, alors que celui du tableau 7 est utilisé pour une ré-inspection. Cette dernière est entreprise dans le cas d'un résultat d'inspection marginal ou dans le cas d'un litige.

**TABLEAU 7. PLAN D'ECHANTILLONNAGE II.  
(NIVEAU D'INSPECTION II, NQA = 6,5)**

**CAS DE CONTENEURS DE POIDS NET EGAL OU INFERIEUR à 1 KG**

| Nombre N de conteneurs/lot | aille de l'échantillon<br>(n) | critère d'acceptation<br>(c) |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 4800 ou plus               | 13                            | 2                            |
| 4801 à 24000               | 21                            | 3                            |
| 24001 à 48000              | 29                            | 4                            |
| 48001 à 84000              | 48                            | 6                            |
| 84001 à 144000             | 84                            | 9                            |
| 144001 à 240000            | 126                           | 13                           |
| plus de 240000             | 200                           | 19                           |

**POIDS NET SUPERIEUR à 1 KG MAIS INFERIEUR A 4,5 KG**

| Nombre N de conteneurs/lot | aille de l'échantillon<br>(n) | critère d'acceptation<br>(c) |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 2400 ou moins              | 13                            | 2                            |
| 2401 à 15000               | 21                            | 3                            |
| 15001 à 24000              | 29                            | 4                            |
| 24001 à 42000              | 48                            | 6                            |
| 42001 à 72000              | 84                            | 9                            |
| 72001 à 120000             | 126                           | 13                           |
| plus de 120000             | 200                           | 19                           |

**POIDS NET SUPERIEUR A 4,5 KG**

| Nombre N de conteneurs/lot | aille de l'échantillon<br>(n) | critère d'acceptation<br>(c) |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 600 ou moins               | 13                            | 2                            |
| 601 à 2000                 | 21                            | 3                            |
| 2001 à 7200                | 29                            | 4                            |
| 7201 à 15000               | 48                            | 6                            |
| 15001 à 24000              | 84                            | 9                            |
| 24001 à 42000              | 126                           | 13                           |
| plus de 42000              | 200                           | 19                           |

## 5-Analyse de la fraîcheur

Le BCPH procède au prélèvement d'échantillons pour l'évaluation de la fraîcheur de poissons, crevettes et céphalopodes.

La fraîcheur du poisson est évaluée par les agents du BCPH en utilisant la grille du tableau 8, alors que la fraîcheur des céphalopodes est estimée en utilisant la grille du tableau 9.

**TABLEAU 8. EVALUATION DE LA FRAÎCHEUR DU POISSON**

| CATEGORIE DE FRAÎCHEUR                       |   |   |   |   |
|--|---|---|---|---|
|  | Extra   | A   | B   | Non admis   |
| <b>1-Aspect</b>                              |   |   |   |   |
| 1.1 Peau                                     | Pigmentation vive et chatoyante, pas de décoloration<br>Mucus aqueux, transparent               | Pigmentation vive mais sans lustre<br><br>Mucus légèrement trouble                    | Pigmentation en voie de décoloration et ternie<br><br>Mucus opaque                      | Pigmentation terne<br><br>Mucus laiteux                                       |
| 1.2 Oeil                                     | Convexe (bombé)<br><br>Cornée transparente<br><br>Pupille noire, brillante                      | Convexe légèrement affaissé<br>Cornée légèrement opalescente<br>Pupille noire, ternie | Plat<br><br>Cornée opalescente<br><br>Pupille opaque                                    | Concave au centre *<br><br>Cornée laiteuse<br><br>Pupille grise               |
| 1.3 Branchies                                | Couleur brillante,<br>Pas de mucus  | Moins coloré, traces légères de mucus clair   | Mucus opaque  | Mucus laiteux   |
| 1.4 Chair (coupure dans l'abdomen)           | Bleuâtre, translucide, lisse, brillante<br>Sans aucun changement de coloration originale        | Veloutée, cireuse, feutrée<br><br>Couleur légèrement modifiée                         | Légèrement opaque   | Opaque *  |
| 1.5 Couleur le long de la colonne vertébrale | Pas de coloration   | Légèrement rose   | Rose  | Rouge *   |
| 1.6 Organes                                  | Reins et résidus d'autres organes rouge-brillants, de même que le sang à l'intérieur de l'aorte | Reins et résidus d'autres organes rouge mat, sang se décolorant                       | Reins et résidus d'autres organes et sang rouges pâles                                  | Reins, résidus d'autres organes et sang brunâtres *                           |
| <b>2-ETAT</b>                                |   |   |   |   |
| 2.1 Chair                                    | Ferme et élastique<br><br>Surface lisse   | Elasticité diminuée   | Légèrement flasque (molle), élasticité diminuée<br>Surface cireuse (veloutée) et ternie | Molle (flasque) *<br><br>Ecailles se détachant de la peau, surface granuleuse |
| 2.2 Colonne vertébrale                       | Se brise au lieu de se détacher   | Adhérente   | Peu adhérente   | Non adhérente *   |
| 2.3 Péritoine                                | Adhérent totalement à la chair  | Adhérent  | Peu adhérent  | Non adhérent *  |
| <b>3- ODEUR</b>                              |   |   |   |   |
| 3.1 Branchies, peau, cavité abdominale       | Algue marine  | Ni d'algue, ni mauvaise   | Légèrement putride, aigre   | Putride, aigre *  |

\*: Ou un stade d'altération plus avancé.

Pour les crevettes, il n'existe pas encore de grille de cotation codifiée. Les agents considèrent les crevettes acceptables si elles ont un oeil brillant, des muscles et ligaments résistants (l'animal étant soulevé par le thorax, les membres restent fermes et rigides), des membranes intersegmentaires et articulaires brillantes, transparentes et résistantes, des organes thoraciques fermes et résistants et par l'absence d'odeur d'altération apparentes au niveau de la bouche. De plus, les crevettes de bonne qualité sont fermes et glissent entre les mains à la façon des grains d'avoine.

**TABLEAU 9. EVALUATION DE LA FRAÎCHEUR DES CEPHALOPODES**

|             | Aspect   | Odeur   |
|-------------|--|---|
| Catégorie 5 | Peau de couleur brun rouge, luisante<br>Chair de couleur blanc cassé, légèrement brillante<br>Surface lisse et ferme, lustrée  | Agréable d'eau de mer ou légèrement d'algues marines                              |
| Catégorie 4 | Peau de couleur brune<br>Chair de couleur crémeuse à jaunâtre, sans brillance<br>Surface moins lisse, légère perte du lustre   | Perte d'odeur caractéristique et apparition d'une très légère odeur de choux cuit |
| Catégorie 3 | Peau de couleur grise délavée<br>Chair de couleur jaune à marron clair, peu lustrée<br>Surface externe légèrement croûteuse et meurtrie<br>Surface interne légèrement crayeuse et aspect de lait caillé  | Odeur de choux cuit plus forte et léger relent de moisi                           |
| Catégorie 2 | Peau décolorée, apparition de quelques taches roses<br>Chair de couleur marron clair à marron foncé, tene<br>Surface externe moyennement croûteuse et meurtrie<br>Surface interne crayeuse et granuleuse | Odeur déplaisante légèrement ammoniacale, moisie, relent fétide légèrement aigre. |
| Catégorie 1 | Peau partant en lambeaux avec des taches rosâtres<br>Chair de couleur brun-rosâtre, tachée et croûteuse<br>Surface externe croûteuse et très abimée<br>Surface interne très crayeuse et très granuleuse  | Putride, ammoniacale, très moisie, très fétide, aigre, repoussante, inacceptable  |

## 6- Méthodes chimiques d'analyse des produits de la pêche

Les tests chimiques viennent confirmer et compléter les analyses sensorielles et microbiologiques. Ils portent sur l'analyse de l'azote basique volatile total (ABVT), du mercure, de l'histamine et des résidus de SO<sub>2</sub>. Nous décrivons ci-après les méthodes chimiques d'analyse utilisées au laboratoire de l'Ecole Nationale Supérieure de Technologie (ENSUT) de Dakar agréée par la DOPM.

### 6-1 Détermination de l'azote basique volatile total

6-1-1 Dosage de l'ABVT par distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide trichloroacétique.

Le dosage de l'azote basique volatile total (ABVT) permet de déterminer la teneur totale en azote des bases azotées volatiles (ammoniac, triméthylamine,...) résultant de la

dégradation des composés azotés du poisson lors de l'altération. La méthode utilisée par l'ENSUT (laboratoire agréé par la DOPM) est la distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide trichloroacétique.

### • Principe du dosage

Après déprotéinisation d'un échantillon de muscle par l'acide trichloroacétique, on procède à sa distillation à la vapeur puis à une neutralisation du distillat à l'acide sulfurique.

### • Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. Les solutions sont préparées dans l'eau distillée ou déminéralisée. Les réactifs à préparer sont :

- Acide trichloroacétique (ATC) à 7,5% : dissoudre 75g d'ATC dans 750 ml d'eau. Agiter, puis compléter à 1000 ml avec l'eau.

- Acide sulfurique 0,1 N.

- Acide borique à 40% : dissoudre 20g d'acide borique dans 500 ml d'eau, chauffer jusqu'à complète dissolution. Après refroidissement, compléter à 500 ml avec de l'eau. Ajouter 2 ml d'une solution de rouge de méthyle-vert de bromocrésol préparé en mélangeant une partie de méthyle alcoolique à 0,2% avec 5 parties de vert de bromocrésol alcoolique à 0,2% .

- Solution de soude à 10% : ajouter à 300 ml de NaOH à 30% ( $d = 1,33$ ), 600 ml d'eau.

### • Appareillage

Il faut disposer du matériel suivant :

- balance de précision au décigramme,
- hachoir à viande pour hacher l'échantillon de poisson,
- mixeur à grande vitesse (8000 à 45000 tours/min),
- centrifugeuse atteignant 3000 tours/min,
- entonnoir de Buchner et flacons d'aspiration,
- appareil de distillation à la vapeur de type Kjeldahl (exemple Buchi 320 ou Vapodest de Gerharolt),
- microburette de 10 ml graduée à 0,01 ml avec réservoir,
- bécher gradué de 50 ml,
- flacon d'erlenmeyer de 300 ml,
- pipettes de 5 ml, 10 ml et 25 ml,
- agitateur magnétique à barreau aimanté.

### • Préparation des échantillons

Peser  $100g \pm 0,1g$  de chair de poisson, crustacé ou mollusque, l'introduire dans un godet de centrifugation et ajouter 200 ml de solution d'acide trichloroacétique à 7,5% . Bien homogénéiser dans le mixeur et centrifuger pendant 5 min à 2000 tours/min. Ecrémer la partie supérieure ressemblant à du lait caillé et filtrer sur papier filtre Whatman n°3 à travers

un entonnoir Buchner. Transférer le filtrat dans un flacon erlenmeyer de 300 ml muni d'un bouchon conique standard.

### • Distillation à la vapeur

L'appareil de distillation de type Kjeldahl utilise un générateur de vapeur par chauffage électrique sans électrolyte, complété par un système de vidange automatique de l'ampoule de décantation, les résidus étant évacués par l'intermédiaire d'un siphon dans la décharge de l'eau de refroidissement.

A l'aide d'une pipette, porter 10 ml de la solution d'acide borique dans le bécher gradué et placer ce dernier sur le support de l'appareil sous l'extrémité du condenseur.

Porter 25 ml du filtrat recueilli à la fin de la préparation de l'échantillon dans l'ampoule de distillation. Pour ce faire, utiliser une pipette de 25 ml à écoulement total et verser dans l'entonnoir communiquant avec l'ampoule. Rincer la pipette avec 2 à 3 ml d'eau distillée que l'on porte également dans l'ampoule à distillation.

Avec une pipette graduée de 10 ml, ajouter exactement 6 ml d'une solution de soude à 10%, rincer la pipette avec 2-3 ml d'eau comme ci-dessus et introduire dans l'ampoule à distillation.

Mettre en marche le système de chauffage en tournant le robinet à 3 voies mettant en route le système électrique de génération de vapeur et la vidange. Régler, au moyen du support pivotant, la hauteur du bécher contenant la solution d'acide borique afin que l'extrémité inférieure du condenseur soit au dessous de la surface du liquide.

Continuer la distillation jusqu'à ce que le niveau du liquide dans le bécher gradué arrive au niveau de 50 ml, arrêter alors le chauffage et enlever le bécher.

### • Titrage

Placer le bécher sur l'agitateur magnétique après y avoir introduit un barreau aimanté et titrer le distillat avec l'acide sulfurique à 0,1N ajouté jusqu'à complète décoloration en utilisant la microburette gradué à 0,01N.

Réaliser un essai à blanc en plaçant 25 ml de solution d'acide trichloroacétique à 7,5% dans l'ampoule de distillation de l'appareil, ajouter 6 ml de soude à 10 ml d'acide borique ; recueillir 40 ml de distillat et titrer avec l'acide sulfurique 0,1N comme pour l'échantillon.

### • Expression des résultats

$$\text{La teneur en ABVT (exprimée en mg - N/100g d'échantillon)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 1,4 \times 300}{25}$$

$V_1$  = volume d'acide sulfurique 0,1N nécessaire pour neutraliser le distillat de l'échantillon.

$V_0$  = volume d'acide sulfurique 0,1N nécessaire pour neutraliser le distillat du blanc.

- **Rinçage de l'appareil de distillation**

Après la distillation, on peut effectuer le lavage rapide de l'appareil en utilisant le vide induit par le refroidissement à son intérieur.

Aussitôt la distillation terminée, on coupe le chauffage. Tout le liquide se trouvant dans l'ampoule de distillation va siphonner dans la chambre extérieure et sera rejeté avec les eaux de refroidissement.

Verser deux fois 50 ml d'eau distillée dans l'ampoule à distiller pour rincer celle-ci, en effectuant deux siphonnages successifs. Puis placer 50 ml d'eau distillée dans l'ampoule de distillation et mettre le générateur de vapeur en marche. On distille toutes les substances volatiles restant dans l'appareil.

La durée de ces diverses opérations est de 12 minutes environ et l'appareil est alors disponible pour une autre manipulation.

6-1-2 Dosage de l'ABVT par distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide perchlorique.

La méthode de dosage de l'ABVT proposée par la commission de l'Union européenne est la méthode de distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide perchlorique (Décision 951/149/CE du 8 mars 1995 fixant les valeurs limites en ABVT pour certaines catégories de produits de la pêche et les méthodes d'analyse à utiliser).

- **Objet et champ d'application**

La présente méthode décrit une procédure de référence permettant d'identifier la teneur en ABVT chez les poissons et les produits à base de poisson. Cette procédure s'applique aux teneurs en ABVT comprises entre 5 mg/100 g et au moins 100 mg/100 g.

- **Brève description**

Les bases volatiles azotées sont extraites d'un échantillon à l'aide d'une solution d'acide perchlorique 0,6. Après alcalinisation, l'extrait est soumis à une distillation par la vapeur et les constituants basiques volatils sont absorbés par un récepteur acide la teneur en ABVT est déterminée par titrage de bases absorbées.

- **Réactifs**

Seuls les réactifs pour analyses sont utilisés. Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau distillée ou de l'eau déminéralisée. Les réactifs nécessaires sont:

- solution d'acide perchlorique à 6 mg/100 ml (attention, l'acide perchlorique est très corrosif et doit être manipulé avec précaution),
- solution de soude caustique à 20 mg/100 ml,

- solution étalon d'acide chlorhydrique 0,05 N, ou 0,01 N si on utilise un appareil de distillation automatique,
- solution d'acide borique à 3 g/1000 ml,
- agent anti-moussant à base de silicone,
- solution de phénolphtaléine à 1 g/100 ml d'éthanol à 95%,
- solution d'indicateur de Tashiro préparée en dissolvant 2 g de rouge de méthyl et 1 g de bleu de méthylène dans 1000 ml d'éthanol à 95%.

- **Instruments et accessoires**

Il faut disposer du matériel suivant:

- un hachoir à viande pour hacher l'échantillon de poisson,
- un mélangeur à grande vitesse (entre 8000 et 45000 révolutions/minute),
- un système de filtration rapide avec des filtres plissés de diamètre 150 mm,
- une burette de 5 ml graduée en 0,01 ml,
- un appareil de distillation à la vapeur qui soit capable de régler différents débits de vapeur, ainsi qu'un débit constant sur une période de temps donnée. Il ne doit pas permettre la perte des bases volatiles pendant l'addition de substances alcalinisantes.

- **Préparation de l'échantillon:** Hacher un échantillon de poisson représentatif, en prélever 10 g  $\pm$  0,1 g et les ajouter à 90,0 ml d'acide perchlorique à 6 mg/100 ml. Le mélange est homogénéisé dans un mélangeur pendant 2 minutes puis filtré. Cet extrait peut être gardé pendant 7 jours à une température entre 2°C et 6°C.

- **Distillation à la vapeur:** 50,0 ml de l'extrait sont placés dans l'appareil de distillation. On ajoute plusieurs gouttes de la solution de phénolphtaléine (pour vérifier l'alcalinisation de l'extrait par la suite), quelques gouttes d'agent anti-moussant et 6,5 ml de soude à 20 g/100 ml et on commence la distillation.

Le débit de vapeur est réglé de façon à obtenir 100 ml de distillat au bout de 10 minutes. Le tube de sortie du distillat est immergé dans un récipient contenant 100 ml d'acide borique à 3 g/1000 ml et 3 à 5 gouttes d'indicateur de Tashiro. Après 10 minutes exactement, on arrête la distillation et on enlève le tube de sortie du distillat du récipient avant de le laver à l'eau. Les bases volatiles contenues dans la solution d'acide borique sont titrées par une solution étalon d'acide chlorhydrique 0,05 N. Le pH de virage doit être de 5,0  $\pm$  0,1.

L'analyse doit se faire en double et la méthode est jugée correcte si la différence entre deux déterminations ne dépasse pas 2 mg/100 g.

Il faut réaliser un essai à blanc en utilisant 50 ml d'acide perchlorique à 6 g/100 ml au lieu de l'extrait.

$$\text{La teneur en ABVT (mg/100 g d'échantillon)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 0,14 \times 2 \times 100}{M}$$

$V_1$  = volume d'acide chlorhydrique 0,01 nécessaire pour neutraliser le distillat de l'échantillon,

$V_0$  = volume d'acide chlorhydrique nécessaire pour neutraliser le distillat du blanc

M = poids de l'échantillon en g.

- **Remarques:**

- Les analyses doivent être effectuées en double. La détermination entre deux analyses sur le même échantillon ne doit pas dépasser 2 mg/100 g.

- L'appareillage doit être vérifié régulièrement en distillant une solution de  $NH_4Cl$  équivalente à 50 mg d'ABVT/ 100 g.

- L'écart-type de reproductibilité est = 1,20 mg/100 g.

- L'écart-type de comparabilité = 2,5 mg/100g.

- La Commission de l'Union européenne recommande aux laboratoires officiels l'utilisation en routine de la méthode de référence décrite ci-dessus. Toutefois, les méthodes de routine utilisables pour le contrôle de la limite de l'ABVT sont la méthode par microdiffusion de Conway et Byrne (1933), la méthode de distillation directe d'Antanacopoulos (1968), la méthode de distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide trichloroacétique préconisée par le *Codex Alimentarius* (1968).

- **Interprétation des résultats**

la Commission de l'Union européenne préconise que les produits de la pêche non transformés doivent être considérés impropres à la consommation humaine lorsque les limites suivantes en ABVT sont atteintes ou dépassées:

- 25 mg d'azote/ 100 g de chair des espèces *Sebastes sp.*, *Helicolenus dactylopterus*, *Sebastichthys capensis*,

- 30 mg d'azote/100 g de chair des espèces appartenant à la famille des Pleuronectidae (à l'exception du flétan : *Hypoglossus spp*).

- 35 mg d'azote/100 g de chair des espèces *Salmo salar*, ou appartenant à la famille des Merlucciidae et à la famille des Gadidae.

## 6-2 Détermination de la triméthylamine.

La triméthylamine (TMA) résulte de la réduction de l'oxyde de triméthylamine, constituant caractéristique qui se rencontre uniquement dans les produits halieutiques, notamment marins. La détermination de la TMA se fait selon la méthode de distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide trichloroacétique décrite ci-dessus. On prend préalablement soin de complexer l'ammoniaque avec une solution à 10% de formol neutre en excès, et ce après distillation et avant dosage final. La solution de formol est préparée en ajoutant 10 g de  $MgCO_3$  à 100 ml de solution de formaldéhyde à 35%. Le mélange est bien agité pour neutraliser l'acidité du formaldéhyde puis filtré et dilué avec 3 fois son volume d'eau. Avant

chaque détermination, il faut ajouter environ 25 ml de la solution de formol ainsi préparée. Le dosage et les calculs se font comme pour l'ABVT et les résultats sont exprimés en mg N-TMA/100 g d'échantillon.

En général, on considère un poisson impropre à la consommation si la teneur en N-TMA dépasse 10 à 15 mg/100 g.

Dans le cadre de la mise en place des auto-contrôles dans les installations à terre, la teneur en triméthylamine peut être déterminée de façon routinière en utilisant la méthode de microdiffusion de Byrne (1933).

### 6-3 Détermination de l'histamine

Le dosage de l'histamine en utilisant la méthode spectrofluorimétrique de Lerke et Bell (1978). Toutefois, l'équipement de acquis par l'ENSUT amènerait le BCPH à adopter cette méthode (décrite plus loin) de dosage de l'histamine en conformité avec la recommandation de La directive 91/493/CEE.

#### 6-3-1 Méthode spectrofluorimétrique de Lerke et Bell (1978).

- **Objet et domaine d'application:** Cette méthode de dosage de l'histamine est applicable à tous les produits de la pêche quelque soit leur mode de présentation ou de préparation.
- **Principe de la méthode:** Extraction de l'histamine par une solution d'acide trichloroacétique puis fixation sur une colonne remplie de résine échangeuse d'ions et élution par l'acide chlorhydrique. Dosage par fluorimétrie après addition d'ortho-phtalaldéhyde (OPA).
- **Réactifs:** Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau déminéralisée. Les réactifs à préparer sont:
  - solution d'acide trichloroacétique à 10 g/100 ml,
  - tampon acétate 0,2 N préparé en dissolvant 8,05 g d'acétate de sodium anhydre dans quelques ml d'eau, puis en ajoutant 5,9 ml d'acide acétique cristallisable et en complétant à un litre avec de l'eau. Le pH est ajusté à 4,62,
  - solution d'acide chlorhydrique 0,2 N,
  - solution d'acide chlorhydrique 0,7 N,
  - solution d'hydroxyde de sodium 1 N,
  - solution d'O-phtalaldéhyde (OPA) à 1 g/100 ml d'alcool méthylique,
  - solution mère d'histamine à 1 g/ 1000 ml préparée en dissolvant 0,1656 g de chlorhydrate d'histamine dans 100 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N,
  - solution étalon d'histamine à 0,02 g/1000 ml préparée en introduisant 2 ml de la solution d'histamine à 1 g/1000 ml dans une fiole jaugée de 100 ml et en complétant avec de l'acide trichloroacétique à 10 g/100 ml. Cette solution est stable plusieurs semaines au réfrigérateur,
  - résine Amberlite CG 50 type 1: 75 à 150 microns, 100 à 200 mesh.

- **Appareillage:**

- colonnes de verre de 150 x 9 mm (d.i) munies d'un robinet et d'un réservoir de 250 ml,

- spectrofluorimètre,
  - pH-mètre au centième,
  - hachoir à viande pour hacher l'échantillon de poisson,
  - mixeur à grande vitesse (entre 8000 et 45000 révolutions/minute),
  - système de filtration rapide avec des filtres de diamètre 150 mm,

- **Préparation de l'échantillon:** Hacher un échantillon de poisson représentatif, en prélever  $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  et les ajouter à 90,0 ml d'acide trichloroacétique à 10 g/100 ml. Homogénéiser le mélange dans un mixeur pendant 2 minutes puis filtrer. Cet extrait peut être gardé pendant 7 jours à une température entre 2°C et 6°C.

- **Préparation de la résine échangeuse de cations:** mettre en suspension 3 g de résine (Amberlite CG 50) dans la quantité nécessaire et suffisante de tampon acétate pour maintenir le pH à 4,62. Transférer dans la colonne. La hauteur de la résine doit être de 50 mm.

- **Séparation de l'histamine:** Dans un bécher, placer 20 ml de tampon acétate et ajouter 0,2 ml d'extrait trichloroacétique. Transférer sur la colonne puis rincer le bécher avec 30 ml de tampon acétate. Faire écouler le liquide. Laver la colonne avec 100 ml de tampon acétate. Eliminer les solutions de lavage. Eluer l'histamine de la colonne avec 18 ml d'acide chlorhydrique 0,2 N et recueillir l'éluat dans une fiole jaugée de 20 ml puis compléter avec de l'eau. Traiter dans les mêmes conditions 0,2 ml de la solution étalon.

- **Détermination de l'histamine:** Transférer 2 ml de l'éluat dans un tube et ajouter dans l'ordre et en agitant après chaque addition : 1 ml d'hydroxyde de sodium 1 N et 0,1 ml d'OPA à 1 g/100 ml. Après exactement 3,5 minutes, ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique 0,7 N. Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions en remplaçant les 2 ml de l'éluat par 2 ml d'eau. Mesurer la fluorescence à des longueurs d'onde d'émission et d'excitation respectives de 450 nm et 360 nm.

- **Expression des résultats:** La lecture de la fluorescence de la solution étalon correspond à 0,4 mg d'histamine dans le tube de mesure. Les résultats sont exprimés en mg d'histamine /kg de poisson (ou ppm).

- **Caractéristiques de la méthode:** Le domaine de linéarité de cette méthode est compris entre la limite inférieure de détection (0,3 ppm) et 30 ppm (équivalent à 0,6 mg d'histamine dans le tube de détermination). La capacité d'échange maximale de la résine est élevée, équivalente à 7740 ppm. Le taux de récupération de la méthode est <sup>3</sup> 96%, mais le complexe O-phtalaldéhyde-histamine est stable pendant seulement 30 à 45 minutes.

### 6-3-2 Détermination de l'histamine par chromatographie liquide haute performance

La méthode HPLC à elution isocratique décrite ci-après est recommandée par une étude européenne pour le dosage de l'histamine.

- **Objet et domaine d'application:** Cette méthode de dosage de l'histamine est applicable à tous les produits de la pêche quelque soit leur mode de présentation ou de préparation.

- **Principe de la méthode:** Extraction de l'histamine par une solution d'acide trichloroacétique, puis dérivation par l'O-phtalaldehyde (OPA) et séparation par chromatographie liquide à phase inversée utilisant l'acétonitrile et le phosphate monosodique comme phase mobile. Le dosage de l'histamine ainsi séparée se fait par fluorimétrie.

- **Réactifs:** Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau déminéralisée. Les réactifs à préparer sont:

- solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 g/100 ml,
- phase mobile: 40% acétonitrile/ 60% de tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (2,5 mM)
- solution d'hydroxyde de sodium 1 N,
- Solution de HCl 3 N,
- solution d'O-phtalaldéhyde (OPA) à 1 g/100 ml d'alcool méthylique,
- solution mère d'histamine à 1 g/ 1000 ml préparée en dissolvant 0,1656 g de chlorhydrate d'histamine dans 100 ml de TCA à 10%,
- solutions étalon d'histamine contenant 0,001 à 0,02 g/ ml de TCA à 10% et filtrées sur membrane filtrante de 0,45mm de porosité.

- **Appareillage:**

La chaîne d'analyse HPLC doit comprendre une pompe basse pression, un injecteur réacteur avec vanne à boucle de 20 ml, une colonne Lichospher 100 RP-18 (4,6 x 250 mm), un détecteur à fluorescence (360 nm pour l'excitation et 450 pour l'émission) et un intégrateur enregistreur. A noter que la dérivation peut se faire avec des composés non fluorescents tels que le chlorure de dansyle et il faut alors utiliser un détecteur UV/visible.

- pH-mètre au centième,
  - hachoir à viande pour hacher l'échantillon de poisson,
  - mixeur à grande vitesse (entre 8000 et 45000 révolutions/minute),
  - système de filtration rapide avec des filtres de diamètre 150 mm,
- **Préparation de l'échantillon:** Hacher un échantillon de poisson représentatif, en prélever 50 g  $\pm$  0,1 g et les ajouter à 100 ml d'acide trichloroacétique à 10%. Le mélange est homogénéisé dans un mixeur pendant 2 minutes puis filtré. Cet extrait peut être gardé pendant 7 jours à une température entre 2°C et 6°C. Avant analyse, il est filtré sur membrane à 0,45 mm de porosité.

- **Dérivation pré-colonne:** Le complexe fluorescent histamine-OPA est préparé en mélangeant 135 ml d'éluat (ou de solution étalon) avec 1,86 ml d'eau et 0,4 ml de NAOH 1N

dans un tube protégé de la lumière par du papier aluminium. Laisser réagir pendant une minute, puis ajouter 0,1 ml d'OPA. Après 4 minutes ajouter 0,2 ml de HCl 3 N.

- **Détermination de l'histamine:** Le mélange ainsi préparé est placé dans la boucle d'injection et traverse la colonne où il est élué avec un débit de la phase mobile réglé à 0,7 ml/minute. Dans le domaine où la réponse est linéaire, la surface du pic est en relation avec la quantité d'histamine qui a traversé le détecteur. Par comparaison avec la réponse de la solution étalon, on détermine la teneur en histamine en mg/100 g de l'échantillon en tenant compte des diverses dilutions depuis la préparation de l'échantillon jusqu'à l'injection.
- **Caractéristiques de la méthode:** Le complexe OPA-histamine donne un pic qui apparaît au bout de 9,7 minutes. Le domaine de linéarité de cette méthode est compris entre 0 et 0,02 mg/ml à l'injection. La limite inférieure de détection est de 100 pg? par 20 ml injecté. La reproductibilité est de  $\pm 5\%$ . Le taux de récupération est de 94%. Le complexe OPA-histamine est stable pendant 24 heures.

### 6-3-3 Interprétation des résultats de l'analyse de l'histamine

Quelque soit la méthode d'analyse utilisée, les résultats sont interprétés en fonction des normes de la directive 91/493/CEE qui préconise la recherche de l'histamine chez les poissons des familles *Scombridae et clupidae*. L'échantillonnage se fait selon un plan à trois classes  $n = 9$  échantillons/lot,  $c = 2$ ,  $m = 100$  ppm,  $M = 200$  ppm (aucun échantillon ne doit dépasser  $M$ , 2 échantillons au maximum peuvent avoir une teneur comprise entre  $m$  et  $M$ ).

### **6-4. Détermination du dioxyde de soufre**

Les résidus de dioxyde de soufre sont déterminés dans les crustacés qui sont toujours traités par sulfitation pour éviter leur noircissement. La méthode dosage utilisée est la méthode de Monier-Williams modifiée, décrite ci-après.

- **Objet et domaine d'application:** Cette méthode s'applique au dosage du dioxyde de soufre total dans les produits agricoles et alimentaires, quelle que soit leur teneur en dioxyde de soufre.
- **Principe de la méthode:** Cette méthode se base sur l'entraînement, par un courant d'azote, du dioxyde de soufre extrait du produit acidifié et chauffé, sa fixation et oxydation par barbotage dans une solution neutre diluée de peroxyde d'hydrogène puis le dosage de l'acide sulfurique formé par une solution titrée d'hydroxyde de sodium. La vérification du dosage, sur la solution obtenue après acidimétrie, se fait par précipitation sous forme de sulfate de baryum, et selon la teneur en dioxyde de soufre, soit par gravimétrie, soit par dosage néphélométrique.
- **Réactifs:** Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau doit être de l'eau distillée ou de pureté au moins équivalente.

- azote exempt d'oxygène,

- solution de peroxyde d'hydrogène à 9,1 g d' $H_2O_2$  par litre, exempte de sulfates,
- acide chlorhydrique, solution à environ 100 g d'HCl par litre, obtenue par dilution à 25% (v/v) de l'acide concentré (densité = 1,19 g/ml),
- indicateur coloré préparé en dissolvant 100 mg de bleu de bromophénol dans 100 ml d'éthanol à 20% (v/v). Cet indicateur est choisi parce qu'il n'entraîne pas d'interférence pour le contrôle du dosage par néphélométrie,
- solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N exempte de sulfates,
- solution d'hydroxyde de sodium 0,01 N exempte de sulfates,
- solution d'iode 0,02 N,
- empois d'amidon, à 5g/l contenant 200 g de chlorure de sodium par litre pour assurer sa conservation. Pour sa préparation maintenir l'empois 10 min à l'ébullition.
- solution de pyrosulfite de potassium et de sel disodique d'EDTA préparée en dissolvant dans un peu d'eau 1,20 g de pyrosulfite de potassium ( $K_2S_2O_5$ ) et 0,20 g du sel disodique de l'acide éthylènediamintétraacétique (EDTA) et les transvaser dans une fiole jaugée de 1000 ml. Compléter au trait-repère avec de l'eau. L'EDTA est destiné à protéger l'ion sulfureux de l'oxydation par l'air, en complexant les traces d'ion cuivre,
- solution de saccharose à 100 g/l.

- **Appareillage:**

L'appareillage comprendra le matériel courant de laboratoire et notamment des pipettes, une semi-microburette de 10 ml, une burette de 25 ml, un homogénéisateur, une balance et un appareil à entraînement permettant le déplacement et l'entraînement du dioxyde de soufre et sa fixation sur la solution de peroxyde d'hydrogène.

L'appareil à entraînement (figure 1) comprendra un ballon à fond rond de 250 ml (A) ou de capacité supérieure, un réfrigérant ascendant efficace (B) et adaptable au ballon rond, une ampoule (C) surmontant le ballon, une arrivée d'azote, un barboteur (D) adaptable au réfrigérant, un disque de tôle ou d'amiante de 15 cm de diamètre, présentant une ouverture de 4 cm de diamètre et destiné à éviter toute pyrogénéation notamment des matières extractibles.

- **Essais de contrôle:** L'appareil d'entraînement doit satisfaire aux trois essais de contrôle suivants:

- Placer dans le ballon (A) 100 ml d'eau et 5 ml de solution chlorhydrique (3.3). Chauffer à reflux pendant une heure en faisant passer un courant d'azote, le barboteur (D) étant garni de 5 ml d'eau. Le contenu du barboteur doit rester.

- Placer dans le ballon (A), 20 ml de solution de saccharose à 100 g/l. Chauffer à reflux pendant une heure en faisant passer un courant d'azote. La solution de saccharose doit rester incolore et il ne doit pas y avoir de dépôt de caramel sur les parois du ballon. Cet essai est destiné à déterminer l'intensité du chauffage.

- Placer dans le ballon (A) 20 ml de la solution pyrosulfite de potassium et 5 ml de solution d'acide chlorhydrique. Effectuer l'entraînement et le dosage du dioxyde de soufre ( $C_1$ ) dans les mêmes conditions que pour le dosage proprement dit, mais sans addition de solutions d'acide chlorhydrique. Ensuite, déterminer directement la teneur  $C_2$  en dioxyde de

soufre contenu dans la solution de pyrosulfite de potassium en plaçant 20 ml de solution d'iode 0,02 N dans une fiole conique de 100 ml et en ajoutant 5 ml de solution d'acide chlorhydrique à 100 g d'HCl/ litre et 20 ml de la solution de pyrosulfite à doser. Ajouter 1 ml d'empois d'amidon et l'amener au début de la coloration bleue en ajoutant goutte à goutte la solution d'iode.

Les teneurs en dioxyde de soufre  $C_1$  et  $C_2$  doivent être égale à  $\pm 1\%$  près.

- **Préparation de l'échantillon:** Peser à 0,01 g près, entre 10 g et 100 g de l'échantillon pour essai, selon la teneur présumée en dioxyde de soufre, de sorte que la prise d'essai contienne au maximum 10 mg de dioxyde de soufre. Ajouter 100 ml d'eau et homogénéiser avant d'introduire l'ensemble dans le ballon (A).

- **Entraînement:**

- placer dans l'ampoule (C), selon le cas, 50 ml d'eau et 5 ml de solution d'acide chlorhydrique à 100 g/l. Dans le barboteur (D) placer 3 ml de solution de peroxyde d'hydrogène à 9,1 g/l, 0,1 ml d'indicateur coloré (bleu de bromophénol) et neutraliser la solution de peroxyde d'hydrogène par la solution d'hydroxyde de sodium 0,01N,

- adapter le réfrigérant ascendant (B) et le barboteur (D) à l'appareil,

- faire circuler un courant d'azote pour chasser l'air contenu dans le ballon et dans l'ensemble du dispositif,

- faire écouler dans le ballon la solution diluée d'acide chlorhydrique contenue dans l'ampoule (C) (si nécessaire interrompre un instant le courant d'azote),

- porter lentement le contenu du ballon à l'ébullition, maintenir l'ébullition tout en faisant circuler régulièrement l'azote à raison d'une à deux bulles par seconde.

En général, le dioxyde de soufre est entraîné en 15 minutes, mais il est quelquefois nécessaire de prolonger davantage l'opération d'entraînement. On peut vérifier si l'entraînement du dioxyde de soufre a été total en remplaçant le barboteur par un autre garni d'une nouvelle charge de 3 ml de solution de peroxyde d'hydrogène neutralisée.

- **Titration:**

Titrer l'acide sulfurique formé par une solution d'hydroxyde de sodium 0,01 N ou 0,1 N selon la teneur présumée en dioxyde de soufre. Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

- **Expression des résultats:**

Un ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,01 N correspond à 0,32 mg de dioxyde de soufre. La teneur en dioxyde de soufre, exprimée en milligrammes par kg d'échantillon (ppm) est égale à:

$$0,32 \times \frac{V}{M} \times 10^3 = 320 \times \frac{V}{M}$$

Où  $M$  est la masse, en grammes, de la prise d'essai et  $V$  est le volume, en millilitres, de la solution 0,01 N d'hydroxyde de sodium utilisé.

Il faut prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations si les conditions de répétabilité sont remplies.

Si la solution 0,1 N d'hydroxyde de sodium a été utilisée, en tenir compte dans les calculs.

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste ne doit pas excéder 5% de la valeur moyenne.

- **Vérification**

Si le volume  $V$  de la solution d'hydroxyde de sodium, exprimé en 0,01 N est supérieur à 10 ml, il faut effectuer le dosage gravimétrique, autrement ( $V < 10$  ml), il faut effectuer le dosage par néphélométrie. Lorsque le volume  $V$  est inférieur à 5 ml, le dosage par néphélométrie est seul valable. Pour une prise d'essai de 100 g, cette limite de 5 ml correspond à une teneur en dioxyde de soufre de 16 mg par kilogramme. Au dessus de cette limite, le dosage acidimétrique est suffisant.

- **Vérification gravimétrique**

**Réactifs:**

- solution de chlorure de baryum à 100 g/l,
- acide chlorhydrique concentré (densité = 1,19),
- solution de lavage du précipité de sulfate de baryum préparée en dissolvant 26 mg de chlorure de baryum ( $\text{BaCl}_2$ ) dans 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et en complétant à 1000 ml avec de l'eau,

**Appareillage:**

- fioles coniques de 50 ml,
- pipettes,
- papier-filtre sans cendres,
- four chauffé à  $800^\circ\text{C} \pm 25^\circ\text{C}$ ,
- capsule.

**Détermination**

Verser dans une fiole conique le contenu du barboteur (D) et les eaux ayant servi à son lavage. Le volume total doit être voisin de 25 ml. Ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et porter à l'ébullition.

Ajouter goutte à goutte 2 ml de solution de chlorure de baryum, agiter puis laisser refroidir pendant 12h. Recueillir quantitativement le précipité de sulfate de baryum formé sur un papier-filtre préalablement humecté d'eau bouillante. Laver le précipité avec 20 ml d'eau distillée tiède, puis 5 fois avec 20 ml de solution de lavage tiède. Essorer puis sécher.

Incinérer dans un four à 800°C pendant 2 h le papier filtre contenant le précipité, placé dans une capsule préalablement séchée et tarée. Après refroidissement, peser à 0,001 g près le sulfate de baryum obtenu. Effectuer la vérification sur les 2 déterminations de SO<sub>2</sub> effectuées auparavant.

#### **Expression des résultats:**

1 g de sulfate de baryum correspond à 0,2745 g de dioxyde de soufre.

La teneur en dioxyde de soufre exprimée en mg/kg d'échantillon est égale à :

$$0,2745 \times \frac{m_1}{m} \times 1000, \text{ où } m_1 \text{ est la masse en g de sulfate de baryum et } m \text{ la masse de}$$

la prise d'essai pour la détermination de SO<sub>2</sub>.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique de ces deux déterminations si les conditions de répétabilité sont remplies. La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste ne doit pas excéder 5% de la valeur moyenne. Le résultat obtenu ne doit pas différer de 5% de celui obtenu par la méthode acidimétrique.

Dans le cas où l'écart entre les résultats donnés par la méthode acidimétrique et la méthode gravimétrique est supérieur à 5%, seul le résultat obtenu par gravimétrie doit être retenu.

- **Vérification par néphélométrie**

#### **Réactifs:**

En plus des réactifs utilisés pour le dosage acidimétrique, il faut:

- une solution étalon d'acide sulfurique préparée en introduisant dans une fiole jaugée de 1000 ml, 31,2 ml de solution titrée d'acide sulfurique 0,1 N et compléter au trait-repère avec de l'eau. Un ml de cette solution équivaut à 0,1 mg de SO<sub>2</sub>,
- une solution de polyvinylpyrrolidone à 50 g/l exempte d'ions sulfuriques (masse moléculaire moyenne 85000),
- solution mixte de chlorure de baryum et de polyvinylpyrrolidone préparée en mélangeant 80 ml de solution de chlorure de baryum à 100 g/l et 20 ml de solution de polyvinylpyrrolidone

**Appareillage:**

- fioles jaugées de 50 ml,
- pipettes ou burettes capables de délivrer 2, 4, 8, 16 et 25 ml,
- spectrophotomètre permettant des mesures à 650 nm de longueur d'onde.

**Détermination**

La courbe d'étalonnage est préparée en introduisant dans 6 fioles jaugées 0, 2, 4, 8, 12 et 16 ml de solution étalon d'acide sulfurique, 20 ml d'eau, 0,1 ml d'indicateur coloré, 1 ml de solution d'acide chlorhydrique et 5 ml de solution mixte. Ces volumes correspondent respectivement à 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 et 1,6 mg de SO<sub>2</sub>. Ajuster au trait-repère avec de l'eau et homogénéiser. 15 à 20 minutes après, mesurer l'absorbance à 650 nm avec le spectrophotomètre. Tracer la courbe d'étalonnage en portant les absorbances mesurées en fonction des concentrations en SO<sub>2</sub>, en mg/l.

Si V est inférieur à 5 ml, verser le contenu du barboteur et les eaux ayant servi à son lavage dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter un ml de solution d'acide chlorhydrique et 5 ml de la solution mixte, ajuster au trait-repère avec de l'eau et homogénéiser. 15 à 20 minutes après, mesurer l'absorbance à 650 nm avec le spectrophotomètre.

Si V est entre 5 et 10 ml, verser le contenu du barboteur et les eaux ayant servi à son lavage dans une fiole jaugée de 50 ml. Compléter à 50 ml avec de l'eau. Introduire 25 ml de cette solution dans une fiole jaugée de 50 ml, ajouter un ml de solution d'acide chlorhydrique et 5 ml de la solution mixte, ajuster au trait-repère avec de l'eau et homogénéiser. 15 à 20 minutes après, mesurer l'absorbance à 650 nm avec le spectrophotomètre.

Effectuer la néphélemétrie sur les deux déterminations réalisées sur le même échantillon pour essai.

**Expression des résultats:**

La teneur en dioxyde de soufre, exprimée en mg/kg d'échantillon est égale à:

$$c \times \frac{1000}{m}$$

où c est la concentration de SO<sub>2</sub> (mg/l) lue sur la courbe d'étalonnage et correspondant à l'absorbance mesurée. m est la masse, en g, de la prise d'essai.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique de ces deux déterminations si les conditions de répétabilité sont remplies. La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste ne doit pas excéder 5% de la valeur moyenne. Le résultat obtenu ne doit pas différer de 5% de celui obtenu par la méthode acidimétrique.

Dans le cas où l'écart entre les résultats donnés par la méthode acidimétrique et la méthode gravimétrique est supérieur à 5%, seul le résultat obtenu par gravimétrie doit être retenu.

### 6-5 Détermination du mercure

L'analyse du mercure est effectuée sur les lots d'espèces de poisson connues pour en accumuler en utilisant spectrométrie d'absorption atomique en phase vapeur à froid pour le mercure.

#### 6-5-1 Détermination du mercure total

- **Objet et domaine d'application:** Cette méthode s'applique au dosage du mercure total dans les produits de la pêche et autres tissus biologiques. La limite inférieure de détection est 0,01 ppm.
- **Principe:** Cette méthode consiste à faire une digestion acide de l'échantillon dans un mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique, suivie d'une oxydation au permanganate de potassium, dont l'excès est titré avec du peroxyde d'hydrogène à 30%. La forme oxydée du mercure est réduite en mercure Hg avec une solution réductrice contenant du chlorure stanneux, du sulfure d'hydroxylamine et du chlorure de sodium. La détermination du mercure est réalisée par spectrométrie d'absorption atomique en phase vapeur à froid.
- **Réactifs:** Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau doit être de l'eau distillée ou de pureté au moins équivalente. Les réactifs nécessaires sont:
  - acide nitrique concentré,
  - acide sulfurique concentré,
  - chlorure de sodium,
  - solution à 20% de chlorure de sodium,
  - chlorure ou sulfate stanneux,
  - sulfate d'hydroxylamine,
  - solution réductrice préparée en mélangeant dans l'ordre 2400 ml d'eau distillée, 400 ml d'acide sulfurique, 120 ml de NaCl à 20%, 40 g de sulfate d'hydroxylamine et 84 g de chlorure ou de sulfate stanneux. Après refroidissement, compléter à 4000 ml, mélanger et filtrer si nécessaire,
  - permanganate de potassium,
  - solution de permanganate de potassium à 6%,
  - solution de digestion préparée en mélangeant 1 volume d'acide nitrique concentré et 4 volumes d'acide sulfurique concentré. Les acides peuvent être également ajoutés séparément à l'échantillon,
  - solution d'eau oxygénée à 30%,
  - solution de lavage contenant un volume de solution de digestion et 3 volumes d'eau distillée,
  - chlorure de mercure,
  - solution-mère étalon à 1000 mg/ml de mercure préparée par dissolution de 0,1345 g de chlorure de mercure dans 75 ml d'eau environ. Ajouter 5 gouttes d'acide sulfurique

concentré et compléter à 100 ml avec de l'eau. Placée dans un flacon en polyéthylène, cette solution est stable pendant un mois à température ambiante ou un an au réfrigérateur.

- **Appareillage:**

- spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'une lampe à vapeur de mercure, d'un échantillonneur, d'une pompe doseuse, de serpentins mélangeurs de réactifs,
- bain marie avec agitation,
- hachoir à viande pour hacher l'échantillon de poisson,
- système de filtration rapide avec des filtres de diamètre 150 mm,
- cellules d'absorption atomique (150 mm x 6 mm, d.i) avec fenêtres à quartz,
- tube dégaseur en verre pour séparer les phases gazeuse et liquide avant la mesure par absorption atomique,
- mixeur du type Vortex,
- ballons de digestion et flacons de Kjeldhal (30 ml) ou tube de Taylor (50 ml).

- **Préparation de l'échantillon**

Prélever suffisamment de chair à partir de 10 ou 5 individus de poisson selon l'espèce (voir plan d'échantillonnage), hacher l'ensemble finement et stocker au réfrigérateur ou au congélateur jusqu'à utilisation. Si le produit fini est du poisson en récipient avec un liquide de couverture (saumure, huile, sauce,...), hacher le liquide de couverture et le poisson ensemble si le liquide de couverture se consomme, autrement l'éliminer par drainage à travers un tamis pendant une à deux minutes.

- **Détermination**

Peser 0,1 à 0,5 g d'échantillon dans un flacon de Kjeldahl de 30 ml ou dans un tube gradué de Taylor de 50 ml. Ajouter 5 ml de solution acide pour la digestion. S'assurer que la solution acide recouvre entièrement l'échantillon. Pour les échantillons gras, notamment à base de foie de poisson, ajouter 2 à 3 ml d'acide nitrique fumant pour une digestion complète.

Fermer de façon lâche le flacon avec un bouchon et placer dans un bain marie à 60°C pendant 2 heures ou jusqu'à complète digestion. Le bouchon doit laisser s'échapper les oxydes d'azote. Ensuite refroidir le flacon à température ambiante ou dans un bain d'eau et de glace.

Ajouter doucement 15 ml de la solution de  $\text{KMnO}_4$  à 6% tout en mélangeant dans le bain d'eau glacée. Laisser reposer pendant 2 heures au moins ou de préférence pendant la nuit.

Titrer avec l'eau oxygénée à 30% en l'ajoutant goutte à goutte et en mélangeant à l'aide du mixeur Vortex jusqu'à obtention d'une solution claire. Eviter d'ajouter un excès d'eau oxygénée, autrement titrer l'excès avec une solution faible de  $\text{KMnO}_4$  jusqu'à apparition d'une couleur rose pâle. Refroidir le mélange et compléter à 25 ml.

Mettre en marche le spectrophotomètre à absorption atomique selon les instructions du fabricant au moins 30 minutes avant le dosage. Ajuster le zéro sur l'appareil et l'enregistreur en faisant passer la solution réductrice dans le système.

Placer l'échantillon digéré et oxydé, la solution étalon et le blanc sur le système d'échantillonnage automatique et mettre ce dernier en marche. La solution d'échantillon digéré et oxydé est combiné de façon continue à la solution réductrice et à l'air dans un rapport 1:1:6. Les débits sont respectivement 1,6 ml/min pour l'échantillon, 27,3 ml/min pour l'air et 3,4 ml/min pour la solution acide de lavage. Le mélange passe dans deux serpentins mélangeurs, ensuite dans le dégaseur où l'air et la vapeur de mercure sont séparés de la phase liquide (qui est éliminée). La phase vapeur passe à travers la cuve d'absorption et l'absorbance due au mercure est enregistrée sous forme de pic à 253,7 nm. Mesurer les hauteurs des pics du blanc, de l'échantillon et de la solution étalon. Pour la courbe d'étalonnage, utiliser des concentrations croissantes de la solution-étalon au lieu de l'échantillon et procéder de la même manière.

- **Expression des résultats:**

Préparer une courbe d'étalonnage représentant la hauteur des pics en fonction de la concentration en ng de mercure. Déterminer la concentration en mercure de l'échantillon (exprimée en ppm) par extrapolation, à partir de la courbe d'étalonnage, de la concentration correspondant à la hauteur du pic de l'échantillon et en tenant compte du poids de la prise d'essai et du facteur de dilution.

- **Caractéristiques de la méthode:**

L'écart-type observé sur une détermination en triple est 0,04 (pour une concentration de 0,1 ppm) et 0,05 (pour une concentration de 0,5 ppm). Le taux de récupération du mercure est égal ou supérieur à 95%.

- **Remarques:**

Les oxydes d'azote absorbent à 253,7 nm. Il est important d'ajouter le sulfate d'hydroxylamine à la solution réductrice.

Une solution aqueuse de sulfate ou d'hydrochlorure d'hydroxylamine peut être utilisée à la place de la solution de peroxyde d'hydrogène à 30%.

- **Vérification:**

La digestion de l'échantillon doit être complète pour une bonne précision et répétabilité, notamment dans le cas de produits riches en matières grasses tels que le hareng, les anguilles et l'huile de poisson. Le degré de digestion peut être vérifié de trois façons:

- Faire une analyse en triple pour chacune des prises d'échantillon de 0,1 g, 0,2 g et 0,4 g. Procéder à la digestion selon le protocole décrit précédemment. En cas de digestion complète, les neuf résultats sont comparables et il faut utiliser une prise d'essai intermédiaire

(0,2 à 0,3 g) pour les analyses futures. Autrement, la période de digestion doit être augmentée ou la prise d'essai réduite.

- A la fin de la période de digestion, ajouter quelques gouttes d'acide nitrique fumant le long de la paroi du ballon de digestion. Une digestion incomplète se manifeste par une carbonisation au contact des 2 liquides.

- Examiner l'échantillon digéré sous un faisceau étroit de lumière blanche, projeté à angles droits par rapport à l'axe du conteneur. Le faisceau lumineux, vu du haut du conteneur, apparaît dispersé, en cas de digestion incomplète. Autrement, il traverse la solution sans dispersion notable.

#### 6-5-2 Détermination du mercure inorganique, organique et total

• **Objet et domaine d'application:** Cette méthode s'applique au dosage du mercure total, organique et inorganique dans les produits de la pêche et autres tissus biologiques. La limite inférieure de détection est 0,02 ppm.

• **Principe:** Cette méthode consiste à faire une digestion alcaline de l'échantillon à 100°C à l'aide d'une solution de NaOH à 45% contenant de la cystéine pour complexer le mercure. L'échantillon digéré est divisé en deux parties.

La première partie sert à réduire le mercure inorganique ( $\text{Hg}^{+2}$ ) du complexe Hg-cystéine en Hg par des ions stanneux ( $\text{Sn}^{+2}$ ) en solution fortement alcaline. Le complexe mercure organique-cystéine n'est pas réduit sous ces conditions.

La détermination du mercure total se fait sur la deuxième partie à laquelle on ajoute un excès d'ions cadmium ( $\text{Cd}^{+2}$ ) mélangés aux ions stanneux en solution fortement alcaline pour libérer toutes les formes de mercure. Celles-ci sont réduites en Hg par les ions  $\text{Sn}^{+2}$  pour permettre la détermination du Hg total. Le mercure organique est obtenu par différence.

La détermination du mercure (total ou inorganique) se fait par spectrométrie d'absorption atomique en phase vapeur à froid.

• **Réactifs:** Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau doit être de l'eau distillée ou de pureté au moins équivalente. Les réactifs nécessaires sont:

- acide sulfurique concentré,
- chlorure de sodium,
- solution à 1% de chlorure de sodium,
- Solution  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4,5 N-NaCl 1% préparée en mélangeant 35 g de NaCl, 3000 ml d'eau, 441 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré, puis compléter à 3500 ml,
- L-cystéine,
- solution de L-cystéine à 1%,
- chlorure stanneux,
- solution de chlorure stanneux préparée en ajoutant 10 g de  $\text{SnCl}_2$  à 1 g de L-cystéine, puis compléter à 500 ml avec la solution  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4,5 N-NaCl 1%,

- chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ),
- solution de chlorure de cadmium préparée en chauffant jusqu'à ébullition une solution contenant 10 g de  $\text{SnCl}_2$ , 2,5 g de  $\text{CdCl}_2$  et 1 g de L-cystéine. Refroidir le mélange et compléter à 500 ml avec la solution  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4,5 N-NaCl 1%,
- Hydroxyde de sodium,
- solutions de NaOH à 35 % et à 45 %.
- n-octanol,
- éthanol à 95 %,
- chlorure de mercure,
- solution-mère étalon à 1000 mg/ml de mercure préparée par dissolution de 0,1345 g de chlorure de mercure dans 75 ml d'eau environ. Ajouter 5 gouttes d'acide sulfurique concentré et compléter à 100 ml avec de l'eau. Placée dans un flacon en polyéthylène, cette solution est stable pendant un mois à température ambiante ou un an au réfrigérateur,
- solution de mercure à 10 mg/ml préparée en diluant 1 ml de la solution-mère dans 100 ml d'eau,
- chlorure de methyl-mercure ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ),
- solution-mère de  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  à 500 mg/ml préparée en dissolvant 62,58 g de  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  dans 100 ml d'eau,
- solution de  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  à 5 mg/ml préparée en diluant 1 ml de la solution à 500 mg/ml dans 100 ml d'eau,
- solution anti-mousse préparée en mélangeant 1 ml de n-octanol et 9 ml d'éthanol à 95 %

- **Appareillage:**

- spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'une lampe avec cathode creuse à vapeur de mercure ou d'un enregistreur à mercure,
- plaque chauffante avec agitation,
- hachoir à viande pour hacher l'échantillon de poisson,
- tube de digestion de Taylor (50 ml),
- bloc d'aluminium perforé adapté aux tubes de Taylor,
- pipettes automatiques (1000 ml),
- pompe à vide,
- manomètre gas-air,
- thermomètre pour plaque chauffante,
- distributeurs universels (2 de 1 à 10 ml, 1 de 1 à 50 ml),
- conteneurs en plastique ou en verre pour réactifs de 1 ou 2 l,
- filtre à piège de charbon,
- collecteur de vapeurs,

- **Préparation de l'échantillon**

Prélever suffisamment de chair à partir de 10 ou 5 individus de poisson selon l'espèce (voir plan d'échantillonnage), hacher l'ensemble finement et stocker au réfrigérateur ou au congélateur jusqu'à utilisation. Si le produit fini est du poisson en récipient avec un liquide de couverture (saumure, huile, sauce,...), hacher le liquide de couverture et le poisson ensemble

si le liquide de couverture se consomme, autrement l'éliminer par drainage à travers un tamis pendant une à deux minutes.

- **Détermination**

Peser 0,1 à 0,5 g d'échantillon dans un tube de Taylor de 50 ml. Préparer chaque jour une solution étalon contenant 0,1 à 0,4 mg de Hg (prélever 10, 20, 30, 40 ml de la solution de  $\text{HgCl}_2$  à 10 mg/ml) ou 0,2 mg Hg (prélever 40 ml de la solution à 5 mg/ml  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ). Traiter le blanc et les standards de la même manière que l'échantillon.

Mettre en marche le spectromètre selon les instructions du fabricant. Démarrer la pompe à vide et régler le vide à 11/min et le zéro sur le spectromètre et l'enregistreur.

- **Détermination du mercure total**

Ajouter 1 ml de L-cystéine à 1%, 5 ml de NaCl à 1% et 3 ml de NaOH à 45% à chaque tube de Taylor contenant l'échantillon, le blanc ou le standard de  $\text{HgCl}_2$ . Laisser digérer pendant 1 h à 100°C avec agitation continue. Refroidir et diluer à 50 ml avec de l'eau.

Transférer 1 ml au ballon de réaction, ajouter 3 gouttes de solution anti-mousse, 5 ml de solution  $\text{SnCl}_2\text{-CdCl}_2$  et 5 ml de NaOH à 35%. Enregistrer immédiatement la déflexion.

- **Détermination du mercure inorganique**

Procéder de la même manière qu'auparavant en utilisant du  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  (0,2 mg Hg) comme standard et  $\text{SnCl}_2$  au lieu de  $\text{SnCl}_2\text{-CdCl}_2$ . Enregistrer la déflexion.

- **Expression des résultats**

Préparer une courbe d'étalonnage représentant la hauteur des pics en fonction de la concentration en mg de mercure. Déterminer la concentration en mercure de l'échantillon (exprimée en ppm) par extrapolation, à partir de la courbe d'étalonnage, de la concentration correspondant à la hauteur du pic de l'échantillon et en tenant compte du poids de la prise d'essai et du facteur de dilution. Le taux de mercure organique est obtenu par différence entre le mercure total et le mercure inorganique.

- **Caractéristiques de la méthode**

La précision de la méthode est estimée à 11%. La limite inférieure de détection est d'environ 0,002 ppm. Le taux de récupération est de 99,8% pour le mercure total et 107,2% pour le mercure inorganique. Le taux de mercure organique trouvé lors de la détermination du mercure inorganique est au plus égal à 7% pour un échantillon contenant 100 ppm de  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ .

- **Interprétation des résultats**

La décision 93/351/CEE préconise la recherche du mercure dans les produits de la pêche. Les plans d'échantillonnage doivent être fixés par l'autorité compétente pour les produits de la pêche frais ou congelés en fonction, d'une part, des résultats obtenus lors des contrôles nationaux et dans le cadre des plans de surveillance réalisés conformément à la directive 91/493/CEE.

La teneur moyenne en mercure total dans les parties comestibles des produits de la pêche ne doit pas dépasser 0,5 ppm. Toutefois, cette teneur moyenne est portée à 1 ppm dans les parties comestibles des requins (toutes espèces), thon (*Thunus spp.*), thonine (*Euthynus spp.*), bonite (*Sarda spp.*), palomète (*Ocynopsis unicolor*), espadon (*Xiphias gladius*), voilier (*Istiophorous platypterus*), marlin (*Makaira spp.*), anguille (*Anguilla spp.*), bar (*Dicentrarchus labrax*), esturgeon (*Acipenser spp.*), flétan (*Hipoglossus hypoglossus*), sébastes (*Sébastes marinus*, *S. mentella*), langue bleu (*Moltea dipterygia*), loup (*Anarhicas lupus*), brochet (*Esox lucius*), niger princeps (*Centroscymnes coclolepis*), raies (*Raja spp.*), sabres (*Lepidopus caudatus*, *Aphanopus carbo*), baudroie (*Lophius spp.*).

## 7- CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE DES PRODUITS DE LA PÊCHE

Le PCPH procède à des prélèvements d'échantillons de produits de la pêche congelés ou en conserves en vue d'analyses microbiologiques. Ces dernières sont effectuées par le laboratoire HIDAOA de l'Ecole Inter Etats de Science et Médecine Vétérinaire (EISMV) qui est agréé par la DOPM et visent à donner:

- L'assurance que la qualité hygiénique du produit fini est telle que sa consommation ne présente pas de risque pour la santé du consommateur.
- L'assurance que le produit a été élaboré en respectant les règles d'hygiène et les règles de bonne pratique de fabrication.
- L'assurance que la qualité marchande ne présente pas de risque ou d'existence d'altération.

### 7-1 Prélèvement et préparation des échantillons

Depuis le prélèvement jusqu'au traitement de l'échantillon en vue de l'analyse microbiologique, tout est mis en oeuvre pour stabiliser qualitativement et quantitativement la flore microbienne présente au moment du prélèvement. Le prélèvement se fait de façon aseptique et le délai entre le prélèvement et le traitement de l'échantillon est aussi court que possible. Les échantillons d'eau ou de poisson frais sont conservés à température basse (0 à 5°C) pendant le transport et le stockage ultérieur, alors que les conserves de poisson stérilisées à la chaleur ou des produits congelés qui sont transportés et stockés respectivement à température ambiante ou à des températures  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ . Quelque soit la nature du produit à analyser, on procède au prélèvement de 5 échantillons par lot.

Pour l'analyse d'eau d'usine, on laisse couler l'eau pendant 2 à 3 minutes puis prélever 5 litres environ. Si l'eau est chlorée, on ajoute une solution de thiosulfate de sodium stérile, à raison de 0,1 ml/100 ml d'eau, afin de neutraliser le chlore présent.

Au laboratoire, une prise d'essai de 50 à 100 g (25 pour *Salmonella/Shigella*) est prélevée sur chaque individu et mélangée aseptiquement à 4,5 à 9 fois son volume de diluant (solution de Ringer au 1/4, eau peptonée à 0,1% ou eau tamponnée au phosphate). L'ensemble est broyé dans un broyeur à tige (type Ultraturrax) ou à palettes (type Stomacher). Le broyat ainsi obtenu, ou suspension mère, sert à préparer des dilutions successives en progression géométrique de raison 10 de la façon suivante: 9 ml de diluant sont répartis de façon stérile dans une série de tubes à essai. Après avoir homogénéisé la suspension mère, on en transfère aseptiquement un ml dans le tube No 1. Ce dernier est bien homogénéisé avant d'en transférer un ml dans le tube No 2 et ainsi de suite. Le contenu des tubes de dilution successives vont servir à l'inoculation de milieux de culture spécifiques pour la recherche et/ou le dénombrement des différents types de flores microbiennes.

### 7-2 Dénombrement de la flore aérobie totale

La flore aérobie totale est l'ensemble des microorganismes aptes à donner des colonies visibles aux températures moyennes (20 à 25°C pour les psychrophiles, 30 à 37°C pour les mesophiles et 45 à 55°C pour les thermophiles).

L'estimation de la flore aérobie totale se fait par culture sur milieu nutritif gélosé (gélose nutritive PCA) après ensemencement en profondeur. On utilise 2 boîtes de Petri par dilution. Marquer les boîtes et y déposer aseptiquement 1 ml de chaque dilution en prenant soin d'homogénéiser les tubes de dilutions et de changer de pipettes entre dilutions. Ensuite, verser dans chaque boîte environ 15 ml de milieu de culture maintenu en surfusion à 45°C au bain-marie. Mélanger l'inoculum et le milieu nutritif en faisant décrire à la boîte couverte 6 cercles de 150 mm de diamètre environ dans le sens des aiguilles d'une montre, puis 6 cercles en sens inverse, ensuite 6 allers et retours de haut en bas et 6 autres de gauche à droite en prenant soin de ne pas faire d'éclaboussures. Laisser refroidir et se solidifier puis mettre en incubation, boîtes renversées. L'incubation se fait à 35°C ± 0,5°C pour 48h ± 2h pour la flore mesophile ou 20 à 25°C ± 0,5°C pendant 72h ± 2h pour la flore psychrophile.

Pour interpréter les résultats, on ne tient compte que des boîtes qui contiennent entre 30 et 300 colonies. Le dénombrement est facilité par l'utilisation d'un compteur visionneur de colonies. On fait la moyenne des essais effectués avec la même dilution et on multiplie la moyenne par le facteur de dilution et on exprime les résultats en nombre d'unités formant des colonies/g (UFC/g). On ne retient que les deux premiers chiffres significatifs, ainsi 132 sera reporté 130 et 146 sera reporté 150.

Dans le cas où deux dilutions consécutives donnent des nombres compris entre 30 et 300 colonies, on fait la moyenne à condition que le nombre le plus grand ne dépasse pas le double du plus petit. Sinon on utilise le plus petit tel quel. Si toutes les dilutions donnent des nombres supérieurs à 300, on utilise les boîtes de Petri qui donnent des nombres le plus près de 300. On divise de telles boîtes en sections radiales

( en 2, en 4, en 8,...) à l'aide d'un marqueur, on dénombre le nombre de colonies dans une section et on multiplie par le facteur adéquat (2, 4, 8,...) puis par le facteur de dilution pour obtenir une estimation de la flore aérobie totale en UFC/g.

Si les boîtes de Petri sont très chargées en colonies, on relève le nombre de colonies dans des carrés d'un  $\text{cm}^2$  environ. Si le nombre de colonies est supérieur à  $10/\text{cm}^2$ , on dénombre le nombre de colonies de 5 carrés représentatifs de  $1 \text{ cm}^2$  chacun, puis on multiplie par 13 et par le facteur de dilution pour obtenir une estimation de la flore aérobie totale en UFC/g. Si le nombre de colonies est inférieur à  $10/\text{cm}^2$ , on dénombre les colonies dans  $13 \text{ cm}^2$  (7  $\text{cm}^2$  consécutifs choisis horizontalement le long de la boîte, puis 6  $\text{cm}^2$  consécutifs choisis perpendiculairement), le total des  $13 \text{ cm}^2$  est multiplié par 5 puis par le facteur de dilution pour obtenir une estimation de la flore aérobie totale en UFC/g.

On ne tient pas compte des boîtes de Petri où les colonies n'ont pas été bien séparées et forment des amas sur plus de la moitié de la boîte. Autrement, on dénombre les colonies sur la moitié acceptable et on multiplie par 2 puis par le facteur de dilution pour obtenir une estimation du nombre d'UFC/g.

Le dénombrement de la flore aérobie totale est utilisé pour définir les déviations par rapport aux conditions de bonne pratique de fabrication, notamment en ce qui concerne la rupture de la chaîne de froid et les retards accusés lors de l'élaboration. Dans le cadre de la mise en place des auto-contrôles dans les installations à terre, il est recommandé aux industriels de déterminer la flore aérobie totale et de la comparer à des normes (ou lignes directrices) qui doivent les aider à juger du bon fonctionnement de leur établissement et à la mise en oeuvre de procédures de surveillance de la production.

### 7-3. Dénombrement des coliformes, coliformes fécaux et *Escherichia coli*

Les **coliformes** sont des bactéries en bâtonnets, aérobie facultatives, Gram négatives, asporulantes, cytochrome oxydase négatives, qui fermentent le lactose avec production de gaz en présence de sels biliaries ou d'autres agents tensio-actifs ayant des propriétés analogues à  $35^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$  en  $48\text{h} \pm 2\text{h}$ . Les **coliformes fécaux** sont des bactéries en bâtonnets, aérobie facultatives, Gram négatives, asporulantes, cytochrome oxydase négatives, qui fermentent le lactose avec production de gaz en présence de sels biliaries ou d'autres agents tensio-actifs ayant des propriétés analogues à  $44^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$  en 24h au moins. Enfin, *E. coli* est un coliforme fécal qui produit de l'indole à partir du tryptophane à  $44^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$  en 24h.

Deux méthodes de détection et de numération des coliformes sont utilisées. Ce sont la détection en milieu liquide et la détection en milieu solide.

#### 7-3-1 Détection des coliformes en milieu liquide

La détection des coliformes consiste à incuber l'échantillon à  $35^\circ\text{C}$  pendant  $48\text{h} \pm 2\text{h}$  dans un bouillon lactosé, rendu sélectif par addition de bile et de vert brillant et contenant une cloche de Durham pour détecter la production de gaz (bouillon lactosé bilié au vert brillant: BLBVB) ou de la gélose au desoxycholate.

On ensemence des tubes contenant 10 ml de BLBVB avec 10 ml, 1ml et 0,1 de la suspension mère (3 ou 5 tubes pour chaque volume d'ensemencement). Les tubes ensemencés avec 10 ml contiendront du BLBVB à double concentration. Les tubes inoculés sont incubés à 35°C pendant 48h pour la numération des coliformes totaux.

La lecture consiste à observer si un dégagement de gaz suffisant a eu lieu: si le gaz occupe au moins le 1/10 du volume de la cloche, le résultat est positif. Le nombre de tubes de BLBVB positifs par dilution sont notés et le nombre caractéristique est déterminé. Ce nombre caractéristique permet de déterminer, à l'aide des tables de Mc Crady , le nombre le plus probable de coliformes totaux par gramme d'échantillon (NPP/g).

Pour la détection des coliformes fécaux ou d'*E. coli*, on repique, à partir des tubes de BLBVB ayant montré une croissance avec production de gaz suffisant, d'autres tubes de BLBVB qui seront alors incubés à 44°C pendant 48 h. S'il y a dégagement de gaz, le test est positif pour les coliformes fécaux. Si, en plus, on a repiqué sur eau peptonée et qu'il y a production d'indole (révélée par la formation d'un anneau rouge après addition de quelques gouttes de réactif de Kovacs aux tubes d'eau peptonée ayant montré une croissance), le test est positif pour *E. coli*. Le NPP/g de coliformes fécaux ou d'*E. coli* est déterminé de la même façon que pour les coliformes totaux à l'aide de la table de Mc Crady.

Il est également possible d'identifier les coliformes dépistés en faisant un isolement et en pratiquant ensuite le test IMViC (indole, rouge de méthyle, Voges-Proskauer, Citrate) décrit plus loin.

### 7-3-2 Détection des coliformes en milieu solide

La détection et la numération des coliformes sur milieu gélosé se fait selon le même principe que pour la flore aérobique totale. Les milieux de culture les plus couramment utilisés sont la gélose au désoxycholate et la gélose lactosée biliée au violet de gentiane et au rouge neutre.

L'inoculation se fait en surface par la méthode de la double couche: le milieu de culture est d'abord coulé en boîte de Petri. Ensuite, il est inoculé avec 1 ml de la suspension mère et des deux dilutions successives à raison de deux boîtes de milieu par dilution. L'inoculum est réparti à la surface du milieu solide à l'aide d'un râteau stérile, puis une autre couche de milieu gélosé est coulée à la surface de la boîte de Petri. Après solidification du milieu à leur surface, les boîtes sont incubées pendant 24h ± 2h, à 35°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux.

La lecture consiste à dénombrer les colonies rouges, violettes ou jaunes avec un diamètre d'au moins 0,5 mm. L'identification des colonies peut se faire par les tests IMViC.

### 7-3-3 Les tests IMViC

Les tests IMViC (indole, rouge de méthyle, Voges-Proskauer, citrate) sont utilisés pour identifier les différents coliformes détectés sur milieux sélectifs de dénombrement.

**Production d'indole:** Sous l'action d'une tryptophanase bactérienne, le tryptophane est transformé en indole qui donne une coloration rouge-rose avec le réactif de Kovacs.

Ensemencer un tube contenant de l'eau peptonée avec un isolat de colonie à étudier, incubé à 37°C pendant 24h. Ajouter quelques gouttes (environ 0,5 ml) de réactif de Kovacs. Agiter légèrement le tube, La présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge-rose caractéristique à la surface du tube.

**Test du rouge de méthyle:** Ensemencer un tube contenant le bouillon au rouge de méthyle de Voges-Proskauer (MR-VP) avec le germe à étudier. Incuber à 37°C pendant 48h. Au moment de la lecture, ajouter 2 gouttes d'une solution de rouge de méthyle à 0,5% dans l'alcool à 60° à 1 ou 2 ml de la culture. Une réaction positive (RM +) se traduit par la formation d'une coloration rouge et une réaction négative par la formation d'une coloration jaune.

**Réaction de Voges-Proskauer ou recherche de l'acétoïne:** Ensemencer un tube contenant le bouillon au rouge de méthyle de Voges-Proskauer (MRVP) avec le germe à étudier. Incuber à 37°C pendant 48h. Au moment de la lecture, prélever un à deux ml du milieu MRVP, ajouter 0,5 ml d'une solution d'a-naphtol à 6% dans l'alcool à 50° et un ml de soude caustique à 16% dans l'eau. Agiter énergiquement et laisser reposer pendant 10 minutes à température ambiante. L'apparition d'une coloration rouge ou rose en surface ou généralisée démontre une réaction positive (VP +). Si le milieu garde sa teinte initiale, la réaction est négative. A défaut d'a-naphtol, on peut utiliser une pincée de créatine, 0,5 ml de bouillon et 0,5 ml de soude caustique à 40% dans l'eau. La lecture se fait de la même façon. Enfin, certains auteurs recommandent de mélanger 0,7 ml de culture, 0,1 ml d'a-naphtol en solution dans l'alcool à 5%, 0,1 ml de KOH à 40% et une pincée de créatine. Laisser reposer pendant 2h. La lecture se fait comme avant.

**Utilisation du citrate comme seule source de carbone:** Ensemencer un tube contenant le bouillon au citrate de Koser. Incuber à 37°C pendant 96h. Une réaction positive se traduit par une croissance bactérienne.

La classification des coliformes selon le test IMViC est comme suit: *E. coli* (indole +, RM +, VP -, Citrate - ou plus simplement + + - -), certains souches d'*E. coli* sont (- + - -). *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* (- - + +), *Citrobacter freundii* (- + - ±).

#### 7-4. Recherche de *Salmonella*

La recherche de *Salmonella* dans les produits de la pêche s'effectue selon un schéma en 5 étapes. Un pré-enrichissement pour permettre la récupération des bactéries stressées, un enrichissement pour favoriser la multiplication des salmonelles même en présence d'une flore bactérienne concurrente, l'isolement des salmonelles, l'identification biochimique puis la confirmation sérologique.

### 7-4-1 Pré-enrichissement

La recherche s'effectue à partir de 25 g d'échantillon. Cette prise d'essai est de 100 g pour la farine de poisson.

L'échantillon est mélangé au milieu de pré-enrichissement (bouillon lactosé, bouillon lauryl tryptose ou bouillon nutritif) puis broyé aseptiquement. Le rapport prise d'essai/milieu de pré-enrichissement est de 1/4 à 1/9. Vérifier le pH du broyat et l'ajuster à 6,8 s'il est inférieur ou égal à 6,4. Placer l'ensemble dans un flacon à bouchon stérile et incubé à 35°C pendant 24h.

### 7-4-2 Enrichissement

Porte un ml de milieu de pré-enrichissement incubé dans 10 ml de bouillon au tetrathionate de Na et vert brillant (BTVB). Il est également recommandé de procéder, de la même manière à un enrichissement sur bouillon sélénite-cystéine (BSC). Après homogénéisation, incubé les tubes de milieu d'enrichissement à 43°C pendant 18 à 24h (BTVB) ou à 35°C pendant 18 à 24h (BSC).

### 7-4-3 Isolement

Prélever une goutte du milieu d'enrichissement incubé et pratiquer un isolement à la surface de deux boîtes de Petri contenant respectivement de la gélose lactosée au vert brillant (GVB) et de la gélose bismuth sulfite (GBS). Il est recommandé de procéder également à un isolement sur gélose XLD et gélose Hektoen. Incuber les boîtes à 35°C pendant 24 à 48h.

Sur GVB, les *Salmonella* cultivent sous forme de colonies roses entourées d'une zone de milieu rouge brique. Les bactéries qui fermentent le lactose ou le saccharose ne se développent pas ou très peu sous forme de colonies jaune-vertes entourées par une zone jaune. Certaines souches de *Proteus spp* forment des colonies rouges.

Sur GBS, les salmonelles forment des colonies grises, brunes à noires, avec parfois un reflet métallique. Autour des colonies, le milieu est brun tournant au noir après incubation prolongée. Certaines souches de salmonelles produisent des colonies vertes avec peu ou pas de noircissement du milieu autour.

Sur gélose Hektoen, les *Shigella* et *Providencia* se différencient en colonies vertes, humidifiées et bombées, les *Salmonella*, *Hafnia* et *Proteus* en colonies bleu-vertes à bleues avec ou sans centre noir, les *Pseudomonas* en colonies plates vertes ou brunes et les coliformes en colonies saumon à oranges.

Sur gélose XLD, les colonies de *Salmonella* sont rouges avec un centre noir. Certaines souches ne sont pas à centre noir. *Shigella*, *Providencia* forment des colonies rouges. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Proteus* forment des colonies jaunes. *Proteus rettgeri* et certains *Pseudomonas* forment des colonies rouges.

#### 7-4-4 Identification

Sur chaque milieu d'isolement, repérer les colonies caractéristiques, en repiquer au moins une par milieu à l'aide d'un fil de platine droit et ensemer de la gélose TSI, et de la gélose LIA. Utiliser le même prélèvement pour ensemer TSI et LIA. Ces deux milieux sont préparés en tube de manière à présenter un culot et une pente sensiblement de même hauteur. Ensemer le culot par piqûre et la pente par une strie médiane. Ensemer en parallèle de la gélose MacConkey pour permettre une purification et la sélection de colonies caractéristiques pour la confirmation sérologique. Incuber à 35°C pendant 24h. Les cultures douteuses sur LIA sont incubées pour 24h de plus.

Sur TSI, les souches de *Salmonella* produisent un culot jaune (réaction acide) et une pente rouge (réaction alcaline), avec ou sans noircissement (production de H<sub>2</sub>S) et production parfois de gaz qui fissure, décolle la gélose ou forme des bulles). Dans le cas des coliformes, le culot et la pente sont colorés en jaune.

Sur LIA, les souches de *Salmonella* colorent tout le milieu en pourpre (réaction alcaline suite à la décarboxylation de la lysine) avec ou sans production de H<sub>2</sub>S. L'absence de décarboxylation de la lysine se traduit par une coloration jaune. Les isolats donnant une réaction négative sur TSI (pente jaune) mais positive sur LIA doivent être ré-incubés pour 24 h de plus.

Sur gélose MacConkey, les salmonelles forment des colonies incolores, alors que les coliformes (lactose<sup>+</sup>) forment des colonies rouges-violettes avec autour un précipité de sels biliaires.

#### 7-4-5 Etude sérologique

Les souches présentant les caractères généraux de *Salmonella* doivent être testées à l'aide de sérums polyvalents anti O et anti H.

Déposer sur une lame très propre une goutte d'eau physiologique. Prélever à l'anse une partie de culture à tester à partir du tube TSI et mettre en suspension dans la goutte d'eau physiologique. Ajouter une goutte de sérum. Mélanger progressivement culture et sérum et imprimer ensuite des mouvements de va et vient à la lame pendant une minute. Une agglutination se traduit par l'apparition rapide d'amas qui sont plus nettement visibles à la périphérie du mélange. Utiliser des antigènes connus ou, à défaut, une culture typée de *Salmonella* comme témoin positif.

Si l'étude sérologique n'est pas faite dans les 48h après croissance sur TSI et LIA, il faut repiquer les colonies caractéristiques sur gélose nutritive inclinée en tubes à incuber à 35°C pendant 24h. Ces cultures peuvent par la suite être stockées à 2°C - 8°C.

A noter que les souches R (rough) ne peuvent pas être agglutinées par les sérums anti O. Elles sont dites "auto-agglutinables". Ce qui se vérifie par l'apparition d'une agglutination spontanée dans une goutte d'eau salée (20%).

### 7-4-6 Confirmation biochimique du diagnostic

On peut procéder à une confirmation biochimiques des isolats caractéristiques. Il faut alors vérifier que les souches sont cytochrome oxydase -, uréase -, indole -, ONPG <sup>+</sup>, citrate<sup>+</sup>, fermentent le dulcitol et dégradent le malonate. Il existe dans le commerce des kits pour l'identification poussée des salmonelles.

Au besoin, on adresse les souches identifiées à un centre spécialisé?? de sérotypage pour une identification complète.

Recherche de la cytochrome oxydase: En milieu aqueux, sous sa forme réduite, le diméthyl paraphénylène-diamine est coloré en rose très pale. Sous l'action de la cytochrome oxydase, il est oxydé en un dérivé coloré en bleu framboise.

Déposer sur un papier filtre une goutte d'une solution aqueuse de diméthyl-paraphénylène-diamine (PPD) ou utiliser du papier filtre commercial qui en est préalablement imprégné. A l'aide d'une anse de platine, prélever un fragment d'une colonie à examiner et l'appliquer sur la tache de PPD. Utiliser une culture de 24 h sur gélose nutritive inclinée. Ne pas utiliser un fil en acier qui peut donner lieu à des résultats positifs faux. Une réaction positive se traduit par le développement d'une coloration bleu framboise au bout de 2 minutes. *Salmonella* est oxydase négative. Les cultures oxydase négatives seront écartées et ne nécessitent pas de tests de confirmation supplémentaires.

Hydrolyse de l'urée: L'uréase hydrolyse l'urée en anhydride carbonique et ammoniacque. Ce dernier entraîne une alcalinisation du milieu qui se traduit par le virage au rouge du rouge de phénol.

Prélever un fragment important de la culture de 24h purifiée sur gélose nutritive et inoculer un bouillon ou une gélose urée inclinée. Incuber à 35°C pendant 24h. Une réaction positive se traduit par une coloration rouge. *Salmonella* est uréase -.

Production d'indole à partir du tryptophane: Sous l'action d'une tryptophanase bactérienne, le tryptophane est transformé en indole qui donne une coloration rouge-rose avec le réactif de Kovacs.

Ensemencer un tube contenant de l'eau peptonée avec un isolat de colonie à étudier, incuber à 37°C pendant 24h. Ajouter quelques gouttes (environ 0,5 ml) de réactif de Kovacs. Agiter légèrement le tube, La présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge-rose caractéristique à la surface du tube.

Recherche de la  $\beta$ -galactosidase: En présence de  $\beta$ -galactosidase, l'orthonitrophényl-galactopyranoside (ONPG) est hydrolysé en ortho-nitrophénol de coloration jaune et en galactose.

Placer 0,2 ml d'eau physiologique stérile dans un tube à hémolyse (75 mm x 10 mm), inoculer avec un prélèvement de la colonie à étudier à partir de la pente TSI, ajouter un disque imprégné d'ONPG, couvrir le tube de papier aluminium et incuber à 35°C. Examiner

la réaction chaque 30 minutes pendant 4h. Une réaction positive se traduit par le développement d'une coloration jaune. *Salmonella arizonae* est ONPG<sup>+</sup>.

Fermentation du dulcitol: La plupart des espèces de salmonelles, à l'exception de *S. arizonae* fermentent le dulcitol avec production de gaz.

Inoculer un tube contenant du bouillon au dulcitol et incuber à 35°C pendant 24h. Une fermentation du dulcitol se traduit par une coloration jaune du milieu.

Dégradation du malonate: L'utilisation du malonate par les microorganismes aboutit à des produits de dégradation alcalins. L'augmentation du pH qui en résulte provoque une évolution de l'indicateur coloré du jaune-vert au bleu.

Ensemencer du bouillon au malonate avec la culture à tester, puis incuber à 35°C. examiner au bout de 24h et 48h. Une réaction positive se traduit par le développement d'une coloration bleue. La plupart des espèces de *Salmonella*, à l'exception de *S. Arizonae*, ne dégradent pas le malonate.

Utilisation du citrate comme seule source de carbone: La plupart des *Salmonella* et certains coliformes sont capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone pour leur croissance et multiplication.

Ensemencer en surface le milieu gélosé au citrate de Simmons. Incuber à 35°C pendant 1 à 7 jours. Une réaction positive se traduit par une croissance bactérienne et une coloration bleu du milieu.

## **7-5. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus***

Les souches de *S. aureus* sont ubiquitaires. Elles se rencontrent chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales, sur la peau et sur la muqueuse du rhinopharynx. Elles constituent l'agent de suppurations diverses, superficielles ou profondes, et de septicémies. Plus de 30% des sujets seraient porteurs de *S. aureus*.

### 7-5-1 Recherche et dénombrement de *S. aureus* en milieu liquide

Cette recherche s'effectue à l'aide de milieux liquides qui permettent le développement préférentiel d'un nombre réduit de *S. aureus* ou de cellules endommagées par les traitements technologiques.

A partir de la suspension mère et des dilutions décimales successives préparées selon la méthode décrite auparavant, ensemencer des tubes de bouillon trypticase soja hypersalé (10% de NaCl), à raison de 1ml/ tube et 3 ou 5 tubes de bouillon pour chaque dilution. Incuber les tubes à 35°C pendant 24h. Déterminer le NPP de *S. aureus* présumés par gramme comme pour les coliformes et isoler, à partir de chaque tube positif des colonies sur milieux gélosés selectifs (milieu de Baird Parker, gélose tellurite polymyxin jaune d'oeuf, ou milieu staphylococcus 110 au jaune d'oeuf). Incuber à 35°C pendant 48 et utiliser les souches isolées pour le test de la coagulase décrit plus loin. Noter le nombre de tubes par dilution qui

donnent une réaction coagulase positive. A l'aide de la table de Mc Crady, déterminer le NPP/g et reporter le résultat en NPP de *S. aureus* coagulase positive/g.

### 7-5-2 Dénombrement de *S. aureus* en milieu solide

Ce dénombrement se réalise directement sans phase d'enrichissement. A cet effet, on utilise différents milieux gélosés sélectifs, tel que le milieu de Baird Parker, la gélose tellurite polymyxin jaune d'oeuf (GTPJO), ou le milieu staphylococcus 110 au jaune d'oeuf (milieu S 110).

Le milieu choisi est coulé en boîtes de Petri et séché, après solidification, dans une étuve à 35°C ou dans une hotte à flux laminaire pendant 1 à 2h. Une fois coulé, le milieu ne doit pas être utilisé au delà de 24h de conservation au froid.

A partir de la suspension mère et des dilutions décimales successives préparées selon la méthode décrite auparavant, ensemercer les boîtes de milieu gélosé à raison de 0,5 ml/par boîte (suspension mère) et 0,1 ml pour les autres dilutions. Le plus souvent, il suffit d'utiliser la suspension mère, la dilution au 1/10 et celle au 1/100 pour vérifier la conformité aux critères microbiologiques. Les boîtes ensemencées sont placées à 35°C en position normale pendant 1 à 2h, puis inversées. Au bout de 48h, les boîtes de Petri sont sorties et dénombrées. Si on utilise le milieu S 110, les boîtes peuvent être incubées à 45°C pendant 24h.

Sur milieu S 110, les colonies de *S. aureus* caractéristiques sont blanches à jaunes avec un diamètre de 2 mm et une zone de précipité blanc opaque autour. Sur milieu de Baird Parker, elles sont circulaires, convexes, lisses avec un diamètre de 2 à 3 mm, de couleur gris à noir et entourées ou non d'un halo d'éclaircissement du milieu de culture bien visible. Enfin, sur GTPJO, les colonies caractéristiques sont noires, cerclées d'un petit liséré blanc opaque et entourées d'un halo d'éclaircissement du milieu de culture bien visible, avec un diamètre de 1 à 2 mm.

Certaines bactéries cultivent bien sur ces milieux de culture sélectifs en donnant des colonies avec des caractéristiques partiellement ou totalement similaires à celles décrites pour *S. aureus*. Ce sont notamment des microcoques, des entérocoques, *Proteus vulgaris* et *S. aureus* coagulase négative. Il est donc indispensable de confirmer que les isolats obtenus sont effectivement des *S. aureus*.

### 7-5-3 Tests d'identification complémentaires

La mise en évidence d'une coagulase demeure le critère fondamental pour la caractérisation de *S. aureus*. Toutefois, d'autres tests tels que la détection de la thermonucléase ou la recherche de la protéine A, sont utilisés soit pour suppléer à une défaillance du test de la coagulase, soit dans un souci de simplification.

Recherche de la coagulase: Prélever un nombre représentatif de chaque type morphologique de colonies caractéristiques et en inoculer des tubes de bouillon coeur-cervelle

(BCC). Il s'agit d'un milieu de culture riche qui sert également à la recherche de la thermonucléase. Incuber à 35°C pendant 12 à 24h.

Mélanger ensuite dans un tube à hémolyse stérile, 0,2 ml de la culture obtenue sur BCC avec 0,3 ml de plasma de lapin. Incuber à 35°C et examiner les tubes chaque 30 minutes pendant 6h.

Une réaction est positive lorsque le plasma est coagulé et qu'on peut retourner le tube même si cela s'accompagne d'un léger écoulement.

Des réactions faiblement positives peuvent être obtenues. Il est alors utile de disposer de renseignements supplémentaires.

Recherche de la thermonucléase: La thermonucléase est révélée à l'aide d'un milieu gélosé à l'ADN et au bleu de toluidine (TADN). Le bleu de toluidine est bleu violet en présence d'ADN, alors qu'en son absence (dépolymérisé par l'Adnase), le colorant vire au rose.

Le milieu TADN est coulé en boîtes de Petri de 50 mm de diamètre à raison de 5 ml/boîte. Après refroidissement et séchage, des cupules de 2 mm de diamètre sont découpées dans la gélose à raison de 6 cupules par boîte.

Le bouillon BCC ensemencé auparavant est chauffé dans un bain d'eau bouillante pendant 15 minutes afin d'éliminer les Dnases thermolabiles. Laisser refroidir, prélever une goutte du bouillon et la porter dans une cupule. Vérifier conjointement la présence de thermonucléase thermolabile (inoculum non bouilli) et thermostable. Faire incuber à 35°C pendant 4h.

L'apparition d'un halo rose à bord net, autour de la cupule et bien visible sur le fond bleu du milieu, indique la présence d'une thermonucléase. Ce halo est plus ou moins important selon la quantité d'enzyme produite et qui est variable selon les souches.

Recherche de la protéine A: La protéine A est un constituant spécifique de la paroi de *S. aureus*. Elle peut être mise en évidence par un test d'hémagglutination passive, qui met à profit l'aptitude de la protéine A à se fixer sur le fragment Fc des immunoglobulines G. Les hématies de mouton sont liées, après traitement par le glutaraldéhyde par exemple, à la fraction Fab de ces mêmes immunoglobulines.

Placer sur une lame propre une goutte de suspension d'hématies sensibilisés (réactif disponible dans le commerce). Y faire émulsionner le prélèvement d'une colonie caractéristique. Une réaction positive apparaît rapidement sous forme d'hémagglutination.

Recherche de la phosphatase: Le spécimen à étudier est mis en présence de paranitrophényl-phosphate (NPP). La présence d'une phosphatase se traduit par la dégradation du NPP et la libération de nitrophénol jaune.

Dans un tube à hémolyse, placer 0,25 ml de NPP et 0,25 ml d'acétate de potassium. Ce tube servira de témoin. Dans un deuxième tube, placer les mêmes solutions et 1 ml d'une suspension épaisse du germe préparée dans l'eau physiologique à partir d'une culture sur gélose nutritive inclinée. Incuber à 35°C pendant 30 minutes. La présence de la phosphatase alcaline se traduit par l'accentuation de la couleur jaune du tube ensemencé par rapport au témoin.

#### 7-5-4 interprétation des résultats des tests d'identification

Les tests d'identification complémentaires sont nécessaires pour confirmer que les souches isolats sont des *S. aureus*. Certains auteurs affirment que ces tests peuvent en plus aider à distinguer entre les *S. aureus* pathogènes et les non pathogènes.

Le test majeur pour distinguer ces deux catégories est incontestablement la recherche de la coagulase. Tout staphylocoque possédant une coagulase serait pathogène. Un tel germe possède en outre et de façon habituelle, un puissant arsenal enzymatique. Il n'en est pas de même pour les staphylocoques coagulase négative qui n'ont en général qu'une activité enzymatique réduite.

Entre ces deux extrêmes, se situe un nombre non négligeable de souches qui ne possèdent pas de coagulase mais dont l'activité enzymatique est par ailleurs importante. La plupart des auteurs s'accordent actuellement pour reconnaître à la présence de certaines enzymes une importance suffisante pour classer des staphylocoques coagulase négative parmi les pathogènes. C'est le cas de la phosphatase et de la désoxyribonucléase. Ces deux enzymes se rencontrent toujours chez les staphylocoques coagulase positive et peuvent être présents, soit ensemble, soit isolément chez les coagulase - dont le caractère pathogène est vraisemblable.

### **7-6 Contrôle de la stérilité commerciale des conserves de poissons**

#### 7-6-1 Méthode de de contrôle de la stérilité commerciale

Le contrôle de la stérilité commerciale effectué sur une boîte de conserve de poisson a pour objectif de s'assurer que la boîte ne renferme pas de bactéries pathogènes ou de toxines dangereuses pour la santé du consommateur, ni de bactéries revivifiables capables d'altérer la qualité marchande du produit dans les conditions normales de stockage et de distribution.

Dans le cadre de l'auto-contrôle, les conserveries sont tenues d'effectuer des contrôle de stérilité commerciale sur 5 échantillons par lot. En cas d'alerte sanitaire impliquant les conserves de poisson, le BCPH procède à ce contrôle également pour délimiter et détecter la cause du problème.

La stérilité commerciale est déterminée en incubant 5 boîtes/lot à 37°C pendant 7 jours et 5 boîtes/lot à 55°C pendant 7 jours. Après incubation, les conserves sont stabilisées à température ambiante avant de procéder à l'examen de l'emballage pour voir s'il y a un bombement, une fuite ou un flochage. Une boîte est floche lorsque l'un ou les 2 fonds présente un bombement léger qui disparaît sous la pression des doigts, mais réapparaît

lorsque cette pression cesse (cas de 2 fonds bombés), ou lorsque le bombement se transmet à l'autre fond par pression (cas d'un seul fond bombé)..

Ensuite, on vérifie que l'étuvage n'a pas apporté de transformation notable par rapport à un témoin non étuvé. Pour cela on vérifie qu'il n'y a pas eu croissance microbienne ni variation de l'aspect de l'emballage, du pH du produit, de sa couleur, texture, odeur ou de pression interne si les boîtes ont été soumises à un vide avant sertissage. Il ne faut jamais goûter le contenu d'une boîte étuvée. Pour ce faire, les boîtes sont nettoyées au détergent puis séchées. Le couvercle à ouvrir est désinfecté à l'éthanol à 95 %, puis flambé à l'aide d'un bec Bunsen. Il ne faut jamais flamber la surface d'une boîte bombée. Son couvercle doit être désinfecté à l'aide d'une solution d'iode à 2 % dans l'alcool à 70 %.

De façon aseptique, procéder à l'ouverture du couvercle à l'aide d'un ouvre-boîte propre et stérile, ou de préférence, à l'aide d'un "disc cutter". Cet instrument en acier inoxydable est constitué d'un manche en bois auquel s'attache une tige en acier qui se termine par une pointe aiguisée et sur laquelle se trouve un couteau sous forme de moitié longitudinale d'une toupie. Ce couteau se déplace, grâce à une vis, le long de la tige selon le diamètre de l'ouverture qu'on désire effectuer. La pointe et le couteau sont stérilisés à la flamme. La pointe sert à trouser le centre du couvercle de la boîte et le couteau servira à y découper un cercle. Un simple trou peut suffire pour le prélèvement d'un échantillon du liquide de couverture.

Transférer aseptiquement quelques grammes de produit (ou quelques ml de liquide de couverture) à un tube de diluant pour faire des observations microscopiques, puis à deux tubes à essai contenant 10 ml de bouillon glucose tryptone (BGT) et deux tubes contenant 10 ml de bouillon au thioglycolate (BT) régénéré. Ces derniers sont recouverts par de la paraffine stérile ou du vaspar stérile (mélange 1:1 de paraffine et d'huile minérale) pour favoriser l'anaérobiose. Les tubes sont incubés à 35°C pendant 7 jours d'abord, puis pendant une semaine supplémentaire s'il n'y a pas eu de développement bactérien.

Après ensemencement des tubes de bouillon, procéder à la détermination du pH, des caractéristiques sensorielles du contenu de la boîte et à l'observation microscopique (observation au frais et coloration de Gram) de la suspension mère. Il est recommandé d'utiliser un microscope à contraste de phase, une goutte de xylène pour émulsifier l'huile présente, et des colorants (bleu de méthylène ou crystal violet) pour distinguer les bactéries des débris de produit.

On note le nombre moyen  $n$  d'éléments microbiens par champ microscopique et la nature (forme, mobilité, taille,...) rencontrés. Les mêmes analyses sont effectuées sur les boîtes du lot témoin non étuvées sur lesquelles on détermine  $n_0$  et  $pH_0$ .

En général, les conserves de poisson sont considérées commercialement stériles (ou stables) si elles ne présentent pas de modifications de l'aspect de l'emballage après étuvage, et s'il n'y a pas eu de modification du produit. Il faut notamment s'assurer que la variation du pH par rapport au témoin non étuvé est inférieure à 0,5 unité pH et que le rapport  $n/n_0$  est inférieur à 100.

Les bouillons de cultureensemencés et incubés peuvent aider à déterminer l'origine d'une altération bactérienne des conserves de poisson. Après incubation, on peut procéder à des observations microscopiques du contenu des tubes de bouillon où il y a eu croissance bactérienne. Un défaut d'étanchéité de la boîte se manifeste par la présence de cultures mixtes de morphologie et caractéristiques culturelles différentes. Une sous-stérilisation se manifeste par la présence de bactéries, souvent en cultures pures, sous forme de bacilles Gram + et thermorésistants.

Le manque d'étanchéité peut se confirmer par une analyse de serti, notamment par la mesure des paramètres du serti qui sont le crochet du corps, le crochet du fond, le recouvrement, la croisure et éventuellement les ondulations. A noter toutefois que le défaut d'étanchéité peut être temporaire. En effet, la pression interne est élevée pendant la stérilisation et peut exercer un stress suffisamment élevé sur le serti pour créer une microfissure à travers laquelle des bactéries peuvent s'infiltrer. Cette microfissure se referme une fois que la pression interne baisse. Dans ce cas, le manque d'étanchéité ne peut pas être confirmé par analyse de serti.

La présence d'une culture pure de bacilles Gram + dans BGT ou BT nécessite la recherche de bactéries sporulantes. Celle-ci se fait par ensemencement de gélose nutritive au manganèse (GNM) à partir des bactéries qui ont cultivé sur BGT et sur gélose ou bouillon renforcé pour clostridies (GRC ou BRC) pour les bactéries qui ont cultivé sur BT. L'incubation se fait à 35°C pendant 4 à 10 jours. L'anaérobiose est réalisée par l'addition de vaspar (BRC) ou dans une jarre à anaérobies (GRC).

Après incubation, les cultures sont examinées pour la présence de spores par observation directe sous microscope à contraste de phase ou après coloration de Schaeffer-Fulton. En cas de présence de spores bactériennes, les cultures sont soumises à un traitement thermique (80°C pendant 10 minutes) puis utilisées pour ensemercer GNM, GRC ou BRC qui seront incubées à 35°C pendant 2 à 4 jours. La croissance microbienne et les observations microscopiques confirmeront la présence de bactéries sporulantes thermorésistantes et la possibilité de sous-stérilisation.

Une sous-stérilisation peut avoir des conséquences graves, notamment l'intoxication botulique. Une investigation doit en déterminer les causes pour y remédier d'urgence.

Coloration de Gram: Les germes sont colorés en bleu violet avec le cristal violet phéniqué. Après l'action d'un mordant (le lugol), une décoloration à l'acétone-alcool est tentée. La safranine ou la fuchine agissent ensuite comme colorant de contraste.

Sur une lame très propre, faire un étalement de culture bactérienne. Laisser sécher à l'air puis fixer à la chaleur (plaque chauffante ou par passages rapides, environ 20 fois, au dessus de la flamme) ou à l'alcool.

Couvrir le frottis avec une solution de cristal violet ou de violet de gentiane. Laisser en contact 30 à 60 secondes. Rincer rapidement à l'eau pour enlever l'excès du colorant. Faire attention de ne pas détacher le frottis. Recouvrir de la solution de lugol et laisser agir

pendant environ une minute, puis laver doucement à l'eau. Décolorer la lame avec le mélange acétone-alcool, ensuite rincer soigneusement à l'eau. Recolorer le frottis avec la fuchine basique ou la safranine. Laisser en contact pendant 30 secondes. Laver la lame à l'eau, sécher et examiner à l'immersion.

Les bactéries à Gram + restent colorées en bleu après différenciation à l'acétone-alcool, tandis que les bactéries à Gram négatif prennent la coloration du contraste en rouge, rose par la fuchine ou la safranine.

La solution de cristal violet contient deux solutions A et B. La solution est préparée en dissolvant 2 g de cristal violet à 85% dans 20 ml d'éthanol à 95%. La solution B contient 0,2 g d'oxalate d'ammonium dans 20 ml d'eau distillée. Les solutions A et B sont mélangées à part égales. Si la solution de cristal violet s'avère trop concentrée, la diluer 10 fois avant de la mélanger à la solution B.

La solution de lugol est préparée en dissolvant 1 g de cristaux d'iode, 2 g d'iodure de potassium dans 300 ml d'eau distillée.

Le colorant de contraste est préparée en mélangeant 2,5 g de safranine dans 100 ml d'éthanol à 95%. 10 ml de cette solution sont ensuite dissouts dans 100 ml d'eau

coloration des spores selon la méthode de schaeffer-fulton: Sur une lame très propre, faire un étalement de culture bactérienne. Laisser sécher à l'air puis fixer à la chaleur (plaque chauffante ou par passages rapides, environ 20 fois, au dessus de la flamme).

Couvrir avec une solution de vert de malachite filtrée (à 10 g/100 ml d'eau). Laisser en contact pendant 10 minutes puis laver soigneusement à l'eau. Couvrir avec une solution de safranine O (à 0,25 g/100 ml d'eau), laisser reposer pendant 15 secondes. Rincer légèrement à l'eau, sécher à l'air puis examiner au microscope. Les spores sont colorées en vert et les cellules végétatives en rouge.

Les spores peuvent également être observées directement sous microscope à contraste de phase. En suspension dans l'eau distillée, les spores dormantes apparaissent réfringentes et brillantes alors que les spores germées et les cellules végétatives sont sombres.

### **7-7 Interprétation des résultats du contrôle microbiologique**

Les normes microbiologiques des pays importateurs sont utilisés par le BCPH. Toutefois et à titre d'information pour de futures références, les normes microbiologiques de l'Union européenne pour les crustacés et les mollusques cuits et les normes de l'ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications For Foods) pour tous les produits de la pêche sont citées respectivement aux tableaux 10 et 11.

**TABLEAU 10 CRITERES MICROBIOLOGIQUES DE L'UNION EUROPEENNE APPLICABLES A LA PRODUCTION DES CRUSTACES ET MOLLUSQUES CUITS\***

| Type de germe   | Norme  |
|---|--|
| pathogènes<br><i>Salmonella</i>   | Absence dans 25 grammes<br>n = 5, c = 0                  |
| 2. Germes témoins de défaut d'hygiène<br><i>Staphylococcus aureus</i>         | Norme (par gramme)<br>m = 100, M = 1000<br>n = 5, c = 2. |
| soit: coliforme thermotolérant (44°C)   | m = 10, M = 100<br>n = 5, c = 2.                         |
| soit: <i>Escherichia coli</i>   | m = 10, M = 100<br>n = 5, c = 1.                         |
| 3. Germes indicateurs (lignes directrices)                                    | Norme (par gramme)                                       |
| Bactéries aérobies mésophiles   |  |
| - Produits entiers  | m = 10000, M = 100000<br>n = 5, c = 2.                   |
| - Produits décortiqués et décoquillés<br>(à l'exception de la chair de crabe) | m = 50000, M = 500000<br>n = 5, c = 2.                   |
| - Chair de crabe  | m = 100000, M = 1000000<br>n = 5, c = 2                  |

\* Seuls les lots contenant des *Salmonella* ou dépassant M pour *Staphylococcus aureus* sont jugés inacceptables pour la consommation humaine. Un dépassement pour les autres types de germes doit inciter les responsables de l'usine à réviser ou à mettre en place un programme de surveillance plus efficace. n = nombre d'échantillons, c = nombre limite acceptable, m = seuil maximal de contamination souhaité par g, M = seuil d'innocuité par g.

**TABLEAU 11. CRITERES MICROBIOLOGIQUES PRECONISES  
PAR L'ICMSF POUR LES PRODUITS DE LA PECHE**

| Produit   | test<br>microbiologique | plan<br>d'échantillonnage | n | c | charge bactérienne<br>limite par gramme<br>ou par cm <sup>2</sup> |                 |
|---|-------------------------|---------------------------|---|---|---|-----------------|
|   |                         |                           |   |   | m   | M               |
| poisson frais ou<br>congelé                       | FMAT                    | 3 classes                 | 5 | 3 | 5x10 <sup>5</sup>   | 10 <sup>7</sup> |
|   | <i>E. coli</i>          | 3 classes                 | 5 | 3 | 11  | 500             |
| poisson fumé<br>à froid                           | FMAT                    | 3 classes                 | 5 | 3 | 5x10 <sup>5</sup>   | 10 <sup>7</sup> |
|   | <i>E. coli</i>          | 3 classes                 | 5 | 3 | 11  | 500             |
| poisson pané<br>pré-cuit                          | FMAT                    | 3 classes                 | 5 | 2 | 5x10 <sup>5</sup>   | 10 <sup>7</sup> |
|   | <i>E. coli</i>          | 3 classes                 | 5 | 2 | 11  | 500             |
| crustacés crus<br>congelés                        | FMAT                    | 3 classes                 | 5 | 3 | 10 <sup>6</sup>   | 10 <sup>7</sup> |
|   | <i>E. coli</i>          | 3 classes                 | 5 | 3 | 11  | 500             |
| Crustacés cuits<br>congelés                       | FMAT                    | 3 classes                 | 5 | 2 | 5x10 <sup>5</sup>   | 10 <sup>7</sup> |
|   | <i>E. coli</i>          | 3 classes                 | 5 | 2 | 11  | 500             |
|   | <i>S. aureus</i>        | 2 classes                 | 5 | 0 | 10 <sup>3</sup>   | -               |
| chair de crabe<br>cuite réfrigérée<br>ou congelée | FMAT                    | 3 classes                 | 5 | 2 | 10 <sup>5</sup>   | 10 <sup>6</sup> |
|   | <i>E. coli</i>          | 3 classes                 | 5 | 1 | 11  | 500             |
|   | <i>S. aureus</i>        | 2 classes                 | 5 | 0 | 10 <sup>3</sup>   | -               |
| mollusques bivalves<br>frais ou congelés          | FMAT                    | 2 classes                 | 5 | 0 | 5x10 <sup>5</sup>   | -               |
|   | <i>E. coli</i>          | 2 classes                 | 5 | 0 | 16  | -               |

ICMSF: Commission Internationale pour les Spécifications Microbiologiques pour les aliments. FMAT: Flore mésophile aérobie totale à 21-25°C. n = nombre d'échantillons, c = nombre limite acceptable, m = seuil maximal de contamination souhaité par g ou par cm<sup>2</sup> de peau, M = seuil d'innocuité par g ou par cm<sup>2</sup> de peau.

## ANNEXE

### Milieux de culture

#### 1. NUMERATION DE LA FLORE AEROBIE TOTALE

##### Plate count agar (PCA) (Flore aérobie totale)

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Tryptone          | 5 g     |
| Extrait de levure | 2,5 g   |
| Glucose           | 1 g     |
| Agar              | 20 g    |
| Eau distillée     | 1 litre |

pH: 7,0 ± 0,2 à 25°C. Stériliser pendant 15 mn à 121°C.

#### 2. RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES COLIFORMES

##### Gélose au désoxycholate

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Peptone                 | 10 g    |
| Lactose                 | 10 g    |
| Désoxycholate de sodium | 0,5 g   |
| NaCl                    | 5 g     |
| Citrate de sodium       | 2 g     |
| Rouge neutre            | 0,03 g  |
| Agar                    | 20 g    |
| Eau distillée           | 1 litre |

pH: 7,3 à 25°C. Le milieu n'est pas autoclavable.

##### Eosine Methylene Blue (EMB) de levine

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Peptone de viande          | 10 g    |
| Lactose                    | 10 g    |
| phosphate dipotassique     | 2 g     |
| Eosine jaunâtre (Eosine y) | 0,4 g   |
| Bleu de méthylène          | 0,067 g |
| Agar                       | 20 g    |
| Eau distillée              | 1 litre |

pH: 7,1 à 25°C

Stériliser à 121°C pendant 15 mn.

##### Bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB)

|                 |          |
|-----------------|----------|
| Peptone         | 10 g     |
| Lactose         | 10 g     |
| Bile déshydraté | 20 g     |
| Vert brillant   | 0,0133 g |
| Eau distillée   | 1 litre  |

pH: 7,2 ± 0,2 à 25°C. Stériliser pendant 15 mn à 121°C.

**Bouillon Lauryl tryptose**

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Tryptose                  | 20 g   |
| Lactose                   | 5 g    |
| NaCl                      | 5 g    |
| Sulfate de Lauryl sodique | 0,1 g  |
| Phosphate dipotassique    | 2,75 g |
| Phosphate monopotassique  | 2,75 g |

pH:  $6,8 \pm 0,1$  à 25°C. Stériliser pendant 15 mn à 121°C.

**Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre**

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Peptone           | 7 g     |
| Extrait de levure | 3 g     |
| Lactose           | 10 g    |
| NaCl              | 5 g     |
| Sels biliaires    | 1,5 g   |
| Rouge neutre      | 0,03 g  |
| Cristal violet    | 0,002 g |
| Agar              | 20 g    |
| Eau distillée     | 1 litre |

pH: 7,3 à 25°C. Le milieu n'est pas autoclavable.

**Milieu EC**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Tryptose                 | 20 g  |
| Lactose                  | 5 g   |
| Sels biliaires           | 1,5 g |
| Phosphate dipotassique   | 4 g   |
| Phosphate monopotassique | 1,5 g |
| NaCl de sodium           | 5 g   |

pH:  $6,9 \pm 0,2$  à 25°C. Stériliser pendant 15 mn à 121°C.

**Bouillon au rouge de méthyle de Voges Proskauer (MRVP)**

|                        |     |
|------------------------|-----|
| Peptone                | 7 g |
| D(+)-glucose           | 5 g |
| Phosphate dipotassique | 5 g |

pH:  $6,9 \pm 0,2$  à 25°C. Stériliser pendant 15 mn à 121°C.

**Bouillon au citrate de Koser**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Ammoniophosphate de sodium | 1,5 g   |
| Phosphate monopotassique   | 1 g     |
| Sulfate de magnésium       | 0,2 g   |
| Citrate de sodium          | 3 g     |
| Eau distillée              | 1 litre |

pH:  $6,7 \pm 0,2$  à 25°C. Stériliser pendant 15 mn à 121°C.

### 3. RECHERCHE DES SALMONELLES

#### Gélose bismuth sulfite

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Extrait de viande             | 5 g     |
| Peptone                       | 10 g    |
| D(+) glucose                  | 5 g     |
| Sulfate ferreux               | 0,3 g   |
| Phosphate dissodique          | 4 g     |
| Vert brillant                 | 0,025 g |
| Sulfite de bismuth indicateur | 8 g     |
| Agar                          | 20 g    |

pH: 7,7 à 25°C. Le milieu n'est pas autoclavable.

#### Xylose lactose desoxycholate (XLD)

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Extrait de viande           | 3 g     |
| L-Lysine                    | 5 g     |
| Xylose                      | 3,75 g  |
| Lactose                     | 7,5 g   |
| Saccharose                  | 7,5 g   |
| Désoxycholate de sodium     | 2,5 g   |
| Citrate ferrique d'ammonium | 0,8 g   |
| Thiosulfate de sodium       | 6,8 g   |
| NaCl                        | 5 g     |
| Rouge de phénol             | 0,08 g  |
| Agar                        | 20 g    |
| Eau distillée               | 1 litre |

pH: 7,4 ± 0,2 à 25°C. Le milieu n'est pas autoclavable.

#### Milieu Hektoen

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Proteose peptone            | 12 g    |
| Extrait de levure           | 3 g     |
| Lactose                     | 12 g    |
| Sucrose                     | 12 g    |
| Salicine                    | 2 g     |
| Complexe bile               | 9 g     |
| NaCl                        | 5 g     |
| Thiosulfate de sodium       | 5 g     |
| Citrate ferrique d'ammonium | 1,5 g   |
| Bleu de bromothymol         | 0,065 g |
| Fushine acide               | 0,1 g   |
| Agar                        | 20 g    |
| Eau distillée               | 1 litre |

pH: 7,5 ± 0,2 à 25°C. Le milieu n'est pas autoclavable.

**Gélose triple sugar iron (TSI)**

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Peptone                   | 15 g    |
| Extrait de viande         | 3 g     |
| Extrait de levure         | 3 g     |
| NaCl                      | 5 g     |
| Glucose                   | 1 g     |
| Lactose                   | 10 g    |
| Saccharose                | 10 g    |
| Citrate de fer ammoniacal | 0,5 g   |
| Thiosulfate de sodium     | 0,5 g   |
| Rouge de phénol           | 0,025 g |
| Agar                      | 20 g    |
| Eau distillée             | 1 litre |

pH:  $7,3 \pm 0,2$  à 25°C. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

**Gélose lysine iron agar (LIA)**

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Peptone                     | 5 g     |
| Extrait de levure           | 3 g     |
| Glucose                     | 1 g     |
| L-Lysine                    | 10 g    |
| Citrate ferrique d'ammonium | 0,5 g   |
| Thiosulfate de sodium       | 0,04 g  |
| Pourpre de bromocrésol      | 0,02 g  |
| Agar                        | 20 g    |
| Eau distillée               | 1 litre |

pH:  $6,7 \pm 0,2$  à 25°C. Stériliser pendant 15 mn à 121°C.

**Gélose de M<sup>A</sup>cCONKEY**

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Peptone de caseine | 17 g    |
| Peptone de viande  | 3 g     |
| Lactose            | 10 g    |
| Sels biliaires     | 1,5 g   |
| NaCl               | 5 g     |
| Rouge neutre       | 0,03 g  |
| Cristal violet     | 0,001 g |
| Agar               | 20 g    |
| Eau distillée      | 1 litre |

pH:  $7,1 \pm 0,2$  à 25°C. Stériliser pendant 15 mn à 121°C.

**Gélose Urée**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Peptone                  | 1 g     |
| Glucose                  | 1 g     |
| NaCl                     | 5 g     |
| Phosphate monopotassique | 2 g     |
| Rouge de phénol          | 0,012 g |
| Agar                     | 20 g    |
| Eau distillée            | 950 ml  |

pH:  $6,8 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$  puis ajouter 50 ml d'urée à 40% préalablement stérilisée par filtration.

**Milieu gelosé au citrate de Simmons**

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Phosphate monoammonique | 1 g     |
| Phosphate dipotassique  | 1 g     |
| NaCl                    | 5 g     |
| Citrate de sodium       | 2 g     |
| Sulfate de magnésium    | 0,2 g   |
| Bleu de bromothymol     | 0,08 g  |
| Agar                    | 20 g    |
| Eau distillée           | 1 litre |

pH:  $6,9 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$ .

**Gélose nutritive**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Extrait de viande de boeuf | 3 g     |
| Peptone                    | 5 g     |
| Agar                       | 20 g    |
| Eau distillée              | 1 litre |

pH:  $6,8 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$ .

**Gélose Lactosée au vert brillant**

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Extrait de levure                   | 3 g     |
| Proteose peptone N°3 ou polypeptone | 10 g    |
| NaCl                                | 5 g     |
| Lactose                             | 10 g    |
| Saccharose                          | 10 g    |
| Rouge de phénol                     | 0,08 g  |
| Vert brillant 0,25% solution        | 5 ml    |
| Agar                                | 20 g    |
| Eau distillée                       | 1 litre |

pH:  $6,9 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$

**Bouillon Lactosé**

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Extrait de viande | 3 g     |
| Peptone           | 5 g     |
| Lactose           | 5 g     |
| Eau distillée     | 1 litre |

pH:  $6,9 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$ .

**Bouillon nutritif**

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Extrait de viande | 3 g     |
| Peptone           | 5 g     |
| Eau distillée     | 1 litre |

pH:  $6,7 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$ .

**Bouillon sélénite cysteine**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Polypeptone ou tryptose  | 5 g     |
| Lactose                  | 4 g     |
| Sélénite acide de sodium | 4 g     |
| Phosphate disodique      | 5,5 g   |
| Phosphate monopotassique | 4,5 g   |
| L-cysteine               | 1 ml    |
| Eau distillée            | 1 litre |

pH:  $7 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Le milieu n'est pas autoclavable.

**Bouillon au Malonate**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Extrait de levure        | 1 g     |
| Sulfate d'ammonium       | 2 g     |
| Phosphate monopotassique | 0,4 g   |
| Phosphate bipotassique   | 0,6 g   |
| NaCl                     | 2 g     |
| Malonate de sodium       | 6 g     |
| Bleu de bromothymol      | 0,025 g |
| Eau distillée            | 1 litre |

pH: 6,1 - 6,2 (jaune vert). Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$ .

**Bouillon au Tetrathionate de sodium et vert brillant**Milieu de base:

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Polypeptone ou proteose peptone | 5 g     |
| Sels biliaries                  | 1 g     |
| Carbonate de calcium            | 10 g    |
| Thiosulfate de Na               | 30 g    |
| Eau distillée                   | 1 litre |

Solution d'iode:

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Iode                | 6 g   |
| Iodure de potassium | 5 g   |
| Eau distillée       | 20 ml |

Chauffer le milieu de base pour dissoudre les ingrédients et refroidir à 45°C. Puis ajouter 20 ml de la solution d'iode et 10 ml d'une solution de vert brillant (1 pour 1000) à 1 litre de milieu de base. Répartir en tubes à essai et stériliser à 121°C pendant 15 mn.

**Bouillon au dulcitol** (voir recherche de Vibrio)

**4. RECHERCHE ET ENUMERATION DES STAPHYLOCOQUES****Milieu de Baird Parker**Milieu de base:

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Extrait de viande   | 5 g     |
| Peptone de caseine  | 10 g    |
| Extrait de levure   | 1 g     |
| Pyruvate de sodium  | 10 g    |
| Glycocolle          | 12 g    |
| Chlorure de lithium | 5 g     |
| Agar                | 20 g    |
| Eau distillée       | 1 litre |

pH: 6,8 ± 0,2 à 25°C. Stériliser pendant 15 mn à 121°C.

A 100ml de milieu de base, on ajoute 1 ml d'une solution stérile à 1% de tellurite de potassium et 5 ml d'emulsion stérile de jaune d'oeuf.

**Gélose tellurite polymyxine jaune d'oeuf**Milieu de base:

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Tryptone            | 10 g    |
| Extrait de levure   | 5 g     |
| Mannitol            | 5 g     |
| NaCl                | 20 g    |
| Chlorure de lithium | 2 g     |
| Gélose              | 18 g    |
| Eau distillée       | 1 litre |

Mettre les ingrédients en suspension dans l'eau distillée. Chauffer à ébullition en agitant. Ajuster le volume à 900 ml avec l'eau distillée et le pH à 7,2 ± 0,2. Répartir en flacons et stériliser à 121°C pendant 15 mn.

**Milieu d'enrichissement:** Emulsion de jaune d'oeuf à 30% (v/v) dans l'eau physiologique.

Tremper des oeufs pendant une mn dans une solution de chlorure mercurique saturée. Casser les oeufs aseptiquement et séparer le jaune du blanc. Mettre le jaune d'oeuf en suspension dans une solution saline à 0,85% de NaCl de façon à obtenir une émulsion à 30% (v/v) et bien homogénéiser pendant 5 sec.

**Milieu complet:**

Refroidir le milieu de base à 50-55°C dans un bain marie. A 900 ml de milieu de base, ajouter successivement 100 ml de milieu d'enrichissement, 0,4 ml d'une solution de polymyxin B à 1% préalablement stérilisée par filtration et 10 ml d'une solution de tellurite de potassium à 1% stérile. Le pH final est de  $7,2 \pm 0,1$ .

**Milieu 110 au jaune d'oeuf pour staphylocoques**

**Milieu de base:**

|                        |       |
|------------------------|-------|
| Extrait de levure      | 2,5 g |
| Tryptone               | 10 g  |
| Gélatine               | 30 g  |
| Lactose                | 2 g   |
| D-mannitol             | 10 g  |
| NaCl                   | 75 g  |
| Phosphate dipotassique | 5 g   |
| Gélose                 | 15 g  |

**Milieu d'enrichissement:** Emulsion de jaune d'oeuf.

Tremper un oeuf pendant 2 h dans une solution d'éthanol à 70%. Rinsé à l'eau distillée stérile. Casser l'oeuf aseptiquement et séparer le jaune du blanc. Filtrer sur 4 couches de gaze stérile et mettre le jaune d'oeuf en suspension dans 100 ml de bouillon coeur-cerveille stérile. Mélanger en agitant doucement et stocker au réfrigérateur jusqu'à utilisation.

**Milieu complet:**

Ajouter aseptiquement, à raison de 10% (v/v), l'émulsion de jaune d'oeuf au milieu de base fondu et refroidi à 50°C environ. Répartir en boîtes de Petri et laisser solidifier.

**Milieu gélosé à l'ADN et au bleu de Toluidine**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Acide désoxyribonucleique (ADN) | 0,3 g  |
| Chlorure de calcium             | 1,1 mg |
| NaCl                            | 10 g   |
| Bleu de Toluidine               | 83 mg  |

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Tris hydroxyméthyle aminométhane | 6,1 g   |
| Agar                             | 10 g    |
| Eau distillée                    | 1 litre |

pH:  $9 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . le milieu n'est pas autoclavable.

### Bouillon coeur - cervelle

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Extrait coeur - cervelle         | 17,5 g  |
| Peptone pancréatique de gélatine | 10 g    |
| NaCl                             | 5 g     |
| Phosphate dissodique             | 2,5 g   |
| Glucose                          | 2 g     |
| Eau distillée                    | 1 litre |

pH:  $7,4 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$ .

### Gélose renforcée pour Clostridies (RCA)

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Tryptone                      | 10 g    |
| Extrait de viande             | 10 g    |
| Extrait autolytique de levure | 3 g     |
| Chlorhydrate de cystéine      | 0,5 g   |
| Glucose                       | 5 g     |
| Amidon soluble                | 1 g     |
| NaCl                          | 5 g     |
| Acétate de sodium             | 3 g     |
| Agar                          | 20 g    |
| Eau distillée                 | 1 litre |

pH:  $6,8 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$ .

### Bouillon au Thioglycollate

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Extrait de levure        | 5 g     |
| Casitone bactériologique | 15 g    |
| Glucose                  | 5,5 g   |
| NaCl                     | 2,5 g   |
| L - cystéine             | 0,5 g   |
| Thioglycollate de sodium | 0,5 g   |
| Agar                     | 0,75 g  |
| Resazurine               | 0,001 g |
| Eau distillée            | 1 litre |

pH:  $7,1 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Stériliser pendant 15 mn à  $121^{\circ}\text{C}$ .

## Diluants, réactifs et colorants

### Eau physiologique

|               |         |
|---------------|---------|
| NaCl          | 8,5 g   |
| Eau distillée | 1 litre |

Stériliser pendant 15 mn à 121 °C.

### Solution saline à 20%

|               |        |
|---------------|--------|
| NaCl          | 20 g   |
| Eau distillée | 100 ml |

Stériliser pendant 15 mn à 121 °C.

### Eau Peptonée à 0,1%

|               |        |
|---------------|--------|
| Peptone       | 0,1 g  |
| Eau distillée | 100 ml |

Stériliser à l'autoclave 15 mn à 121 °C.

### Solution saline peptonée

|               |         |
|---------------|---------|
| Peptone       | 10 g    |
| NaCl          | 30 g    |
| Eau distillée | 1 litre |

pH:  $7,2 \pm 0,2$  à 25 °C. Stériliser pendant 15 mn à 121 °C.

### Tampon phosphate

#### Solution stock de tampon phosphate

|   |        |
|---|--------|
| Phosphate de potassium $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 34 g   |
| Eau distillée                                   | 500 ml |

Ajuster le pH à 7,2 avec NaOH 1 N (généralement 175 ml). Compléter à 1 litre avec l'eau distillée.

Le diluant au tampon phosphate contiendra

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| solution stock de tampon phosphate | 1,25 ml |
| Eau distillée (compléter avec)     | 1 litre |

Stériliser pendant 15 mn à 121 °C.

**Réactif de Kovacs**

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| Para-dimethyl amine-benzaldehyde | 5 g   |
| Alcool amylique                  | 75 ml |
| Acide chlorhydrique concentré    | 25 ml |

**Réactifs pour MR et VP**

## Réaction au rouge de méthyle (MR)

|                  |        |
|------------------|--------|
| Rouge de méthyle | 0,10 g |
| Ethanol à 95°C   | 300 ml |
| Eau distillée    | 200 ml |

## Réaction de Voges-Proskauer (VP)

|                |        |
|----------------|--------|
| Solution A:    |        |
| a-Naphthol     | 5 g    |
| Ethanol absolu | 100 ml |

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Solution B:     |        |
| Soude caustique | 16 g   |
| Eau distillée   | 100 ml |

**Test de l'oxydase**

|  |        |
|--|--------|
| Monochlorure de para-amino<br>diméthylphénylènediamine | 1 g    |
| Eau distillée  | 100 ml |

Cette solution ne doit pas être stockée pendant longtemps.

**Recherche de la phosphatase**

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Solution A:          |         |
| Acétate de potassium | 2,025 g |
| Eau distillée        | 250 ml  |

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Solution B:                      |        |
| Nitro-phényl phosphate disodique | 4 g    |
| Eau distillée                    | 100 ml |

**Coloration de Gram**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Solution A:          |       |
| Cristal violet à 85% | 2 g   |
| Ethanol à 95%        | 20 ml |

**Solution B:**

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Oxalate d'ammonium | 0,2 g |
| Eau distillée      | 20 ml |

La solution de cristal violet est le mélange des solutions A et B.

**solution de lugol:**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Iode                     | 1 g    |
| Iodure de potassium (KI) | 2 g    |
| Eau distillée            | 300 ml |

**Alcool acétone:**

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Alcool éthylique à 95 % | 200 ml |
| Acétone                 | 100 ml |

Solution de safranine: dissoudre 2,5 g de safranine dans 100 ml d'éthanol à 95%, prélever 10 ml du mélange et le diluer dans 100 ml d'eau distillée.

**Coloration des spores selon Schaffer-Fulton****Solution de vert de Malachite:**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Vert de malachite | 10 g   |
| Eau distillée     | 100 ml |

**Solution de safranine:**

|               |        |
|---------------|--------|
| Safranine     | 0,25 g |
| Eau distillée | 100 ml |