

50376  
1980  
68

N° d'ordre : 106

50376  
1980  
68

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

par

Pierre MALLE

## LE FUMAGE A FROID DU SAUMON ASPECTS MICROBIOLOGIQUES



Soutenue le 19 septembre 1980 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury	MM. J. GUILLAUME	Président
	R. TAILLIEZ	Rapporteur
	C. ROMOND	
	C. SERAIN	Examineurs

A LA MEMOIRE DE MON PERE,

A MA FEMME,

L

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire des Services Vétérinaires de Boulogne-sur-Mer, les expérimentations nécessitant un traitement par la fumée ont été effectuées dans l'atelier de fumage des établissements PRODALUX.

Ce travail a été effectué sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME, Directeur de l'U.E.R. des Sciences Agricoles et Alimentaires de Lille, que nous remercions vivement, et avec les conseils constants de Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ, du Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Nous tenons à leur exprimer toute notre gratitude et notre profond respect.

Nous sommes reconnaissant à Monsieur le Professeur C. ROMOND de la Faculté de Pharmacie de Lille, pour l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter de juger ce travail.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Monsieur le Docteur C. SERAIN, Contrôleur Général des Services Vétérinaires des régions Nord - Pas-de-Calais - Picardie, qui nous fait l'honneur de faire partie de notre Jury.

Nous tenons à remercier les responsables des Services Vétérinaires d'Hygiène Alimentaire, tout particulièrement Monsieur le Docteur Y. LAGOIN, Chef du Bureau des Produits de la Pêche à la Direction de la Qualité, des encouragements qu'ils nous ont prodigués tout au long de ce travail ou des facilités qu'ils nous ont accordées pour sa réalisation.

Nous remercions les membres du Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, en particulier Messieurs Ph. EB et M. WERQUIN, Maîtres Assistants, pour leur amicale collaboration.

Nos remerciements s'adressent également au personnel du Laboratoire des Services Vétérinaires de Boulogne-sur-Mer, notamment à Mademoiselle S. LEBORGNE pour sa collaboration technique, ainsi qu'aux membres du Service d'Inspection des Produits de la Pêche et à Monsieur le Docteur M. PINTEAUX, nous les assurons de toute notre sympathie.

Nous avons toujours reçu le meilleur accueil dans les établissements de la Société PRODALUX, nous en remercions vivement Monsieur L. CAUSSE et son personnel.

Nous exprimons notre gratitude à Madame BONNIER pour son aide précieuse.

Enfin, que ceux dont l'affection nous a soutenu et encouragé trouvent ici l'expression de notre reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

<u>I - GÉNÉRALITÉS</u>	1
1. Constitution et décomposition thermique du bois	1
2. Composition de la fumée	4
3. Propriétés de la fumée	9
<u>II - MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	14
1. Souches bactériennes	14
2. Milieux de culture	15
2.1. <i>Milieux solides</i>	15
2.1.1. Milieux sélectifs	15
2.1.2. Milieu minimum	18
2.2. <i>Milieux liquides</i>	19
3. Substances chimiques	22
4. Matière première	26
5. Fumoir	28
5.1. <i>Générateur de fumée</i>	28
5.2. <i>Cellule de fumage</i>	28
5.3. <i>Réglages</i>	29
6. Techniques de dénombrement et d'identification	32
6.1. <i>Techniques de dénombrement</i>	32
6.1.1. Dénombrement des bactéries aérobies	32
6.1.2. Dénombrement des bactéries anaérobies	34

6.2. Techniques d'identification	35
6.2.1. Identification des Entérobactéries	35
6.2.2. Identification des Lactobacilles	36
6.2.3. Identification des Anaérobies	37
7. Techniques d'exposition des bactéries à l'action de la fumée	38
7.1. Procédés permettant l'action directe	38
7.1.1. Cas des bactéries ensemencées en profondeur	38
7.1.2. Cas des bactéries ensemencées en surface	39
7.2. Procédés permettant l'action indirecte	40
7.2.1. Cas des bactéries ensemencées en profondeur	40
7.2.2. Cas des bactéries ensemencées en surface	41
8. Technique de détermination de l'action bactéricide ou bactériostatique de la fumée	42
9. Techniques permettant de mettre en évidence l'influence du tissu musculaire sur l'action de la fumée	44
9.1. Action directe de la fumée	44
9.2. Action indirecte de la fumée	45
10. Techniques permettant d'étudier l'influence des substances biologiques sur l'action de la fumée	46

### III - RÉSULTATS ET COMMENTAIRES 48

1. Evolution qualitative et quantitative de la flore bactérienne du saumon au cours du fumage	48
1.1. Dénombrements	48
1.1.1. Résultats	48
1.1.2. Commentaires	50

1.2. <i>Identifications</i>	57
1.2.1. Résultats	57
1.2.2. Commentaires	59
2. Sensibilité des bactéries à l'action de la fumée	60
2.1. <i>Action directe de la fumée</i>	60
2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	60
2.1.1.1. Milieu sélectif	60
2.1.1.2. Milieu minimum	61
2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	63
2.1.3. Commentaires	63
2.2. <i>Action indirecte de la fumée</i>	69
2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	69
2.1.1.1. Milieu sélectif	69
2.1.1.2. Milieu minimum	72
2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	73
2.2.3. Commentaires	74
2.3. <i>Détermination de l'action bactéricide ou bactériostatique de la fumée</i>	82
2.3.1. Exposition de cultures pures de bactéries à l'action indirecte de la fumée	83
2.3.2. Expérience de détermination de l'action de la fumée	85
2.3.3. Commentaires	86
3. Influence des substances biologiques sur l'action de la fumée	88
3.1. <i>Influence du tissu musculaire</i>	88
3.1.1. Comparaison de l'action directe de la fumée sur des bactéries en suspension dans de l'eau salée et sur des bactéries en suspension dans un broyat de saumon	88

3.1.2. Comparaison de l'action des composants de la fumée dissous dans une gélose blanche et de celle des composants dissous dans une gélose additionnée d'un broyat de saumon	89
3.1.3. Commentaires	93)
3.2. <i>Influence de diverses substances pouvant être présentes dans le muscle</i>	95
3.2.1. Etude de l'influence de diverses substances sur l'action de la fumée	95
3.2.1.1. Albumine	96
3.2.1.2. Acides aminés	97
3.2.1.3. Peptone	100
3.2.1.4. Ammoniaque	104
3.2.1.5. Créatine	105
3.2.1.6. Putrescine	107
3.2.1.7. Cadavérine	108
3.2.1.8. Lipides	110
3.2.1.9. Glucose	111
3.2.1.10. Chlorure de sodium	112
3.2.2. Etude comparative de diverses substances	113
3.2.2.1. Glucose et Glucosamine	113
3.2.2.2. Albumine, Acides Aminés, Caséine, Peptone et Putrescine	114
3.2.3. Commentaires	116

IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

119

BIBLIOGRAPHIE

I

ANNEXE 1 - TECHNOLOGIE DU FUMAGE DU SAUMON

X

ANNEXE 2 - RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS EFFECTUÉS AVANT ET  
APRÈS FUMAGE

XV

I - G E N E R A L I T E S

Le fumage est une technique appliquée depuis les temps les plus anciens pour assurer la conservation du poisson. La combinaison des actions respectives du sel et de la fumée sur les denrées alimentaires d'origine animale est une méthode ancestrale : ainsi l'histoire nous apprend que chez les Egyptiens, les Grecs, les Romains, le commerce du poisson séché, salé et fumé se pratiquait déjà.

Le fumage consiste à imprégner les tissus du poisson, préalablement salé et séché, de substances empyreumatiques contenues dans la fumée que fournit la combustion lente de copeaux ou de sciure de bois. A l'origine, ce procédé était employé pour améliorer la qualité microbologique d'un produit, mais ultérieurement, lorsque d'autres modes de conservation sont apparus, c'est essentiellement pour améliorer les qualités organoleptiques que le fumage a été utilisé.

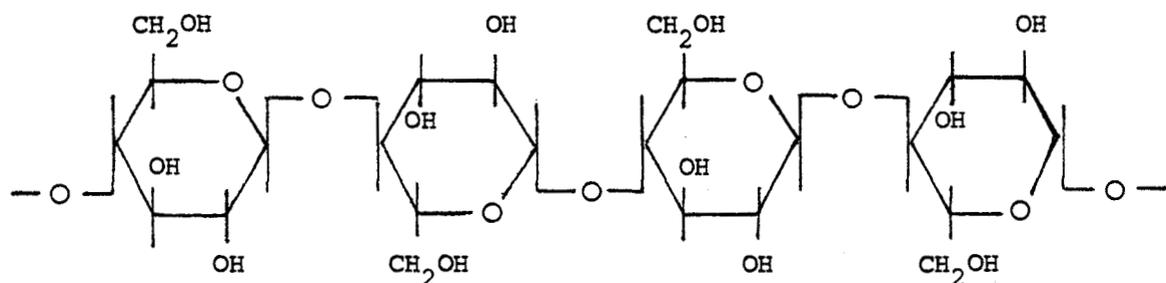
## 1. CONSTITUTION ET DÉCOMPOSITION THERMIQUE DU BOIS

La composition chimique et les propriétés de la fumée varient en fonction des essences de bois employées (59). On admet généralement qu'une fumée provenant de la combustion d'un bois dur donne un produit fumé de meilleure qualité (42) : ainsi, le hêtre, le chêne, l'orme et le frêne assureraient à la denrée fumée une conservation plus longue que l'aulne, le bouleau, le saule. Les industriels français ont choisi le chêne ou le hêtre ; il est à noter toutefois que dans certains pays comme l'URSS, l'Allemagne, le Canada, l'Ecosse, des copeaux de bois tendre ou même de la

tourbe et parfois des feuilles sont utilisés avec succès. Les bois des résineux sont à proscrire, ils dégagent une fumée contenant des substances aromatiques qui, en s'infiltrant dans les tissus du poisson, lui communiquent une saveur âcre et désagréable, et une odeur marquée d'essence de térébenthine. Certains auteurs (13) précisent que l'addition de bois de genévrier est cependant conseillée. De plus, on peut ajouter à la sciure des plantes aromatiques : sauge, thym ou marjolaine, tout ceci dépend de la saveur que l'on veut donner au poisson (12).

Les trois constituants essentiels du bois sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. L'importance relative de chaque polymère varie avec les essences de bois, mais on peut considérer qu'on les trouve dans les proportions approximatives suivantes : cellulose = 2, hémicellulose = 1, lignine = 1. Les principaux constituants de la fumée proviennent de la décomposition thermique de ces composés suivie d'une oxydation des produits résultant de cette décomposition (22).

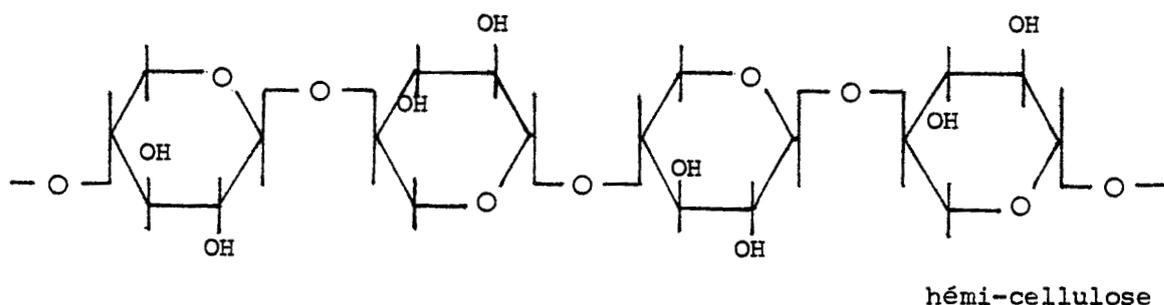
#### PYROLYSE DE LA CELLULOSE :



cellulose

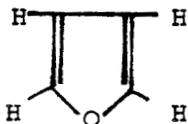
La réaction initiale semble être une hydrolyse acide en glucose, suivie d'une déshydratation. Une pyrolyse secondaire s'effectue immédiatement, produisant de l'acide acétique et ses homologues, ainsi que de l'eau, pour s'en tenir aux constituants essentiels.

### PYROLYSE DE L'HEMI-CELLULOSE



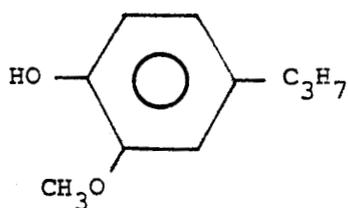
Les hémicelluloses sont les moins thermostables des constituants du bois et se décomposent facilement pour produire du furanne (\*) et ses dérivés en même temps qu'une série d'acides carboxyliques aliphatiques.

(\*) furanne =

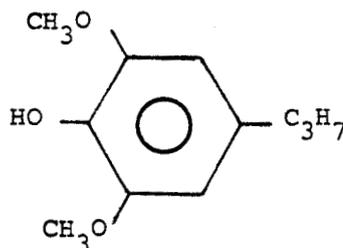


### PYROLYSE DE LA LIGNINE

Les structures de la lignine ne sont pas encore parfaitement connues, mais on sait qu'elle est formée de deux édifications principales : un gaiacyl propane 3 et un syringyl propane 4 :



gaiacyl propane 3



syringyl propane 4

Les composés estimés être de la plus grande importance dans le goût de "fumée" proviennent de cette fraction. Ce sont des phénols et des éthers phénoliques, représentés par le gaïacol (2-methoxyphénol) et le syringol (2,6-dimethoxyphénol), et leurs homologues et dérivés.

## 2. COMPOSITION DE LA FUMÉE

La distillation du bois telle qu'elle se fait dans les fumoirs est une pyrogénéation en vase clos, mais les produits de distillation sont en grande partie combustibles. On retrouvera donc dans les fumées les substances provenant de leur oxydation, substances d'autant plus abondantes que la combustion se sera faite en présence d'une plus grande quantité d'air : si l'air est abondant, l'oxydation des produits sera complète et il y aura peu de fumée ; si l'air est moins abondant, l'oxydation sera incomplète et la production de fumée plus importante (26).

Ainsi, il apparait que la composition chimique de la fumée est fonction de l'énorme variabilité des conditions de production de la fumée, c'est-à-dire :

- le pourcentage d'air entrant dans la combustion,
- la température à laquelle la fumée est produite,
- la proportion d'eau dans les copeaux ou la sciure,
- l'essence du bois.

## ACIDES

Formique	Octanoïque	2-Methylbutyrique
Acétique	Levulinique	2-Methylpropenoïque
Propionique	Tiglique	2-Methylpentonique
Butyrique	Benzoïque	4-Methylpentonique
Pentanoïque	Vanillique	2-Methyl-2-butenoïque
Hexanoïque	Syringique	3-Methyl butyrique

## ALCOOLS ET ESTERS

Ethanol	Acetol acetate	Methyl acrylate
Methanol	Methyl acetate	Ethyl benzoate
Iso Propanol	Methyl formate	Cresyl acetate

## COMPOSES A FONCTION CARBONYLE

Acétone	2,5-Hexanedione	2-Propenal
2-Butanone	2,3-Propanedione	2-Butenal
2-Pentanone	1,2-Cyclopentanedione	2-Methyl-2-Butenal
3-Pentanone	3,4 Dimethyl-1,2-Cyclo-	Benzaldéhyde
2-Hexanone	-pentanedione	2-Furfurylmethyl-Ketone
3-Hexanone	3-Ethyl-1,2-Cyclopentanedione	2-Cyclohexanone
3-Methyl-3-butène-2-one	2,5-Dimethyl-4-hydroxy	1-Hydroxy-2-butanone
3-Methyl-2-butanone	-3-(2 H)-furanone	3-Methyl-2-Cyclopentène-1-one
4-Methyl-3-pentanone	Formaldéhyde	2-Methyl-2-Cyclopentenone
3,3-Dimethyl-2-Butanone	Acétaldéhyde	2,3-Dimethyl-2-Cyclopentanone
Acetophenone	Propionaldéhyde	3-Methyl-1,2-Cyclopentane-dione
2-Furfural	Butanal	3-Butène-2-one
5-Methyl-2-Furfural	ISO Butanal	3-Hydroxy-2-methyl-4-pyrone
2,3-Butanedione	Pentanal	
2,3-Pentanedione	Iso Pentanal	

## FURANNES

Furanne	2-Methylbenzofuranne	$\beta$ -Angelicalactone
2-Methylfuranne	Dimethylbenzofuranne	$\gamma$ -Crotonolactone
2-Ethylfuranne	-Lactones	
2-Acetylfuranne	$\gamma$ -Butyrolactone	

## DIVERS

1,2-Dimethoxybenzène	3-Methoxycatéchol	Dimethylindane
1,4-Dimethoxybenzène	Indène	Naphtalène
1,2-Dimethoxy-4-methyl	3-Methylindène	3-Methylnaphtalane
-benzène	Toluène	
Benzène	Styrène	

TABLEAU I : COMPOSES VOLATILS IDENTIFIES DANS LA FUMEE DE BOIS ET DANS LES FUMÉES LIQUIDES.

L'analyse chimique fait donc apparaître de grandes variations qualitatives et quantitatives ; l'action combinée de la distillation et de la combustion donne un mélange complexe de composés aliphatiques et aromatiques parmi lesquels :

- de l'eau ;
- de l'hydrogène, du monoxyde de C (CO), du dioxyde de C (CO<sub>2</sub>), différents carbures d'hydrogène ;
- des acides : formique, acétique, propionique et butyrique ;
- des alcools : méthanol, éthanol ;
- des composés à fonction carbonyle : acetaldéhyde, formaldéhyde, acétone, diacétyl, furfural, vanilline ;
- des dérivés phénoliques :
  - . dérivés méthyles : 3,4 et 3,5 diméthyl phénol ; 2,6 dimethoxy-pyrogallol ; 2,6 - 3,4 et 3,5 xylénol ; 3 crésols ;
  - . éther-oxydes : galacol, vératrol, anisol ;
  - . les mélanges de phénols et d'éther méthylique des diphé-nols constituant la créosote.

Le TABLEAU I présente un relevé de l'ensemble des composés volatils identifiés dans la fumée de bois et dans les fumées liquides, relevé établi par GILBERT et KNOWLES (21).

En plus des composés acides, alcooliques, carbonyles et phénoliques, des hydrocarbures polycycliques comprenant jusqu'à 200 composés différents ont été décelés dans la fumée, dont le 3,4-benzopyrène connu pour ses propriétés cancérigènes (38, 39, 58). Des expériences récentes (36)

montrent que le fumage à froid du saumon, technique la plus usitée (tout au moins en France), entraîne une contamination en 3,4-benzopyrène 8 à 9 fois moindre que celle du fumage à chaud. Des expériences effectuées sur les saucisses de Francfort (53) ont permis de constater une pénétration de 70 à 80 % des hydrocarbures polycycliques aromatiques lorsqu'elles sont fumées dans un étui de "boyau" naturel, ce taux descendant à 30 % lorsque le boyau est remplacé par la cellulose ou une enveloppe synthétique. Une autre méthode (64) permettant d'obtenir une réduction significative de ces composés consiste à faire passer la fumée dans un filtre de coton avant son contact avec le produit.

Par ailleurs, certains procédés de fumage permettent de diminuer considérablement le taux de ces substances cancérigènes.

Ainsi, dans le procédé électrostatique, on soumet les particules de fumée à une charge positive à leur sortie du générateur de fumée et les poissons traversent ce nuage de fumée sur un convoyeur à potentiel négatif (d.d.p. = 15 à 20 000 volts) : cette précipitation électrostatique de la fumée est prétendue éliminer le goudron et les hydrocarbures polycycliques aromatiques de la fumée avec une réduction de 98 % des taux de 3,4-benzopyrène dans le produit fumé (50).

Les techniques modernes de "fumersion" (= trempage dans une solution contenant des extraits de la fumée) diminuent de plusieurs dizaines de fois la quantité de 3,4-benzopyrène se déposant dans le poisson : l'extrait de fumée est préparé en éliminant d'une part les constituants les plus volatils de la fumée, d'autre part ceux dont le point d'ébullition est le plus

élevé ; parmi ceux-ci se trouve le 3,4-benzopyrène (36). Notons que si tous les types de concentrés de fumée essayés au Japon, en Grande-Bretagne, en URSS, etc... semblent permettre l'obtention de produits de toxicité négligeable dont les principes carcinogènes peuvent être éliminés, certains pays ont toutefois interdit l'utilisation des fumées liquides compte-tenu de la variabilité de leur préparation.

D'autre part, ces techniques sélectives (procédé électrostatique et fumersion) qui permettent de réduire la quantité de 3,4-benzopyrène contenue dans la fumée, n'assurent pas par elles-mêmes la conservation de la denrée : elles éliminent certaines substances utiles à la conservation et donnent un produit ayant des propriétés gustatives légèrement différentes de celles obtenues par les procédés classiques (9, 42).

Les constituants de la fumée se répartissent entre les deux phases de l'aérosol qu'elle constitue (19, 20) :

- une phase "particule" dispersée,
- une phase gazeuse dispersante formée par la vapeur.

La répartition des constituants entre les deux phases est fonction de leur point d'ébullition et de leur solubilité, suivant la loi de NERNST. L'absorption des vapeurs (phase dispersante) par les denrées aboutit à la couleur caractéristique, à la saveur et aux propriétés de conservation des aliments fumés. Bien qu'un dépôt de minuscules particules en dispersion s'effectue pendant le fumage, sa contribution au processus de fumage est négligeable. Toutefois, les particules ont un rôle secondaire,

elles se comportent comme un réservoir de composants de la fumée : lorsque l'équilibre est troublé, c'est-à-dire lors de l'épuisement des vapeurs dû à l'absorption, le réservoir libère une partie de ses composants au profit de la phase vapeur.

### 3. PROPRIÉTÉS DE LA FUMÉE

La connaissance de la composition de la fumée est nécessaire à la compréhension de ses propriétés. Le fumage permet d'améliorer à la fois l'apparence, la saveur et la qualité du produit. Trois éléments permettent ainsi d'apprécier l'efficacité de la fumée :

- création de substances particulières donnant l'arôme,
- formation de la couleur typique,
- conservation.

#### CREATION D'UN AROME PARTICULIER

Les recherches effectuées sur l'incidence des paramètres de combustion (18, 65) démontrent que de petits changements dans les conditions de production de fumée peuvent conduire à des transformations de la composition finale de la fumée et ainsi modifier le goût. Mais les efforts réalisés pour relier les paramètres de combustion avec la composition chimique et le goût n'ont pas donné de résultats statistiquement significatifs, bien que les taux de gâjacols présents furent estimés importants en termes de goût.

Ainsi, l'arôme est dû à un mélange de composants de la fumée (56, 57, 59), mais en dépit des nombreuses études effectuées sur la composition de la fumée de bois, ce mélange responsable du goût caractéristique des produits fumés est encore inconnu (62). Toutefois, les phénols sont généralement reconnus comme ayant une contribution majeure à la saveur particulière du produit fumé (3, 60) : le goût de fumée étant plutôt associé au gáiacol et l'odeur de fumée au syringol.

Les saveurs provenant de fumées identiques mais obtenues sur des produits différents sont plus ou moins appréciées, ce qui indiquerait que la saveur finale désirée pour la consommation est (21) :

- ou un mélange complexe des saveurs de la fumée et de l'aliment initial,
- et/ou une réaction des constituants de la fumée avec les protéines de surface produisant des composants d'une saveur nouvelle.

#### FORMATION D'UNE COULEUR CARACTERISTIQUE

Bien qu'il y ait relativement peu d'études sur la couleur des aliments fumés, il est généralement admis que la couleur typique du produit fumé, couleur allant du jaune doré au brun foncé, est due à des réactions de brunissement non enzymatique impliquant des réactions carbonyles-amines. Cette coloration est directement en rapport avec la disparition des fonctions carbonyles de la fumée ; plus il y a de fonctions carbonyles, plus l'intensité de la couleur sera élevée ; d'autre part, les fonctions amines libres des protéines sont essentielles (71). Les composés phénoliques ne

participent ni directement, ni indirectement à la formation de la couleur.

Certaines études sur le développement de la couleur (30) ont impliqué des composés spécifiques représentatifs des composants de la fumée, par exemple des dicarbonyles en réaction avec des protéines individuelles ou des amino-acides ; on a considéré tout particulièrement : glyoxal, méthyl-glyoxal, diacétyl, furfural et glyceraldéhyde. On a constaté que les groupements  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine sont liés de façon irréversible après fumage, on suppose qu'ils fournissent la fonction amine pour le brunissement.

#### CONSERVATION

Au début de ce siècle, on insistait particulièrement sur le rôle joué dans la conservation des produits alimentaires par le formol auquel on attribuait les propriétés antiseptiques des fumées de bois. En 1951, DIEUZEIDE (13) faisant le point des connaissances dans ce domaine et rappelant que la distillation des ligno-celluloses en vase clos donne de l'oxyde de carbone, des alcools méthylique et éthylique, de l'aldéhyde formique, de l'acide acétique, de l'acétone, du furfural, des xylènes, du créosol, du gaiacol, des dérivés du pyrogallol, etc..., notait que la plupart de ces produits sont éminemment antiseptiques, particulièrement à l'état gazeux et à chaud. Le rôle principal étant accordé à l'aldéhyde formique, il signalait le rôle des dérivés du goudron, des vapeurs créosotées et la contribution de nombreuses substances (acide acétique, acétone, etc...) à l'action antiseptique de la fumée.

Bien que l'action antiseptique du formol soit indéniable, des travaux plus récents (61) semblent accorder l'activité bactéricide principale à des dérivés méthylés d'hydroxyphénols. En fait, les substances actives de la fumée sont très nombreuses, nous reparlerons de son rôle conservateur dans la discussion.

Les produits fumés connaissent un regain d'intérêt depuis une vingtaine d'années, notamment le saumon qui rencontre un grand succès sur le marché français. Dans la technologie moderne, la plupart des produits sont faiblement fumés ; les caractéristiques organoleptiques acquises au cours du fumage (et du salage) sont très appréciées lorsqu'elles restent discrètes. Il importe de savoir quelle est, sur le plan de la conservation, l'efficacité de ce fumage. Nous nous sommes efforcés de déterminer l'action de la fumée d'une part sur des bactéries isolées, d'autre part sur la flore microbienne au sein du tissu musculaire du saumon dans les conditions habituelles du fumage à froid. (La technologie du saumon fumé est présentée en annexe en fin d'ouvrage : ANNEXE 1). Nos travaux ont pour but non seulement d'analyser l'évolution des propriétés antiseptiques de la fumée dans cette denrée, mais aussi d'en tirer parti pour obtenir un produit fumé d'excellente qualité.

## II - MATERIEL ET METHODES

## 1. SOUCHES BACTÉRIENNES

=====

### Escherichia coli

Ref. : K 10

Origine : Laboratoire de Microbiologie. Université des Sciences et Techniques de Lille I.

La conservation a été effectuée sur une gélose nutritive inclinée à une température comprise entre + 2° C et + 8° C. La souche a été repiquée tous les deux mois.

### Staphylococcus aureus

Origine : Isolée au Laboratoire de Boulogne-sur-Mer.

- Cette souche a été isolée sur milieu de Baird-Parker : colonie noire présentant une auréole d'éclaircissement du jaune d'oeuf.
- Souche coagulase +, D.N.ase +.

La conservation a été assurée comme ci-dessus.

## 2. MILIEUX DE CULTURE

---

### 2.1. Milieux solides

#### 2.1.1. Milieux sélectifs

Ces milieux contiennent à côté des substances nutritives des produits inhibant la croissance de certaines espèces de micro-organismes et exaltant celle d'autres espèces.

#### Germes aérobies totaux :

Gélose standard pour dénombrement : Plate count agar (68)

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 5185.

#### Bacilles pyocyaniques :

Gélose sélective pour bacilles pyocyaniques (4)

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 5025.

Ce milieu permet l'isolement ou le dénombrement de Pseudomonas aeruginosa.

#### Entérobactéries :

Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre :

V.R.B.G. Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 5320.

Cette gélose inhibe la croissance des bactéries à Gram positif et pratiquement celle des bactéries à Gram négatif autres que les Entérobactéries.

Coliformes :

Gélose au désoxycholate Coliformes 1 ‰ (17)

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 5080.

La concentration en désoxycholate est suffisamment peu élevée pour permettre la croissance des coliformes, alors que la flore Gram positive est inhibée.

Coliformes fécaux :

L'isolement et le dénombrement des coliformes fécaux s'effectuent également sur le milieu précédent, mais la température d'incubation est de 44° C (alors qu'elle est de 37° C pour les coliformes : Cf. TABLEAU II).

Lactobacilles :

Gélose de Rogosa (49).

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 5215.

Streptocoques fécaux :

Gélose à la Bile-Esculine-Azide (24).

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 5035.

Ce milieu permet d'effectuer l'isolement et la numération des Streptocoques du groupe D.

Staphylocoques :

Gélose de Baird Parker (1).

Références Institut Pasteur (I.P.L.) : Base pour gélose de Baird Parker 5030

Jaune d'oeuf au tellurite de K : 8005

Les staphylocoques pathogènes donnent des colonies noires entourées d'un halo clair de 2 à 5 mm de diamètre. On rencontre sur ce milieu de nombreux autres germes dont les colonies ne présentent pas ces caractères : staphylocoques non pathogènes, microcoques, levures et bacillus.

Bacillus cereus :

Gélose de Mossel pour Bacillus cereus (41).

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : Gélose de Mossel : 5020

Jaune d'oeuf à 20 % : 8010

Référence SIGMA : Polymyxine B sulfate : P.1004

(90 ml du milieu de base + 10 ml émulsion jaune d'oeuf à 20 % + 1 ml solution sulfate polymyxine 0,1 %)

Le milieu de Mossel est utilisé pour rechercher et dénombrer les formes végétatives et les spores de Bacillus cereus (Les Bacillus cereus donnent des colonies roses (mannitol -).

Anaérobies :

Gélose viande-levure à 15 ‰.

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 5315

Cette gélose est utilisée pour l'isolement des bactéries anaérobies en surface.

Levures-Moisissures :

Gélose glucosée à l'oxytétracycline : Gélose O.G.A.

Références Institut Pasteur (I.P.L.) : Base pour gélose O.G.A. : 5200

Oxytétracycline (1 mg/1 ml) : 8030

### 2.1.2. Milieu minimum

Les bactéries prototrophes peuvent être cultivées sur des milieux dits "minimum" : c'est le cas d'Escherichia coli que nous cultivons sur milieu  $MSB_1$ . Ces milieux, contrairement aux milieux complexes, contiennent uniquement les éléments indispensables à la croissance bactérienne. La relative simplicité de leur composition facilitera les interprétations lors de l'étude des réactions entre les composants de la fumée et les composants du tissu musculaire.

#### Composition du milieu $MSB_1$ (46) :

Solution minérale :	$(NH_4)_2 SO_4$	60 g	Tampon :	$KH_2 PO_4$	60 g
	Mg $SO_4$	6 g		$K_2H PO_4$	540 g
	Fe $SO_4$ 0,5 %	3 ml		$H_2O$ q.s.p	1 500 ml
	Mn $Cl_2$ 0,5 %	6 ml			
	NaCl	0,3 g			
	$H_2O$ q.s.p	1 500 ml			

$MSB_1$ :	Solution minérale	50 ml	
	Tampon	50 ml	
	Glucose 10 %	100 ml	
	Vitamine $B_1$ (0,5 mg/ml)	1 ml	
	$H_2O$	800 ml	
	Agar	14 g	→ pour obtenir un milieu solide

Stériliser aux températures suivantes :

$H_2O$ + Tp	121° C
Solution minérale	121° C
Glucose	105° C
Vitamine $B_1$	105° C

Vérifier que le pH = 7,3

## 2.2. Milieux liquides

### Eau peptonée :

Eau peptonée exempte d'indole (bouillon).

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 4035

Ce milieu permet la croissance des germes ne présentant pas d'exigences particulières. Il est utilisé comme diluant : il assure une parfaite dispersion des micro-organismes sans les inhiber (25), par ailleurs il revivifie les bactéries qui ont plus ou moins souffert d'un séjour prolongé dans des conditions hostiles. Dans l'eau peptonée, la phase de latence des différentes espèces de micro-organismes est d'au moins une heure, on ne risque donc aucune erreur par excès si le produit est inoculé sur les milieux de dénombrement 1 heure au plus après sa dilution.

### Bouillon nutritif :

Bouillon nutritif à 0,8 %.

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 4075

On utilise ce bouillon pour obtenir une croissance abondante des germes sans exigences particulières. (Ce milieu peut être solidifié par incorporation d'agar → gélose nutritive).

### M. R. S. :

- Bouillon M.R.S. "complet" (40).

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 4065

Ce milieu, préparé selon la formule de De Man, Rogosa et Sharpe, est parfaitement adapté à la culture des lactobacilles.

- Bouillon M.R.S. "identification".

Référence API : 5021

Ce milieu M.R.S. sans glucose ni extrait de viande est utilisé pour préparer les suspensions de lactobacilles destinées à l'ensemencement des galeries d'identification.

Rosenow cystéiné :

Milieu de Rosenow cystéiné (bouillon).

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 4100. (poudre + cervelle + marbre)

Le milieu de Rosenow complet est un milieu très riche qui permet d'obtenir une culture rapide et abondante des bactéries particulièrement exigeantes. Le chlorhydrate de cystéine présent dans le milieu permet en outre d'obtenir un potentiel d'oxydo-réduction favorable au démarrage des cultures des germes anaérobies.

MILIEUX DE CULTURE		ENSEMEN- CEMENT	TEMPERA- TURE D'IN- CUBATION	DUREE D'IN- CUBATION
P. C. A.	Germes aérobies mésophiles	profondeur	30° C	72 h
Gélose sélective pour Bacilles pyocyaniques	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	surface	37° C	24 h
V. R. B. G.	Enterobactéries	profondeur	37° C	24 h
Desoxycholate Coliformes 1 %	Coliformes	profondeur	37° C	24 h
Desoxycholate Coliformes 1 % MSB <sub>1</sub>	} Coliformes fécaux	profondeur	44° C	24 h
Rogosa		} Lactobacilles	profondeur	30° C
M. R. S. complet				
B. E. A.	Streptocoques fécaux	profondeur	37° C	24 h
Mossel	<u>Bacillus cereus</u>	surface	37° C	24 h
Baird-Parker	Staphylocoques, Microcoques..	surface	37° C	24-48 h
V. L.	Anaérobies	surface	37° C	48 h
O. G. A.	Levures, Moisissures	surface	T° Labo.	96 h

TABLEAU II : TECHNIQUE D'ENSEMENCEMENT, TEMPERATURE ET DUREE D'INCUBATION CORRESPONDANT A CHACUN DES MILIEUX.

### 3. SUBSTANCES CHIMIQUES

- Acide L. Glutamique :

Référence O.S.I. : A.650

- Agar-Agar :

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : Pastagar B : 7535

(Gélose blanche : cette dénomination correspond à une gélose ne contenant aucun élément nutritif (agar-agar + eau) ).

- L. Alanine :

Référence O.S.I. : A.1550

- Albumine :

Référence MERCK : sérum albumine bovine : 12.018

- Cadavérine :

Référence MERCK : Diamino-1,5-pentane : 807-332

- Caséine :

Référence MERCK : 2244

- Créatine :

Référence MERCK : 5205

- Glucosamine :

Référence MERCK : D-Glucosamine chlorhydrate : 4113

- Glucose :

Référence Institut Pasteur (I.P.L.) : 7205

- Lécithine d'oeufs :

Référence MERCK : 5331

- L. Lysine :

Référence O.S.I. : L.400

- Peptone :

Référence DIFCO : Bacto Peptone : 0118

Les peptones sont des mélanges de composés solubles dans l'eau résultant de l'action d'enzymes protéolytiques sur des matières protéiques diverses.

Le TABLEAU III suivant (établi à partir du tableau analytique DIFCO) donne la composition de cette Bacto-Peptone :

BACTO PEPTONE	%
Azote total.....	16,16
Proteose primaire (% N) .....	0,06
Proteose secondaire (% N) .....	0,68
Peptone (% N) .....	15,38
Ammoniaque (% N) .....	0,04
Amine libre (% N) .....	3,20
Amide (% N) .....	0,49
Composé mono-aminé (% N) .....	9,42
Composé di-aminé (% N) .....	4,07
Tryptophane .....	0,29
Tyrosine .....	0,98
Cystine .....	0,22
Sulfure organique .....	0,33
Sulfure inorganique.....	0,29
Phosphore .....	0,22
Chlorure .....	0,27
Sodium .....	1,08
Potassium .....	0,22
Calcium .....	0,058
Magnésium .....	0,056
Fer .....	0,0033
Cendres .....	3,53
Extrait soluble dans l'éther.....	0,37

TABLEAU III : COMPOSITION DE LA BACTO PEPTONE DIFCO

- Putrescine :

Référence MERCK : Diamino-1,4-butane : 808.279

- Tampon pH 6 :

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 250 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 150 g

$\text{H}_2\text{O}$  q.s.p : 1 000 ml

#### 4. MATIÈRE PREMIÈRE

Compte-tenu de la disparition progressive du saumon de l'Atlantique (Salmo salar) dans la plupart des rivières d'Europe, le saumon fumé est devenu un produit de luxe. Toutefois, les progrès réalisés dans les techniques de congélation, de conservation et de transport ont permis de développer une nouvelle industrie à partir des saumons du Pacifique (Oncorhynchus) pour approvisionner le marché européen.

Des six espèces de saumons existant dans le Pacifique, nous avons utilisé l'espèce suivante :

le saumon royal : - nom scientifique : Oncorhynchus tshawytscha

- synonymie anglo-saxonne (42) :

King,

Spring-salmon,

Chinook.

---

NOTE : (La société industrielle dans le cadre de laquelle les expérimentations ont été réalisées utilise les différentes espèces dans les proportions suivante

. Saumon royal	:	<u>Oncorhynchus tshawytscha</u>	60 %
. Saumon nordique	:	<u>Salmo salar</u>	20 %
		(= saumon d'élevage)	
. Autres espèces :			20 %
Saumon keta	:	<u>Oncorhynchus keta</u>	
Saumon argenté	:	<u>Oncorhynchus kisutch</u>	
Saumon rosé	:	<u>Oncorhynchus gorbuscha</u>	
Saumon rouge	:	<u>Oncorhynchus nerka</u>	
Saumon japonais	:	<u>Oncorhynchus masou</u>	

- diagnose :

- . rayons principaux de la nageoire anale : 14 à 19
- . rayons principaux de la nageoire dorsale : 10 à 14
- . rayons principaux des nageoires pelviennes : 10 ou 11
- . rayons principaux des nageoires pectorales : 14 à 17

- origine : le saumon royal se rencontre dans l'Océan Pacifique (rarement dans l'Océan Arctique) et dans les mers de Behring, d'Okhotsk et du Japon).

- étymologie : Oncorhynchus : museau croche ;  
tshavytscha : nom vernaculaire de cette espèce dans le Kamchatka.

## 5. FUMOIR

=====

Il s'agit d'un fumoir horizontal statique de marque AFOS (FIGURE 1).

Les saumons, qui ont au préalable subi les opérations de décongélation, salage et séchage (Cf. ANNEXE 1), sont placés à plat sur des "raques" (= chariots) que l'on roule à l'intérieur du fumoir.

### 5.1. Générateur de fumée

Nous avons utilisé de la sciure de bois durs contenant au minimum 80 % de hêtre, le reste provenant de chêne, de frêne, et d'orme. Cette sciure est stockée dans un bac muni d'une griffe mélangeuse.

Par ailleurs, un conduit à l'arrière du générateur de fumée amène de l'air sous le foyer.

### 5.2. Cellule de fumage

La fumée produite dans le générateur est introduite dans la cellule de fumage par un conduit sur lequel est ménagé un registre qui permet l'introduction d'air. Après son passage dans les éléments chauffants réglés par un thermostat, la circulation du mélange air-fumée est activée par un ventilateur électrique. A l'extrémité du conduit, la fumée descend dans une conduite latérale et diffuse dans la chambre de fumage à travers un mur diffuseur à fentes réglables disposées pour débiter horizontalement des volumes égaux de fumée sur le poisson. Quand la fumée est passée sur les

denrées exposées, elle quitte cette chambre par une seconde série de fentes : une partie est rejetée par une cheminée, ce qui reste étant remis en circulation.

### 5.3. Réglages

#### - Densité de fumée :

Le taux de fumage est approximativement proportionnel à la densité optique de la fumée (20), il est donc important de pouvoir régler cette densité.

En modifiant la quantité d'air admise pour la combustion du bois, on obtient une fumée plus ou moins épaisse. Elle sera d'autant plus dense que l'oxydation sera faible, ce qui revient à diminuer au maximum la quantité d'air admise ; mais dans ces conditions, on risque d'obtenir une distillation du bois entraînant la production d'une fumée grisâtre riche en goudrons et en acides qui donnera au poisson une coloration trop intense et une saveur désagréable, amère ou acide.

La technique employée permet d'éviter ces désagréments en réalisant un tirage forcé :

- . la quantité d'air admise est facilement réglable,
- . la sciure est brassée par une griffe : elle se consume continuellement et du combustible nouveau est introduit en permanence dans le foyer ; les cendres et les parties carbonisées sont évacuées.

Néanmoins, la densité de fumée, qui est constante dans une expérience donnée, peut présenter des variations d'une expérience à une autre, compte-tenu des nombreux facteurs dont elle dépend. Ceci est à considérer dans l'interprétation des résultats.

- Température de la fumée :

Des systèmes de thermostats, de chauffage de la fumée et d'arrivée d'air frais permettent de contrôler constamment la température et de la maintenir au degré voulu : 18° C dans la cellule de fumage (fumage à froid).

- Humidité de la fumée :

La fumée devrait être théoriquement sèche de façon à absorber au passage une certaine quantité de l'humidité restante du poisson et parfaire son séchage. D'après LE COOPER (33), le séchage se poursuivra en même temps que le fumage si l'humidité relative de la fumée dans le fumoir est inférieure à 70 %.

Il a été reconnu avantageux de récupérer les fumées après leur passage dans le fumoir et de les refaire circuler dans l'appareil. Il convient cependant avant de les mettre en circuit de les mélanger avec de l'air pour diminuer l'humidité dont elles ont été chargées au contact du poisson.

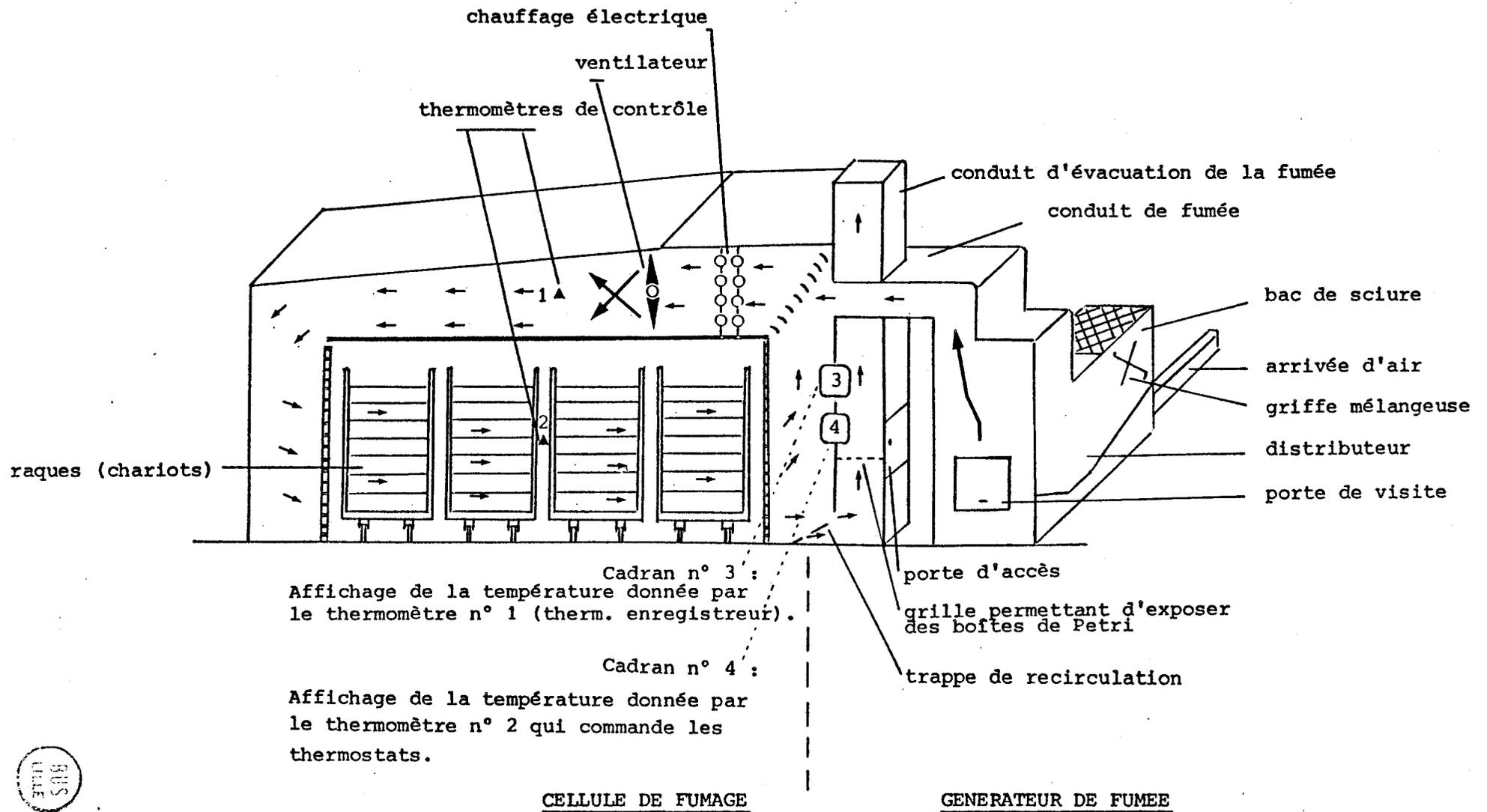


Figure 1 ; Fumoir horizontal statique "AFOS".

## 6. TECHNIQUES DE DÉNOMBREMENT ET D'IDENTIFICATION

### 6.1. Techniques de dénombrement

#### 6.1.1. Dénombrement des bactéries aérobies :

Cette technique convient à la fois aux micro-organismes aérobies stricts et aux aérobies-anaérobies facultatifs. Elle comporte plusieurs opérations (5) :

##### - Homogénéisation :

. On dépose dans un mixer (type Waring - 20 000 tr/mn à vide) : 10 g du produit à analyser + 90 ml d'eau peptonée. (Avant d'effectuer le prélèvement de 10 g sur le filet de saumon, la surface est passée à la flamme).

. Ces manipulations étant effectuées aseptiquement, on broye le mélange pendant 1 minute.

. Pour permettre la revivification des germes, cette suspension au 1/10e est maintenue 30 minutes à la température du laboratoire (ou quelques heures à une température inférieure à 8° C).

##### - Dilutions :

. A partir de la suspension mère (dilution  $10^{-1}$ ), on réalise une dilution au 1/100 : 1 ml suspension mère + 9 ml diluant (eau peptonée). On agite ce tube ( $10^{-2}$ ) pour bien homogénéiser.

. A partir de cette suspension (dilution  $10^{-2}$ ), on effectue une dilution au 1/1000 : 1 ml dilution  $10^{-2}$  + 9 ml diluant (eau peptonée).

. On peut obtenir de la même façon les dilutions :  
10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, etc...

Toutes ces opérations sont effectuées avec du matériel stérile, et on change de pipette pour chaque dilution.

- Ensemencement :

Les bactéries nécessitent pour leur développement un milieu de culture approprié (TABLEAU II). Il existe deux méthodes d'ensemencement : en profondeur ou en surface.

\* Ensemencement en profondeur :  
+++++

. Dans une boîte de Petri, on dépose 1 ml de la dilution choisie du produit à examiner.

. On coule aseptiquement 15 ml environ de milieu de culture gélosé (préalablement placé au bain-marie bouillant et maintenu en surfusion à 45° C) et on agite doucement pour obtenir un mélange homogène. On laisse refroidir jusqu'à solidification.

. Pour éviter le développement de colonies envahissantes, on emploie généralement le procédé des "2 couches" : on coule à la surface du milieu précédent solidifié une seconde couche de gélose (fine couche superficielle).

\* Ensemencement en surface :  
+++++

. On fait fondre le milieu de culture gélosé et on le coule en boîtes de Petri.

. Lorsqu'il est solidifié, on dépose 0,1 ml de la dilution choisie à la surface du milieu et on répartit soigneusement l'inoculum à l'aide d'un étaleur stérile.

- Incubation :

Quelle que soit la méthode d'ensemencement, les boîtes sont retournées et mises en incubation dans des étuves (Cf. TABLEAU II : température et durée d'incubation correspondant à chacun des milieux).

- Lecture des résultats :

On compte le nombre de colonies et il est possible, en tenant compte de la dilution du produit ensemencé, de traduire le résultat du dénombrement "par 1 g du produit initial".

Il est évident qu'une colonie ne correspond pas fatalement à la multiplication d'une seule cellule microbienne, toutefois le nombre de colonies observées est souvent intitulé : "nombre de bactéries", puisque d'une manière générale une bactérie initiale donne une colonie.

6.1.2. Dénombrement des bactéries anaérobies :

- Le milieu gélosé est coulé en boîtes de Petri. L'ensemencement en surface s'effectue comme dans le cas des bactéries aérobies.

- Pour réaliser l'anaérobiose, on utilise une jarre anaérobie dans laquelle on dépose une enveloppe GASPAK (B.D Mérieux : réf. : 96.112), un catalyseur (B.D Mérieux : réf. : 96.206) et un indicateur d'anaérobiose (B.D. Mérieux : réf. : 96116).

Avant de fermer le couvercle, on introduit 10 ml d'eau dans l'enveloppe GASPAK.

On serre à la main la vis du couvercle et on place à l'étuve cette jarre contenant les boîtes de Petri (Cf. TABLEAU II).

- le sachet GASPAC H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> renferme 2 comprimés :
  - . l'un de borohydrure de sodium générateur d'hydrogène,
  - . l'autre de bicarbonate et d'acide citrique générateur de gaz carbonique.
- l'indicateur d'anaérobiose est constitué d'une bande de papier filtre imbibée d'une solution de bleu de méthylène. Au contact de l'air, cet indicateur est bleu, il se décolore lorsque tout l'oxygène est combiné à l'hydrogène présent.
- le catalyseur au palladium agit à température ambiante, il déclenche la formation d'eau à partir de l'hydrogène et de l'oxygène de l'air.
  - La lecture des résultats s'effectue comme pour les bactéries aérobies.

## 6.2. Techniques d'identification

### 6.2.1. Identification des enterobactéries :

- Les colonies obtenues sur V.R.B.G. (gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre) sont cultivées dans un bouillon nutritif pendant 24 heures à 37° C.
- Après centrifugation et lavage, les bactéries sont mises en suspension dans 5 ml d'eau distillée stérile.
- Cette suspension permet d'ensemencer une galerie d'identification d'Enterobactéries (Système API 20 Enterobacteriaceae - réf. : 2010).
- La galerie ensemencée est placée à l'étuve à 37° C. La lecture s'effectue après 18 à 24 heures d'incubation.

(Remarque : le passage sur bouillon nutritif se révèle nécessaire lorsque les entérobactéries ont été isolées du saumon fumé ; elles présentent une longue phase de latence préjudiciable à la détermination sur les galeries d'identification. Cette opération permet d'éviter cet inconvénient).

#### 6.2.2. Identification des Lactobacilles :

- Les colonies obtenues sur la gélose de Rogosa sont repiquées sur milieu M.R.S. complet et placées 24 heures à l'étuve à 30° C.

- Après centrifugation (15 minutes à 2000 tours/mn), on lave le culot dans 10 ml d'eau stérile. On centrifuge à nouveau.

- Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 2 ml de M.R.S. identification à 30° C.

- Dans des tubes contenant 10 ml de milieu M.R.S.-identification, on ajoute autant de gouttes de cette suspension dense qu'il est nécessaire pour obtenir une opacité située entre les tubes 2 et 3 de l'échelle de Mac Farland.

- Avec cette nouvelle suspension, on remplit alors les tubes de la galerie d'identification des Lactobacilles (Système API 50 Lactobacillus réf. 5020).

- La galerie est placée dans une étuve à 37° C et les résultats sont notés après 3, 6, 24 et 48 heures.

- Pour l'interprétation des résultats, on se reporte aux travaux de PAULE (44).

(Remarque : lorsqu'on n'obtient pas de trouble du M.R.S. complet en 24 heures, notamment lorsque les bactéries proviennent du produit fumé, on repique une nouvelle fois sur M.R.S. complet jusqu'à l'obtention d'un trouble en 24 heures)

### 6.2.3. Identification des anaérobies :

- Il importe, avant d'effectuer l'inoculation de la galerie, de vérifier :

. la pureté de la souche, (isolement sur gélose type V.L. : incubation en anaérobiose) ;

. le caractère anaérobie, (isolement sur gélose type V.L. : incubation en aérobie).

- A partir de la gélose incubée en anaérobiose, on réalise une suspension dans le tube de milieu API 20 A, ce en maintenant une anaérobiose aussi stricte que possible.

- On ensemence la galerie d'identification des anaérobies (Système API 20 Anaérobies - réf. : 2030).

- Les galeries sont placées en jarre anaérobie dans une étuve à 37° C. La lecture est effectuée après 48 heures d'incubation.

(Remarque : dans certains cas, les bactéries ont été cultivées sur milieu de Rosenow avant l'isolement, ce milieu étant particulièrement favorable au développement de la flore anaérobie).

## 7. TECHNIQUES D'EXPOSITION DES BACTÉRIES A L'ACTION DE LA FUMÉE

Les boîtes de Petri sont exposées à l'intérieur du fumoir décrit précédemment (II - 5), dans la partie inférieure du conduit d'évacuation de la fumée (FIGURE 1 : au niveau de la porte d'accès au conduit d'évacuation).

### 7.1. Procédés permettant l'action directe

#### 7.1.1. Cas des bactéries ensemencées en profondeur

Une suspension bactérienne (Escherichia coli) répartie de façon homogène dans une boîte de Petri est soumise à l'action de la fumée ; pour éviter la dessiccation des bactéries, une couche de gélose blanche est préalablement coulée dans le fond de la boîte. Après l'exposition dans le four, un prélèvement est réalisé à la surface de la gélose pour être réensemencé dans un milieu de culture approprié. La comparaison des dénombrements effectués à partir des boîtes ayant subi ou non l'exposition dans le four permet d'apprécier l'action de la fumée sur les bactéries.

A. On coule dans une boîte de Petri une couche de gélose blanche.

B. On dépose en surface 0,3 ml d'une suspension d'Escherichia coli, et on l'étale sur toute la surface.

C. On expose ces bactéries à l'action de la fumée pendant une durée déterminée (variant généralement de 1 minute à 35 minutes).

D. On lave la surface de la gélose avec 2 ml d'eau salée stérile à 10 ‰ et on gratte la surface.

E. Cette nouvelle suspension est ensemencée dans une couche de milieu de culture (milieu sélectif ou milieu minimum) + une couche superficielle et cette boîte est placée à l'étuve.

#### 7.1.2. Cas des bactéries ensemencées en surface :

La technique présente des analogies avec la précédente, mais le mode opératoire subit quelques modifications :

A. On coule une couche de gélose de Baird Parker dans le fond d'une boîte.

B. On dépose en surface 0,3 ml d'une suspension de Staphylococcus aureus que l'on étale.

C. On soumet comme précédemment ces bactéries à l'action de la fumée.

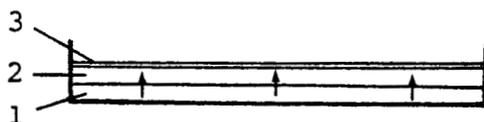
D. Puis la gélose ensemencée est mise en incubation directement après l'exposition.

Il importe de préciser que par ce procédé, les bactéries sont soumises non seulement à l'action directe de la fumée pendant l'exposition, mais également à l'action des constituants de la fumée qui se sont concentrés dans la gélose et qui conditionnent leur développement pendant l'incubation.

## 7.2. Procédés permettant l'action indirecte

### 7.2.1. Cas des bactéries ensemencées en profondeur :

- A. On coule une couche de gélose blanche dans une boîte de Petri.
- B. On la soumet à l'action de la fumée pendant une durée déterminée (variant généralement de 1 minute à 35 minutes).
- C. On dépose 0,5 ml d'eau salée stérile pour éviter un contact direct des bactéries avec la surface où la concentration en substances empyreumatiques est élevée.
- D. On dépose 1 ml d'une suspension d'Escherichia coli.
- E. On coule une couche de milieu (milieu sélectif ou milieu minimum) en agitant + une couche superficielle, et cette boîte est placée à l'étuve :



- 1 : couche soumise à la fumée
- 2 : couche contenant les bactéries
- 3 : couche superficielle

Ainsi, les bactéries sont soumises à l'action des composants de la fumée qui se sont concentrés dans la couche inférieure 1 et qui ont diffusé pendant l'incubation dans la couche supérieure 2 :

- la couche inférieure de gélose est exposée pendant une durée déterminée à l'action de la fumée, la concentration de la gélose en substances empyreumatiques est proportionnelle à cette durée d'exposition ;

- la durée d'action de la fumée sur les bactéries est constante puisqu'elles subissent pendant toute l'incubation l'influence de la fumée concentrée dans la gélose, le facteur variable est ici la concentration de cette couche inférieure.

#### 7.2.2. Cas des bactéries ensemencées en surface :

La technique présente quelques différences par rapport au cas précédent :

- A. On coule une couche de gélose de Baird Parker dans le fond d'une boîte.
- B. On l'expose à l'action de la fumée (comme précédemment).
- C. On dépose en surface 0,3 ml d'une suspension bactérienne que l'on étale. Cette gélose ensemencée est alors mise en incubation :



- 1 : couche soumise à la fumée  
2 : suspension bactérienne étalée après exposition de la gélose

- Ainsi, la seule couche de gélose utilisée a un double rôle :
- . elle concentre les substances empyreumatiques ;
  - . elle constitue le milieu de culture permettant la croissance des bactéries.



. La suspension, constituée par les 2 ml d'eau peptonée qui ont permis de reprendre les bactéries après leur exposition, est versée dans le godet d'un filtre équipé d'une membrane de 0,45 microns de porosité.

. On verse 100 ml d'eau peptonée dans le godet pour laver les bactéries retenues par la membrane et on filtre sous vide.

. On enlève la membrane filtrante et on procède ainsi :

a - On la retourne à la surface d'une gélose au désoxycholate (boîte a) et on laisse la membrane au contact de la gélose pendant 10 minutes.

b - Dans le but de dénombrer les bactéries qui pourraient encore se trouver sur la membrane filtrante, on la dépose dans un tube contenant 2 ml d'eau peptonée. Après un contact de 10 minutes avec la membrane, l'eau peptonée est incluse dans une couche de désoxycholate (boîte b).

Sur les boîtes a et b, on dépose une couche superficielle de désoxycholate. Les boîtes sont mises à incuber à 44° C. (Nombre de bactéries retenues par la membrane filtrante et aptes à la multiplication : nombre déterminé sur la boîte a + nombre déterminé sur la boîte b).

## 9, TECHNIQUES PERMETTANT DE METTRE EN ÉVIDENCE L'INFLUENCE

---

### DU TISSU MUSCULAIRE SUR L'ACTION DE LA FUMÉE

---

#### 9.1. Action directe de la fumée

Les germes sont soumis à l'action directe de la fumée (II - 7.1.1.).

#### Complément de technique :

- Dans un premier cas, les bactéries exposées à la fumée sont en suspension dans l'eau salée : 9 ml eau salée à 10 ‰ + 1 ml suspension E. coli.

On dépose dans chaque boîte de Petri (série A) x ml de cette dilution au 1/10e sur une couche de gélose blanche, et on étale.

- Dans un second cas, les bactéries exposées se trouvent dans un broyat de saumon :

On broye de la chair de saumon (prélevée stérilement) avec de l'eau salée : 50 g de saumon + 150 ml eau salée.

On ensemence ce broyat : 45 ml broyat + 5 ml suspension E. coli.

On dépose x ml de cette dilution au 1/10e (broyat ensemencé) dans chacune des boîtes de la série B sur une couche de gélose, et on étale.

Hormis ces opérations particulières, la technique est analogue à celle des expériences précédentes (II - 7.1.1.). Après l'exposition dans le fumoir, les bactéries sont récupérées et ensemencées sur milieu sélectif.

## 9.2. Action indirecte de la fumée

Les bactéries sont exposées à l'action indirecte de la fumée (II - 7.2.1.).

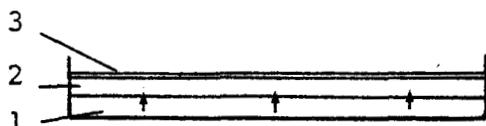
### Complément de technique :

- Série A : les bactéries subissent l'action des substances empyreumatiques qui se sont concentrées dans une gélose pure (gélose blanche).

- Série B : elles subissent l'action des substances qui se sont concentrées dans une gélose additionnée d'un broyat de saumon et qui sont libérées par ce milieu :

- . On réalise un broyat de saumon comme précédemment ;
- . On incorpore x ml de ce broyat dans une couche de gélose blanche au fond de chaque boîte de Petri et on homogénéise parfaitement.
- . La technique est ensuite identique à celle des expériences antérieures.

### Série A :



- 1 : couche soumise à la fumée  
= gélose blanche
- 2 : couche contenant les bactéries  
= milieu sélectif ou minimum
- 3 : fine couche superficielle

### Série B :



- 1 : couche soumise à la fumée  
= mélange "gélose blanche +  
broyat"
- 2 : couche contenant les bactéries  
= milieu sélectif ou minimum
- 3 : fine couche superficielle

10. TECHNIQUES PERMETTANT D'ÉtudIER L'INFLUENCE DES SUBSTANCES  
 =====  
 BIOLOGIQUES SUR L'ACTION DE LA FUMÉE  
 =====

Les bactéries (Escherichia coli) sont soumises à l'action indirecte de la fumée (II - 7.2.1.).

Complément de technique :

On réalise dans une même manipulation plusieurs cinétiques :  
 A, B, C, D, ...

- Dans la série A, les bactéries subissent l'action des substances empyreumatiques qui se sont concentrées dans la couche inférieure de gélose (gélose blanche) ;

- Dans les séries B, C, D, ..., la présence de substances ajoutées dans la gélose inférieure à des concentrations déterminées va modifier ou non l'action des constituants de la fumée qui diffusent dans la couche supérieure. Les résultats doivent permettre d'approcher les réactions entre les composants de la fumée et les substances testées qui sont des substances constitutives du muscle, des produits de dégradation (ex : putrescine) ou des éléments ajoutés au cours de la transformation (NaCl).

- On prépare x flacons de gélose blanche.

x = nombre de cinétiques réalisées dans la même manipulation (A, B, C, D, ...).

- On ajoute dans chaque flacon une quantité déterminée de la substance que l'on veut tester (sauf dans le premier flacon qui correspond

au témoin : flacon A).

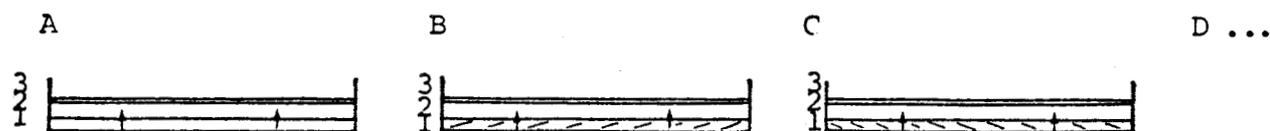
- On ajoute une solution tampon dans tous les flacons, y compris A. (tampon pH 6 : II - 3).

- On mesure le pH de chaque gélose.

- A partir de chaque flacon, on coule un nombre de boîtes correspondant aux différentes durées d'exposition (ex : 0', 5', 10', 15', 20', 25', 30' → 7 boîtes).

- On expose les boîtes de chaque série à la fumée.

- La technique est ensuite identique à celle des expériences antérieures (II - 7.2.1.).



1. Couche soumise à la fumée (couche inférieure) :

$\left  = \text{gélose blanche (+ Tp)} \right $	$\left  = \text{Gélose blanche + substance Y ou Z de } [1]x_1 (+ \text{Tp}) \right $	$\left  = \text{Gélose blanche + substance Y ou Z de } [1]x_2 (+ \text{Tp}) \right $
---	--	--

2. Couche contenant les bactéries (couche supérieure) :

$\left  = \text{MSB}_1 \right $	$\left  = \text{MSB}_1 \right $	$\left  = \text{MSB}_1 \right $
---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

3. Fine couche superficielle

Remarque : L'addition d'une solution tampon est nécessaire lorsque la substance testée est acide ou basique. Dans ce cas, on ajoute une solution tampon pH 6 pour reproduire au mieux le pH du saumon avant fumage. (Les mesures effectuées sur des filets de saumon avant l'exposition dans le fumoir ont donné une moyenne de pH de : 6,1).

III - RESULTATS ET COMMENTAIRES

## 1. ÉVOLUTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE LA FLORE

### BACTÉRIENNE DU SAUMON AU COURS DU FUMAGE

Le fumage du saumon constitue une étape importante de son traitement, mais il subit auparavant plusieurs opérations : décongélation, filetage, salage et séchage (Cf. ANNEXE 1).

Les résultats présentés ici ont été obtenus en effectuant sur un même filet de saumon des prélèvements avant fumage et des prélèvements après fumage.

#### 1.1. Dénombrements

Ces prélèvements ont permis d'effectuer des dénombrements et d'établir le rapport :  $\frac{\text{nombre de bactéries avant fumage}}{\text{nombre de bactéries après fumage}}$ , ce chiffre correspondant au taux de réduction du nombre de bactéries lors du fumage.

##### 1.1.1. Résultats

- Les résultats portés dans les tableaux de l'ANNEXE 2 (TABLEAUX 1 à 7) correspondent à des dénombrements effectués avant et après fumage sur 7 filets de saumons différents (échantillons numéros 1 à 7).

Dans chacun de ces tableaux sont notés les nombres  $n_1$  et  $n_2$  :

$n_1$  = nombre de prélèvements effectués sur le filet avant fumage,  
 $n_2$  = nombre de prélèvements effectués sur le même filet après fumage.

- Le tableau suivant (TABLEAU IV) ne reprend que les rapports

ECHANTILLON N°	1	2	3	4	5	6	7	MOYENNE ARITHMETIQUE
	$n_1 = n_2 = 7$	$n_1 = n_2 = 24$	$n_1 = n_2 = 6$	$n_1 = n_2 = 3$	$n_1 = 4 - n_2 = 3$	$n_1 = n_2 = 18$	$n_1 = n_2 = 16$	
FLORE DENOMBREE								
Flore mésophile totale	1,53	1,75	2,17	3,98	1,95	1,62	1,69	2,09
Bacilles pyocyaniques	4,12	4,25	6,06	6,62	3,00	-	-	4,81
Entérobactéries	2,86	2,23	1,61	0,74	0,69	6,33	1,70	2,30
Coliformes	1,97	1,02	0,84	0,94	0,84	-	-	1,12
Coliformes fécaux	1,00	4,38	-	3,57	3,50	-	-	3,11
Streptocoques fécaux	1,03	1,84	1,91	3,05	0,81	-	-	1,72
Lactobacilles	4,50	4,11	-	7,96	1,29	14,00	-	6,37
Bactéries isolées sur Baird Parker	3,21	14,48	3,46	5,92	2,25	-	-	5,86
Anaérobies	-	-	0,44	1,11	0,40	0,36	-	0,57
Levures						1,89	4,16	3,02
Moisissures						6,20	3,20	4,70

TABLEAU IV : TAUX DE REDUCTION DU NOMBRE DE BACTERIES DANS LE SAUMON LORS DU FUMAGE



nombre avant fumage déterminés pour chaque groupe de microorganismes et nombre après fumage donne la moyenne arithmétique de ces rapports pour chacun des groupes considérés.

### 1.1.2 Commentaires

Degré de signification des résultats obtenus :

- Pour déterminer le degré de signification  $\alpha$ , on utilise le test de Student : test de comparaison de 2 moyennes observées par calcul du coefficient de Student t après estimation de la variance commune.

Les moyennes comparées sont les suivantes (Cf. Résultats ANNEXE 2) :

. Moyenne arithmétique des dénombrements effectués avant fumage (dénombrements d'un groupe de bactéries déterminé) =  $\bar{x}$ .

. Moyenne arithmétique des dénombrements effectués après fumage sur le même filet =  $\bar{y}$ .

- Pour chaque comparaison, on calcule le coefficient t :

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n_1 \bar{x}^2 + \sum y_i^2 - n_2 \bar{y}^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

La signification est trouvée dans la table de t pour le degré de liberté :  $n_1 + n_2 - 2$ .

- Le degré de signification  $\alpha$  est déterminé pour chaque résultat, il permet de distinguer les différences significatives entre  $\bar{x}$  et  $\bar{y}$  (TABLEAU V) :

NS : Différence non significative au risque de 5 %, ( $\alpha > 0,05$ )

S : Différence significative ( $0,001 < \alpha < 0,05$ )

TS : Différence très significative ( $\alpha < 0,001$ )

- Nous avons constaté que lorsque l'échantillonnage est relativement faible (3, 4, 6 ou 7 dénombrements effectués avant et après fumage sur le même filet), la comparaison des moyennes observées ne permet de déceler au risque de 5 % que peu de différences significatives.

Pour un échantillonnage plus important (24 dénombrements), l'analyse statistique fait généralement apparaître des différences significatives entre les nombres de bactéries présents avant et après fumage.

#### Sensibilité des différents groupes de bactéries à l'action de la fumée :

- Il importe tout d'abord de faire deux remarques concernant les groupes de bactéries dénombrées :

. Toutes les colonies observées sur gélose de Baird Parker ont été comptées, il s'agit de bactéries gram + : Staphylococcus, Micrococcus et éventuellement Bacillus. Les caractéristiques des colonies ne permettant pas d'effectuer facilement la distinction entre ces genres, le dénombrement a porté sur la totalité des colonies, ce qui représente un ensemble hétérogène.

. Le groupe des "anaérobies" correspond ici à la fois à

ECHANTILLON N°	1	2	3	4	5	6	7	MOYENNE DES TAUX DE REDUC- TION S et TS
	$n_1 = n_2 = 7$	$n_1 = n_2 = 24$	$n_1 = n_2 = 6$	$n_1 = n_2 = 3$	$n_1 = 4 - n_2 = 3$	$n_1 = n_2 = 18$	$n_1 = n_2 = 16$	
FLORE DENOMBREE								
Flore mésophile totale	NS	S 1,75	NS	S 3,98	NS	NS	NS	2,86
Bacilles pyocyaniques	NS	TS 4,25	TS 6,06	TS 6,62	NS	-	-	5,64
Entérobactéries	S 2,86	TS 2,23	NS	NS	NS	TS 6,33	NS	3,80
Coliformes	S 1,97	NS	NS	NS	NS	-	-	1,97
Coliformes fécaux	NS	S 4,38	-	NS	NS	-	-	4,38
Streptocoques fécaux	NS	S 1,84	NS	NS	NS	-	-	1,84
Lactobacilles	NS	TS 4,11	-	S 7,96	NS	TS 14,00	-	8,69
Bactéries isolées sur Baird Parker	S 3,21	TS 14,48	S 3,46	S 5,92	NS	-	-	6,76
Anaérobies	-	-	S 0,44	NS	S 0,40	NS	-	0,42
Levures						S 1,89	TS 4,16	3,02
Moisissures						TS 6,20	S 3,20	4,70

TABLEAU V : COMPARAISON DES MOYENNES OBSERVEES AVANT ET APRES FUMAGE

[La signification des résultats est exprimée par S (significatif), TS (très significatif), NS (non significatif)  
Les taux de réduction sont repris lorsque les différences sont significatives ou très significatives.]

des bactéries anaérobies strictes et à certaines bactéries aérobies - anaérobies facultatives, puisque toutes les colonies obtenues sur milieu V.L. en jarre anaérobie ont été dénombrées sans qu'il soit possible de déterminer précisément le type respiratoire de chacune des colonies.

- En observant les taux de réduction (TABLEAU V : moyennes des taux de réduction) des différents groupes de bactéries du saumon lors du fumage, on constate que, excepté les "anaérobies", tous les groupes de bactéries (ainsi que les levures et les moisissures) subissent à des degrés divers une certaine réduction :

Streptocoques D.....	1,84
Coliformes.....	1,97
Entérobactéries.....	3,80
Coliformes fécaux.....	4,38
Bacilles pyocyaniques.....	5,64
Bactéries isolées sur Baird Parker	6,76
Lactobacilles.....	8,69

Les coliformes et les coliformes fécaux étant compris dans le groupe des entérobactéries, nous obtenons le classement suivant (sensibilité croissante) :

1° Streptocoques D.....	1,84
2° Entérobactéries.....	3,80
3° Bacilles pyocyaniques.....	5,64
4° Bactéries isolées sur Baird Parker	6,76
5° Lactobacilles.....	8,69

(Il est à remarquer que les taux obtenus en effectuant la moyenne de tous les résultats, significatifs ou non, conduisent au même classement).

Importance des différents groupes par rapport à la flore aérobie mésophile totale :

Pour le saumon non fumé (N.F) et pour le saumon fumé (F), ont été établis les pourcentages des différents groupes de bactéries par rapport à la flore totale, ce pour chacun des filets analysés : échantillons 1 à 7 (TABLEAU VI).

ECHANTILLONS	1	2	3	4	5	6	7	MOYENNES
Bacilles Pyocyaniques								
N.F	0,06	2,59	5,49	2,81	0,80	-	-	2,35
F	0,02	1,06	1,97	1,69	0,52	-	-	1,05
Entérobactéries								
N.F	6,98	2,48	3,31	1,36	1,21	0,44	3,04	2,68
F	3,72	1,93	4,45	7,30	3,42	0,11	3,04	3,42
Streptocoques fécaux								
N.F	2,30	3,28	4,66	0,80	1,26	-	-	2,46
F	3,40	3,12	5,29	1,05	3,03	-	-	3,17
Lactobacilles								
N.F	6,57	8,20	-	2,74	2,52	0,72	-	4,15
F	2,23	3,48	-	1,37	3,82	0,08	-	2,19
Bactéries isolées sur Baird Parker								
N.F	1,29	7,12	3,37	4,08	1,36	-	-	3,44
F	0,61	0,86	2,12	2,75	1,18	-	-	1,50

TABLEAU VI : POURCENTAGES DES DIFFERENTS GROUPES DE BACTERIES PAR RAPPORT A LA FLORE AEROBIE MESOPHILE TOTALE

- Ces chiffres nous permettent de classer les groupes de bactéries par ordre d'importance décroissante :



	Saumon non fumé	Saumon fumé
1	Lactobacilles	Entérobactéries
2	Bactéries isolées sur B.P.	Streptocoques fécaux
3	Entérobactéries	Lactobacilles
4	Streptocoques fécaux	Bactéries isolées sur B.P.
5	Bacilles pyocyaniques	Bacilles pyocyaniques

L'importance relative de ces groupes varie au cours du fumage, ce qui correspond aux observations faites antérieurement :

. Les lactobacilles et les bactéries isolées sur Baird Parker constituent la flore dominante du saumon avant fumage, mais ces bactéries étant les plus sensibles à l'action de la fumée, cette flore est relativement moins importante dans le saumon fumé ;

. A l'inverse, les entérobactéries et les streptocoques D compte-tenu de leur moindre sensibilité à l'action de la fumée, constituent la flore majeure après fumage ;

. Les bacilles pyocyaniques ayant une sensibilité moyenne à l'action de la fumée correspondent à la flore mineure dans le saumon fumé ou non.

- La somme des pourcentages des différents groupes représente :  
 15,08 % de la flore totale dans le saumon avant fumage,  
 11,33 % de la flore totale dans le saumon fumé.

Si l'on s'en tient à ces chiffres, 85 % des germes environ ne seraient pas considérés. Dans le but de déterminer la nature des bactéries

du saumon fumé, des colonies prélevées sur des boîtes de P.C.A. (cultivées 24 heures sur bouillon nutritif, centrifugées, lavées, et ensemencées sur différents milieux de culture : TABLEAU II) ont été identifiées, les résultats sont présentés dans le TABLEAU VII

Boîte de P.C.A. n° :	1	2	3	4	5	Total
Gélose sélective pour bacilles pyocyaniques	-	-	2	-	1	3
Gélose V.R.B.G.	1	1	9	4	2	17
Gélose B.E.A.	2	-	1	2	5	10
Gélose de Rogosa	2	1	1	1	4	9
Gélose de Baird Parker	2	-	-	1	11	14

TABLEAU VII : NOMBRE DE COLONIES PRELEVEES SUR UNE GELOSE P.C.A. APRES A SE DEVELOPPER SUR UN AUTRE MILIEU DE CULTURE

Sur les 75 colonies repiquées, 48 ont permis d'obtenir de nouvelles colonies sur l'un ou l'autre des milieux gélosés ensemencés (5 des suspensions bactériennes ont poussé à la fois sur B.E.A. et sur B.P.).

Ainsi, parmi les colonies obtenues sur P.C.A. à partir du saumon fumé :

- . 64 % correspondent à un des groupes considérés précédemment,
- . 36 % n'ont pas donné de nouvelles colonies sur les milieux correspondants.

On constate donc que dans les 88,66 % de germes qui n'étaient pas identifiés dans le saumon fumé, une partie importante correspondait néanmoins à ces groupes de bactéries, il semblerait par conséquent que les techniques utilisées nous ont amenés à les dénombrer par défaut.

Pour déterminer la nature des germes non identifiés (36 %), une étude plus approfondie serait nécessaire. Les résultats précédents nous ont toutefois permis de réduire le taux de germes indéterminés dans le saumon fumé de 88,66 % à 36 %, et si nous avons négligé un groupe dominant dans cette flore, son importance s'en trouve ainsi limitée.

Ce travail a permis une approche de la bactériologie du saumon fumé, mais ceci ne constituait pas le but essentiel de notre étude.

## 1.2. Identifications

Parmi les bactéries isolées lors des dénombrements, un certain nombre ont été identifiées selon les techniques décrites précédemment (II - 6.2.).

### 1.2.1. Résultats

#### Entérobactéries :

- Les identifications d'Entérobactéries provenant du saumon fumé et isolées sur V.R.B.G. ont donné ces résultats :

sur 22 souches identifiées : 11 Enterobacter agglomerans,  
 7 Enterobacter cloacae (ou Serratia liquefaciens)  
 1 Enterobacter hafniae,  
 1 Proteus vulgaris,  
 1 Proteus morganii,  
 1 Citrobacter freundii.

- Des identifications ont été réalisées à partir de souches isolées du saumon à d'autres étapes de sa transformation (ANNEXE 1) :

. sur 4 souches provenant du saumon décongelé et fileté :

3 Enterobacter agglomerans,  
 1 Enterobacter cloacae.

. sur 6 souches provenant du saumon salé et séché :

4 Enterobacter agglomerans,  
 2 Serratia marcescens.

Lactobacilles :

20 souches de Lactobacilles provenant du saumon fumé et isolées sur Rogosa ont été identifiées :

. 13 étaient du genre Lactobacillus dont :

6 correspondaient à un taxon particulier décrit par LABAN (31)

. 7 étaient du genre Streptococcus : Streptococcus lactis.

### Anaérobies :

Nous avons précisé précédemment que notre technique d'isolement des anaérobies nous amenait à dénombrer à la fois des anaérobies stricts et des aérobies - anaérobies facultatifs (III - 1.1.2.).

. 4 souches d'anaérobies facultatifs ont été identifiées, il s'agissait de Streptocoques du groupe D.

. Les 4 souches de germes anaérobies stricts identifiées correspondaient au genre Bacteroïdes.

#### 1.2.2. Commentaires

Le nombre d'identifications effectuées n'est pas suffisant pour que les résultats aient une valeur statistique, nous avons toutefois des indications sur la composition de la flore :

. La flore dominante des Entérobactéries est constituée par le genre Enterobacter ;

. Les Lactobacilles sont représentés par le genre Lactobacillus pour les 2/3 et par le genre Streptococcus pour 1/3.

. Les anaérobies stricts identifiés correspondent à des bactéries gram<sup>-</sup> du genre Bacteroïdes.

## 2. SENSIBILITÉ DES BACTÉRIES À L'ACTION DE LA FUMÉE

### 2.1. Action directe de la fumée

Une suspension bactérienne correctement étalée dans une boîte de Petri est exposée directement à l'action de la fumée pendant des durées variées. Le nombre de bactéries survivantes est déterminé pour chaque durée d'exposition.

#### 2.1.1. Escherichia coli (II - 7.1.1.)

##### 2.1.1.1. Milieu sélectif :

Nous avons effectué les ensemencements dans la gélose au désoxycholate. Les résultats des dénombrements sont présentés dans le tableau suivant :

Durée d'exposition (minutes)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
N. de bactéries vivantes	1100	900	510	520	636	418	463	368	152
Durée d'exposition (minutes)	9	10	11	12	13	14	15	16	17
N. de bactéries vivantes	254	472	199	68	158	148	194	218	0
Durée d'exposition (minutes)	18	19	20	21	22	23	24	25	
N. de bactéries vivantes	4	35	50	129	51	0	35	0	

TABLEAU VIII : VARIATIONS DE LA POPULATION VIVANTE D'ESCHERICHIA COLI (DÉTERMINÉE PAR ENSEMENCEMENT DANS LA GELOSE AU DESOXYCHOLATE) EN FONCTION DE LA DURÉE D'EXPOSITION À L'ACTION DE LA FUMÉE.

Des expériences identiques ont été effectuées en exposant simultanément à l'action de la fumée des bactéries en nombres différents. Les résultats sont portés dans le TABLEAU IX.

Durée d'exposition (minutes)	0	5	10	15	20	25	30	35
N. de bactéries vivantes	90	34	8	0	-	-	-	-
	1000	198	106	22	8	0	-	-
	10000	2640	920	320	114	54	18	0

TABLEAU IX : VARIATIONS DES POPULATIONS VIVANTES D'ESCHERICHIA COLI (DETERMINEES PAR ENSEMENCEMENT DANS LA GELOSE AU DESOXYCHOLATE) EN FONCTION DE LA DUREE D'EXPOSITION A L'ACTION DE LA FUMEE.

Les cinétiques de survie des FIGURES 2 et 3 illustrent les résultats présentés dans les TABLEAUX VIII et IX.

#### 2.1.1.2. Milieu minimum :

Les bactéries qui ont gardé, après leur exposition à l'action de la fumée, leur pouvoir de multiplication ont donné dans le milieu MSB1 gélosé des colonies dont le nombre est porté dans le TABLEAU X.

Durée d'exposition (minutes)	0	1	2	3	4	5	6
N. de bactéries vivantes	145	150	165	116	126	113	107
Durée d'exposition (minutes)	7	8	9	10	11	12	13
N. de bactéries vivantes	113	85	109	102	51	36	46
Durée d'exposition (minutes)	14	15	16	17	18	19	20
N. de bactéries vivantes	33	7	4	10	1	3	0

TABLEAU X : VARIATIONS DE LA POPULATION VIVANTE D'ESCHERICHIA COLI (DETERMINEE PAR ENSEMENCEMENT DANS LE MILIEU MSB 1 GELOSE) EN FONCTION DE LA DUREE D'EXPOSITION A L'ACTION DE LA FUMEE.

Les résultats collectés dans le TABLEAU XI ont été obtenus dans les mêmes conditions, mais avec différents nombres de bactéries soumis à l'action de la fumée.

Durée d'exposition (minutes)	0	5	10	15	20	25	30
N. de bactéries vivantes	5000	2040	500	-	8	1	0
	$5 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	5600	950	140	25	8
	$5 \cdot 10^5$	-	-	17000	2060	360	65
	$5 \cdot 10^6$	-	-	-	15000	2720	750

TABLEAU XI : VARIATIONS DES POPULATIONS VIVANTES D'ESCHERICHIA COLI (DETERMINEES PAR ENSEMENCEMENT DANS LE MILIEU MSB 1 GELOSE) EN FONCTION DE LA DUREE D'EXPOSITION A L'ACTION DE LA FUMEE.



Les résultats des dénombrements présentés dans les TABLEAUX X et XI ont permis d'établir les cinétiques représentées sur les FIGURES 4 et 5.

#### 2.1.2. Staphylococcus aureus (II - 7.1.2.)

En soumettant à l'action directe de la fumée une culture pure de Staphylococcus aureus, nous avons obtenu les résultats portés dans le TABLEAU XII.

Durée d'exposition (minutes)	0	2	4	6	8	10
N. de bactéries vivantes	291	273	135	179	71	55
Durée d'exposition (minutes)	12	14	16	18	20	22
N. de bactéries vivantes	48	22	18	27	2	0

TABLEAU XII : VARIATIONS DE LA POPULATION VIVANTE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (DETERMINEE PAR ENSEMENCEMENT SUR LA GELOSE DE BAIRD PARKER) EN FONCTION DE LA DUREE D'EXPOSITION A L'ACTION DE LA FUMEE.

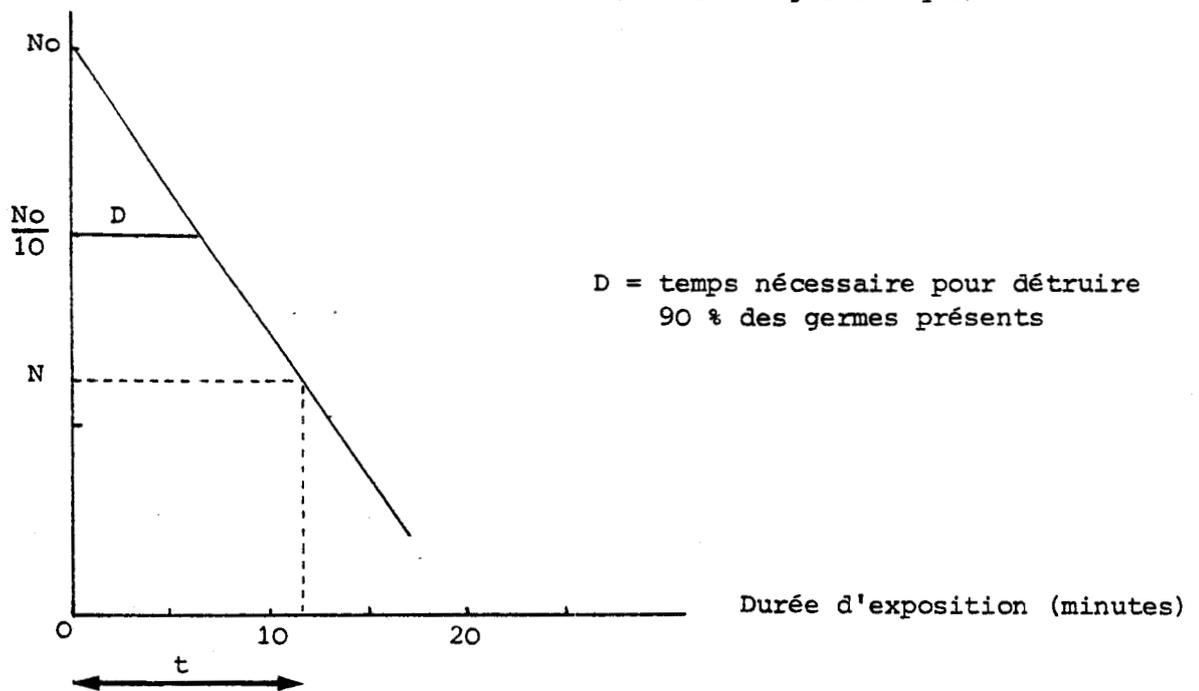
Ces numérations ont permis d'établir la cinétique de survie d'une population de Staphylococcus aureus exposée à l'action directe de la fumée (FIGURE 6).

#### 2.1.3. Commentaires

On peut constater sur les FIGURES 3 et 5 que les cinétiques de survie de populations d'Escherichia coli (en log) soumises à l'action directe de la fumée sont matérialisées par des droites :

$$\log N = f(t)$$

Nombre de bactéries survivantes (échelle logarithmique)



Ces cinétiques peuvent être comparées à celle qui exprime le logarithme du nombre de bactéries survivantes en fonction de la durée d'un traitement thermique (45).

Des résultats présentés dans les TABLEAUX IX et XI, il est possible de dégager une loi expérimentale :

pour une densité de fumée donnée, le nombre de bactéries qui survit à l'exposition directe à l'action de la fumée décroît de façon exponentielle en fonction de la durée d'application de ce traitement.

Expression mathématique de cette loi :

- . Soit  $N_0$  : nombre de bactéries vivantes initialement présentes,
- $N$  : nombre de bactéries vivantes après une exposition à l'action de la fumée d'une durée  $t$  ;

. pour une densité de fumée constante dans le fumoir :

$$\frac{\log N_0 - \log N}{t} = \frac{1}{D}$$

ou  $\log \frac{N_0}{N} = \frac{t}{D}$

D étant constant :  $\log \frac{N_0}{N}$  est une fonction linéaire de t.

Durée d'exposition (minutes)	0	5	10	15	20	25	30
$\frac{N_0}{N}$	1	5,05	9,43	45,45	125	-	-
	1	3,78	10,86	31,25	87,71	185,18	555,55

TABLEAU XIII : (REALISE A PARTIR DES RESULTATS DU TABLEAU IX)

VARIATIONS DES POPULATIONS VIVANTES D'ESCHERICHIA COLI EN FONCTION DE LA DUREE D'EXPOSITION A L'ACTION DE LA FUMEE

La FIGURE 7, effectuée à partir du TABLEAU XIII, exprime :

$$\log \frac{N_0}{N} = f(t)$$

Puisque nous obtenons des droites, nous constatons que les résultats concordent avec l'expression mathématique formulée ci-dessus.

Ainsi, les cinétiques de survie des bactéries soumises à l'action directe de la fumée sont analogues à celles des bactéries soumises à tout traitement bactéricide ou bactériostatique.

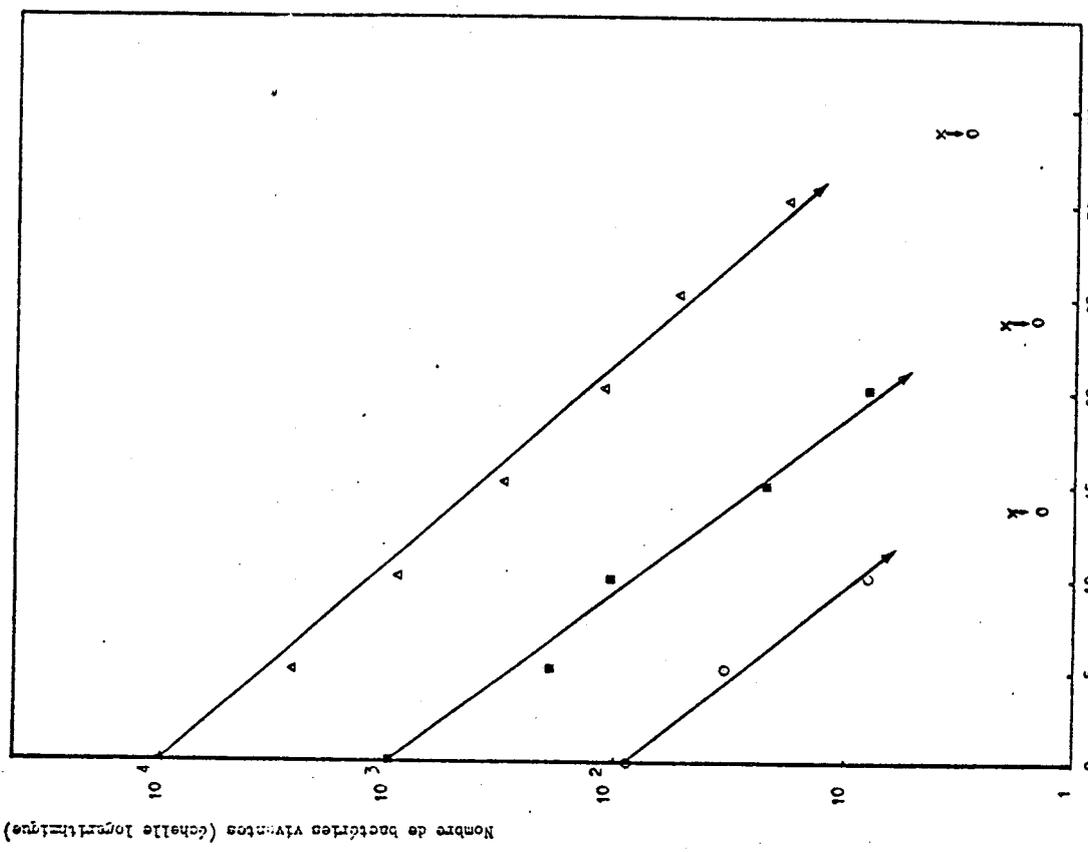


Figure 1 : Cinétiques de survie de populations d'*E. coli* soulevées à l'action directe de la fumée et cultivées dans la gélose au désoxycholate. (pour des nombres initiaux de bactéries différents).

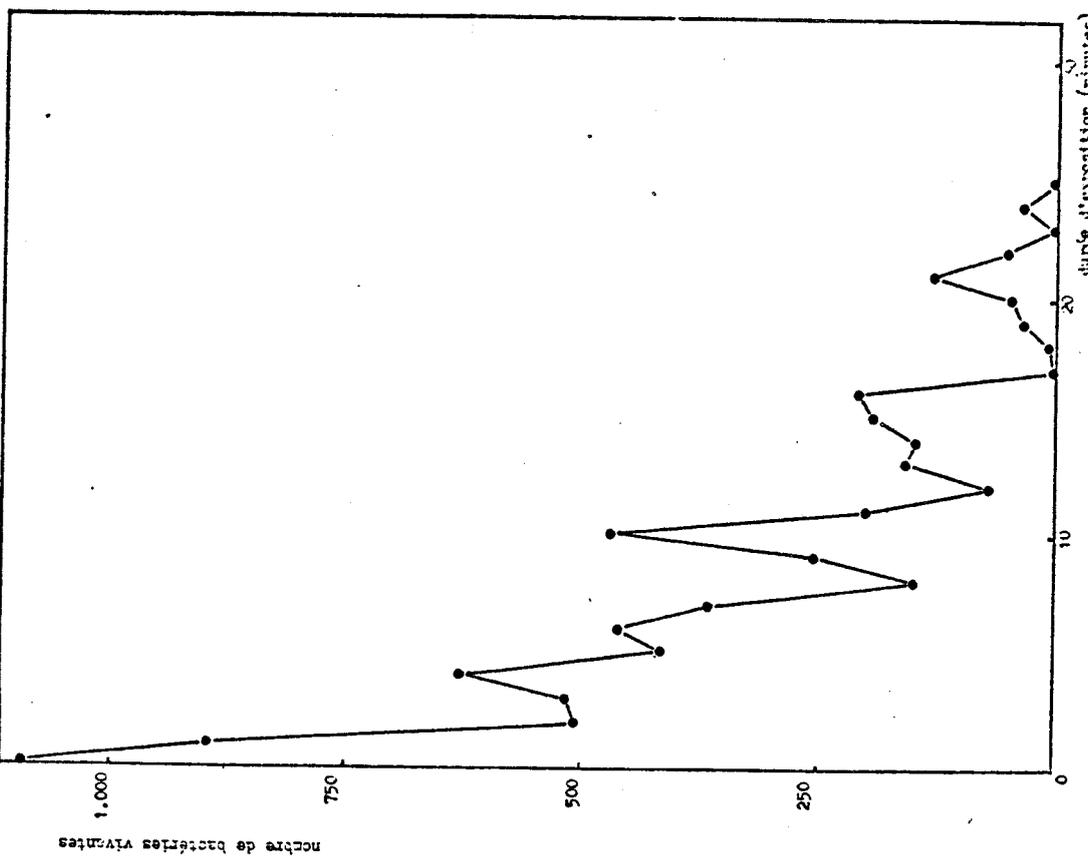


Figure 2 : Cinétique de survie d'une population d'*E. coli* soulevée à l'action directe de la fumée et cultivée dans la gélose au désoxycholate.



Nombre de bactéries vivantes (échelle logarithmique)

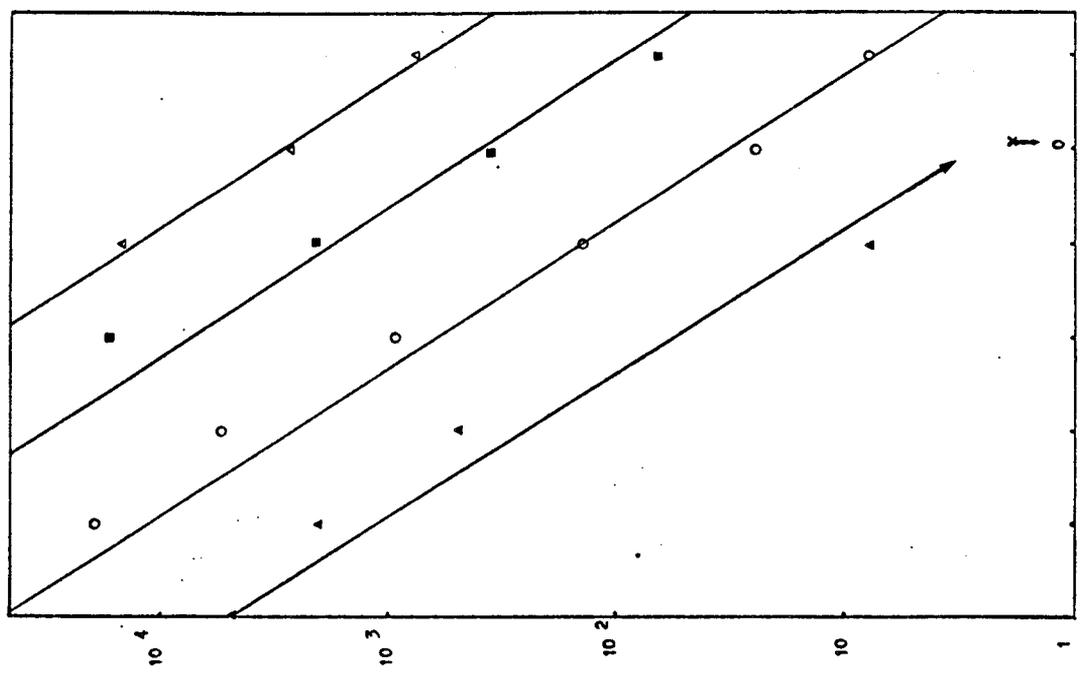


Figure 5 : Cinétiques de survie de populations d'*Bacillus coli communis* à l'action directe de la fumée et cultivées dans le milieu MS9 1 gélosé. (pour des retards initiaux de bactéries différentes).

Nombre de bactéries vivantes (échelle logarithmique)

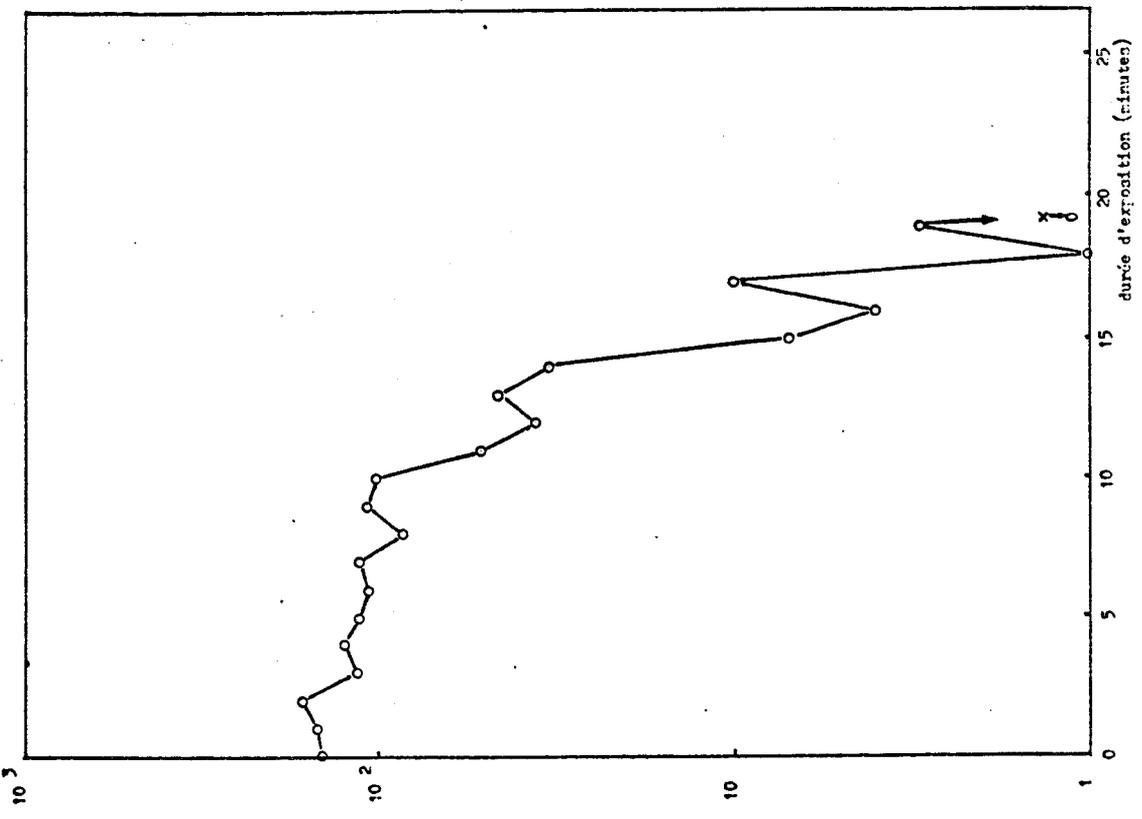
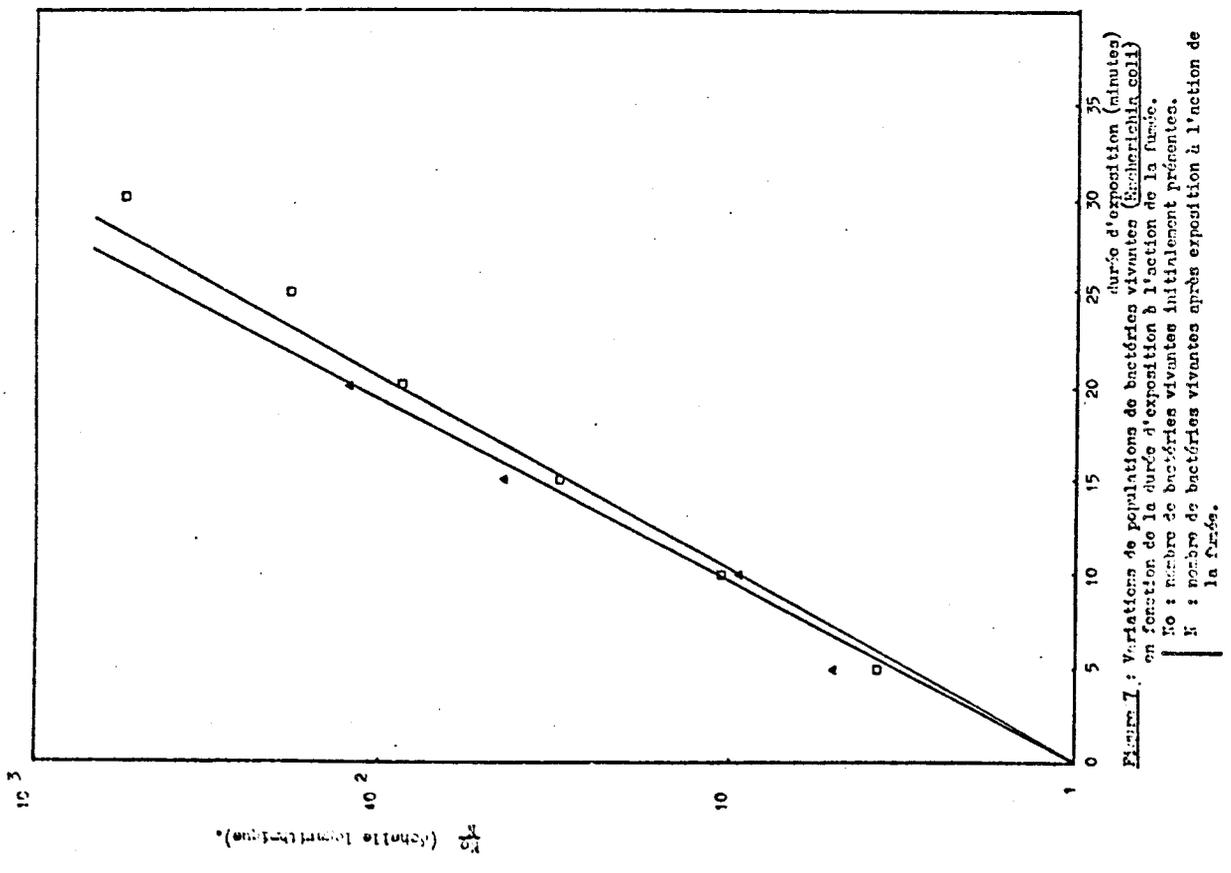
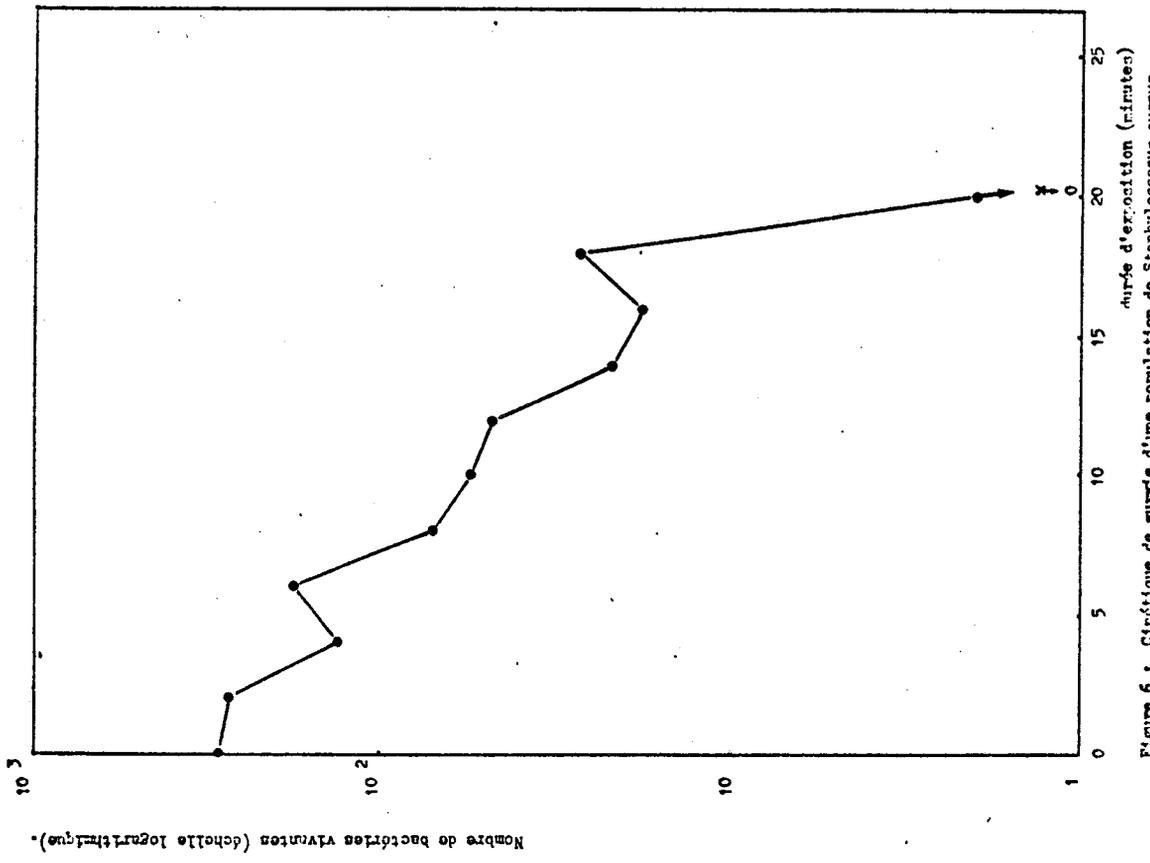


Figure 4 : Cinétique de survie d'une population d'*Bacillus coli communis* à l'action directe de la fumée et cultivée dans le milieu MS9 1 gélosé.





## 2.2. Action indirecte de la fumée

Une suspension bactérienne ensemencée dans un milieu gélosé est soumise pendant toute son incubation (48 heures) à l'action de substances empyreumatiques de concentrations variées. Le nombre de bactéries survivantes est déterminé pour chacune de ces concentrations.

Il semble important de rappeler ici la remarque faite précédemment au sujet des techniques d'exposition des bactéries à l'action indirecte de la fumée (II - 7.2.) ; dans ces expériences, la concentration en fumée est proportionnelle à la "durée d'exposition" de la couche inférieure de gélose (cette opération étant réalisée avant l'ensemencement) : ceci sera rappelé par un astérisque. La concentration en fumée sera donc exprimée par la lettre c affectée d'un chiffre signifiant la durée d'exposition correspondante (en minutes).

### 2.2.1. Escherichia coli (II - 7.2.1.)

#### 2.2.1.1. Milieu sélectif :

Expérience n° 1								
Concentration en fumée *	c0	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7
N. de bactéries vivantes	55	58	59	57	62	48	39	46
Concentration en fumée *	c8	c10	c12	c14	c16	c18	c20	c22
N. de bactéries vivantes	30	21	21	22	7	5	2	0
Expérience n° 2								
Concentration en fumée *	c0	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7
N. de bactéries vivantes	121	119	180	150	140	-	116	121
Concentration en fumée *	c8	c9	c10	c11	c12	c13	c14	c15
N. de bactéries vivantes	104	102	102	85	90	118	70	55
Concentration en fumée *	c16	c17	c18	c19	c20	c22	c24	
N. de bactéries vivantes	81	86	32	33	27	27	0	

**TABLEAU XIV : VARIATIONS DE LA POPULATION DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES). LES ENSEMENCEMENTS DES E. COLI ONT ETE EFFECTUES DANS LA GELOSE AU DESOXYCHOLATE.**

Des expériences identiques ont été réalisées en soumettant simultanément des nombres différents de microorganismes à l'action des substances empyreumatiques :



Expérience n° 1					
Concentration en fumée *	c0	c10	c15	c20	c25
N. de bactéries vivantes	1 000	548	114	8	0
	$10^4$	4 800	1 450	60	0
	$10^5$	50 000	12 000	800	0
Expérience n° 2					
Concentration en fumée *	c0	c10	c20	c30	
N. de bactéries vivantes	105	78	43	0	
	1 100	880	700	0	
	$10^4$	9 000	8 000	0	
	$10^5$	$10^5$	30 000	0	
	$10^6$	$10^6$	150 000	0	
	$10^7$	$10^7$	500 000	0	
	$10^8$	$10^8$	$10^6$	0	

TABLEAU XV : VARIATIONS DES POPULATIONS DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES). LES ENSEMENCEMENTS DES E. COLI ONT ETE EFFECTUES DANS LA GELOSE AU DESOXYCHOLATE.



Les numérations des TABLEAUX XIV et XV ont permis d'établir les courbes de survie de populations d'Escherichia coli en fonction de la concentration en fumée :

- . la FIGURE 8 correspond aux expériences n<sup>os</sup> 1 et 2 du TABLEAU XIV,
- . la FIGURE 9 correspond à l'expérience n° 1 du TABLEAU XV.

2.2.1.2. Milieu minimum :

Concentration en fumée *	c0	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8
N. de bactéries vivantes	550	450	400	300	340	300	320	300	250
Concentration en fumée *	c9	c10	c11	c12	c13	c14	c15	c16	c17
N. de bactéries vivantes	330	200	224	290	210	65	6	15	0

TABLEAU XVI : VARIATIONS DE LA POPULATION DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES). LES ENSEMENCEMENTS DES E. COLI ONT ETE REALISES DANS LE MILIEU MSB 1 GELOSE.

Les mêmes expériences effectuées simultanément avec des nombres initiaux de bactéries différents ont donné les résultats présentés dans le TABLEAU XVII :

Concentration en fumée *	c0	c10	c20	c30
N. de bactéries vivantes	150	46	8	0
	1 500	240	32	0
	$15 \cdot 10^3$	3 350	315	0
	$15 \cdot 10^4$	35 000	1 600	0
	$15 \cdot 10^5$	560 000	10 000	0

TABLEAU XVII : VARIATIONS DES POPULATIONS DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES). LES ENSEMENCEMENTS DES E.COLI ONT ETE REALISES DANS LE MILIEU MSB 1 GELOSE.

Les courbes de survie des FIGURES 10 et 11 ont été tracées à partir des dénombrements portés dans les TABLEAUX XVI et XVII.

#### 2.2.2. Staphylococcus aureus (II - 7.2.2.)

Les résultats des dénombrements de Staphylocoques vivants, ayant subi durant toute leur incubation l'action de substances empyreumatiques de concentrations variées, sont présentés dans le tableau suivant :

Concentration en fumée *	c0	c1	c2	c3	c4	c5	c6
N. de bactéries vivantes	95	88	66	41	47	29	18
Concentration en fumée *	c7	c8	c10	c12	c16	c20	
N. de bactéries vivantes	34	18	14	33	10	0	

TABLEAU XVIII : VARIATIONS DE LA POPULATION DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES). LES ENSEMENCEMENTS DES STAPHYLOCOCCUS AUREUS ONT ETE EFFECTUES SUR LA GELOSE DE BAIRD PARKER.

La FIGURE 12 illustre ces résultats.

### 2.2.3. Commentaires

\* Dans ces expériences les bactéries sont soumises à diverses concentrations de fumée, mais la durée d'application du traitement est toujours la même : elle correspond à la totalité du temps d'incubation de ces germes.

On sait que la vitesse de destruction des bactéries est proportionnelle au nombre de bactéries vivantes :

$$v = - \frac{dN}{dt} = k \cdot N$$

La constante  $k$  est fonction de la concentration en bactéricide :

$$k = k' \cdot C^n \quad C = \text{concentration du bactéricide,}$$

$$n = \text{exposant caractéristique du bactéricide}$$

$$(n > 0)$$

ce qui a été démontré par WATSON (66), qui a par ailleurs proposé une formule mathématique ( $C^n t = Cte$ ) déterminée de façon empirique à partir des données fournies par CHICK (8).

$$v = - \frac{dN}{dt} = k' \cdot C^n \cdot N$$

$$\int_{N_0}^N - \frac{dN}{N} = k' \cdot C^n \int_0^t dt$$

$N_0$  = nombre de bactéries vivantes initialement présentes

$N$  = nombre de bactéries vivantes après contact avec le bactéricide

$$\text{Log} \frac{N_0}{N} = k' \cdot C^n \cdot t$$

$$\log \frac{N_0}{N} = \frac{k'}{2,302} C^n \cdot t$$

$$\log. \log \frac{N_0}{N} = \log \frac{k' t}{2,302} + n \cdot \log C$$

$$\text{pour un temps d'action donné } t_1 : \quad \log \frac{k' \cdot t_1}{2,302} = K$$

$\log. \log \frac{N_0}{N} = K + n \log C$
---

Concentration en fumée *	c0	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7
$\frac{No}{N}$	1	0,94	0,93	0,96	0,88	1,14	1,41	1,19
$\log \frac{No}{N}$	0	(-0,03)	(-0,04)	(-0,02)	(-0,06)	0,05	0,15	0,07
Concentration en fumée *	c8	c10	c12	c14	c16	c18	c20	c22
$\frac{No}{N}$	1,83	2,61	2,61	2,50	7,85	11	27,5	-
$\log \frac{No}{N}$	0,26	0,41	0,41	0,39	0,89	1,04	1,43	-

TABLEAU XIX : (réalisé à partir des résultats du TABLEAU XIV - n° 1)

VARIATIONS DE LA POPULATION VIVANTE D'E.COLI EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE.

No = nombre de bactéries vivantes initialement présentes

N = nombre de bactéries vivantes après une exposition de 48 heures à une concentration de fumée c.

Concentration en fumée *	c0	c10	c15	c20
$\frac{No}{N}$	1	1,82	8,77	125
$\log \frac{No}{N}$	0	0,26	0,94	2,09
$\frac{No}{N}$	1	2,08	6,89	166,66
$\log \frac{No}{N}$	0	0,31	0,83	2,22
$\frac{No}{N}$	1	2,00	8,33	125
$\log \frac{No}{N}$	0	0,30	0,92	2,09

TABLEAU XX : (réalisé à partir des résultats du TABLEAU XV - n° 1)

VARIATIONS DE LA POPULATION VIVANTE D'E.COLI EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

Les valeurs du TABLEAU XX ont permis de mettre en évidence la relation linéaire existant entre les 2 variables (FIGURE 13) selon l'équation :

$$\log . \log \frac{No}{N} = K + n \log C$$



En effet, par calcul statistique on a pu établir les valeurs des paramètres de la droite de régression :

$$\log . \log \frac{N_0}{N} = 3,4010 + 2,8626 \log C$$

L'estimation du coefficient de corrélation ( $r = 0,9971$ ) qui est nettement supérieur à la valeur trouvée pour un nombre de degrés de liberté de 7 au risque de 5 % ( $r = 0,06664$ ) indique que nos données expérimentales s'ajustent parfaitement à la droite de régression. Ce résultat est largement confirmé par le test de STUDENT qui pour un "t" = 34,9495 indique que le risque pris est inférieur à 1 ‰.

La valeur de l'exposant de WATSON qui est égale à la pente de la droite de régression peut donc être estimée à 2,86.

(Les résultats du TABLEAU XIX peuvent se rapporter à cette droite de régression, avec une erreur due aux faibles nombres N et  $N_0$ ).

\* Lors de l'utilisation d'un milieu sélectif, il était permis de penser que les inhibiteurs présents dans ce type de milieu étaient susceptibles d'avoir une incidence quelconque sur l'action de la fumée, il nous a donc paru souhaitable de répéter les expériences en employant un milieu minimum. Nous pouvons constater que les résultats obtenus avec celui-ci sont analogues à ceux obtenus avec un milieu sélectif (qu'il s'agisse des dernières expériences utilisant le procédé d'action indirecte de la fumée ou des expériences antérieures utilisant le procédé d'action directe).

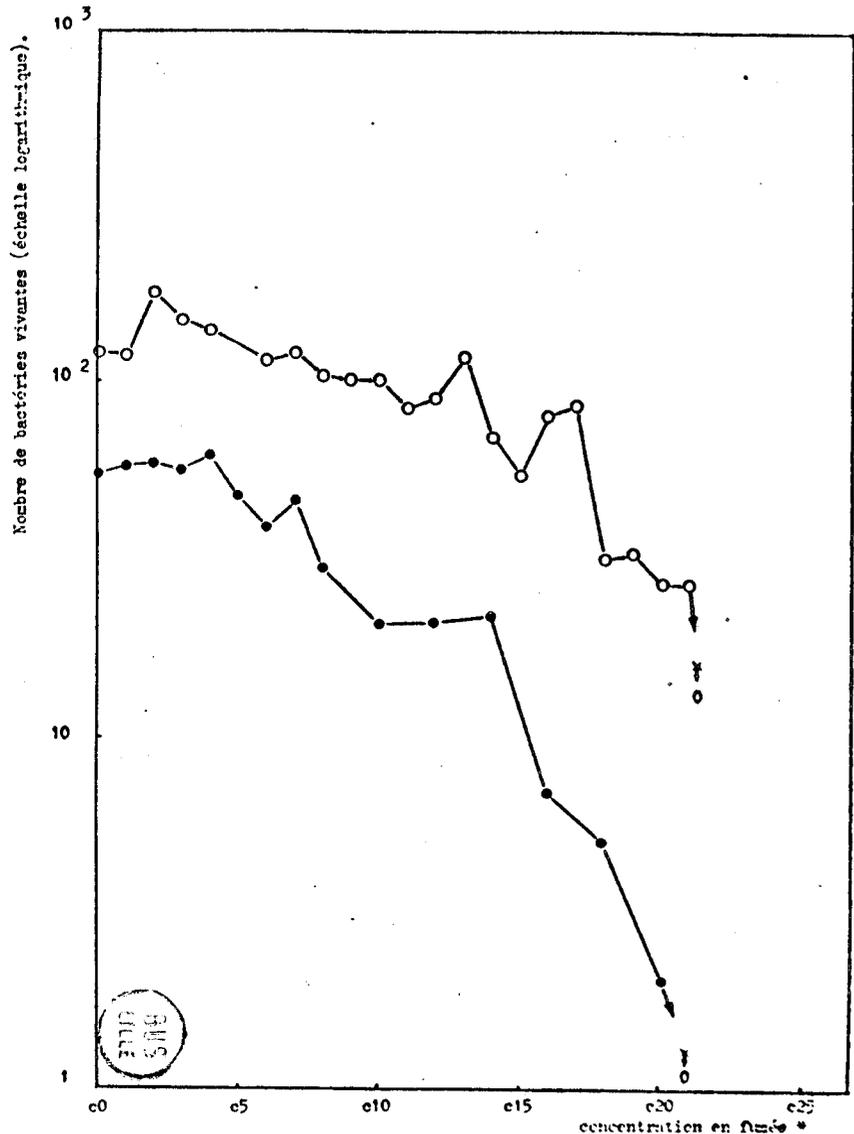


Figure 8 : Courbes de survie de populations d'*Escherichia coli* en fonction de la concentration de fumée. (pr des nombres init. de bact. différents).  
 Les encerclements ont été réalisés dans la gélose au déoxy-cholate et les dénombrements effectués après un contact de 48 heures.

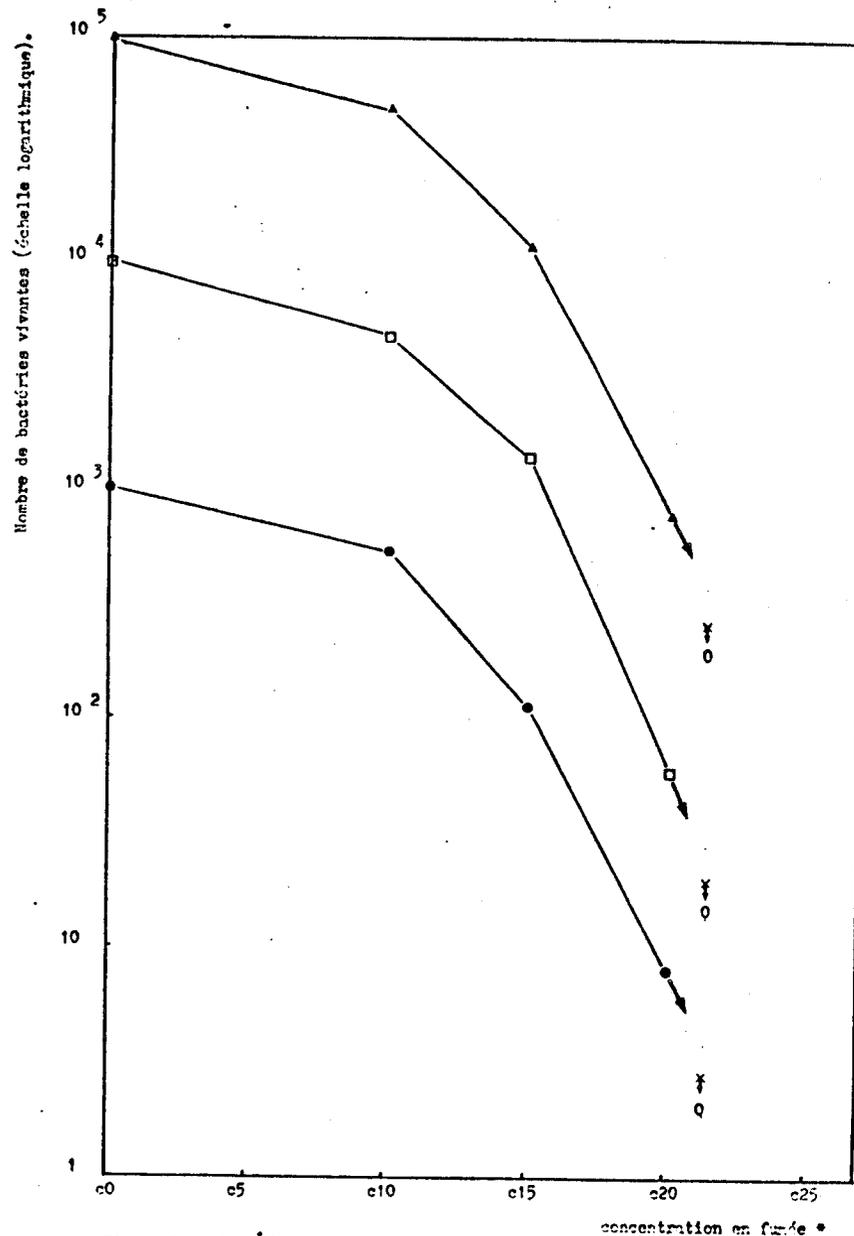
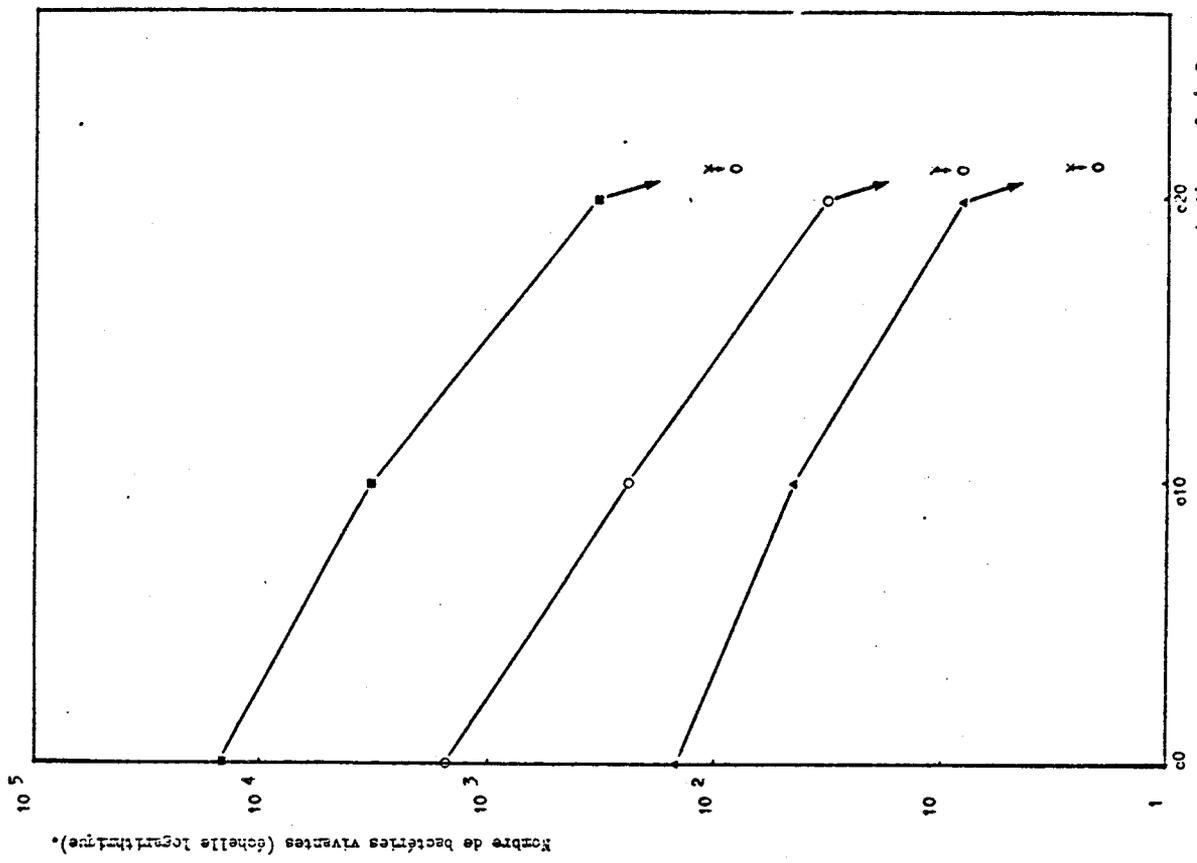
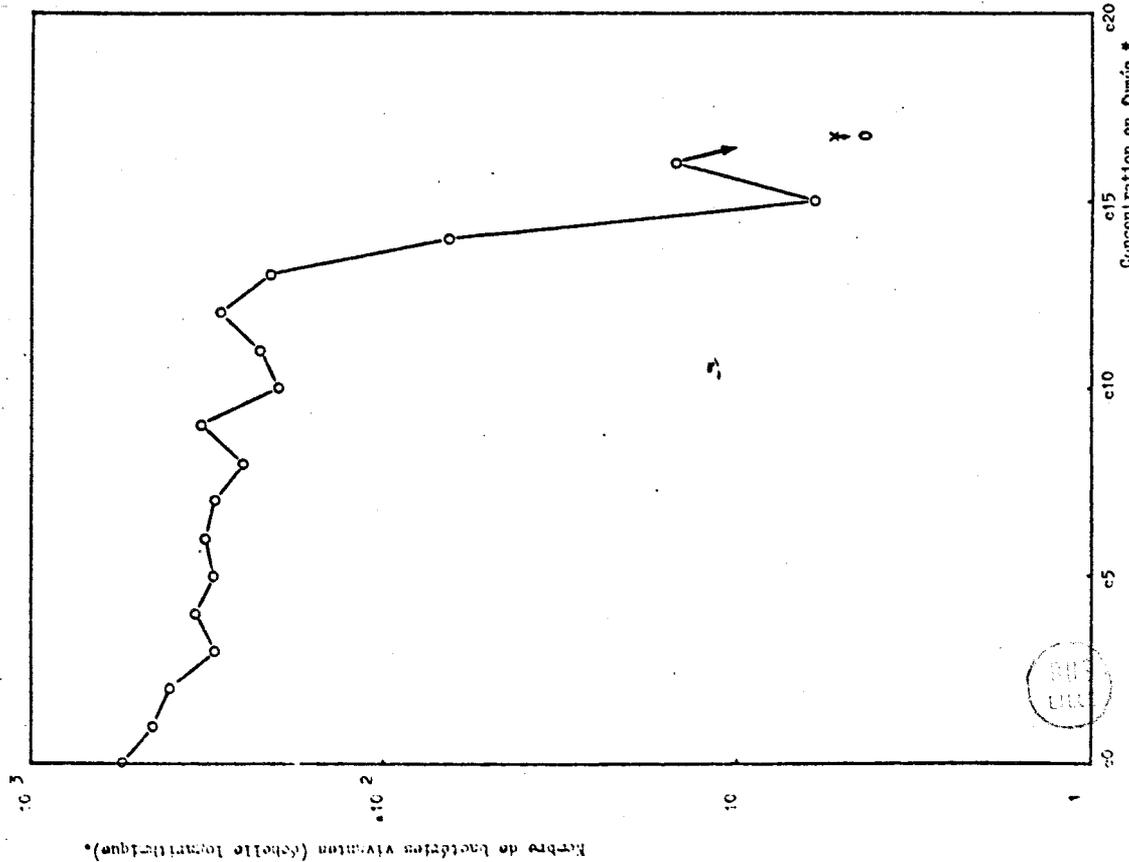


Figure 9 : même légende que figure 8.-



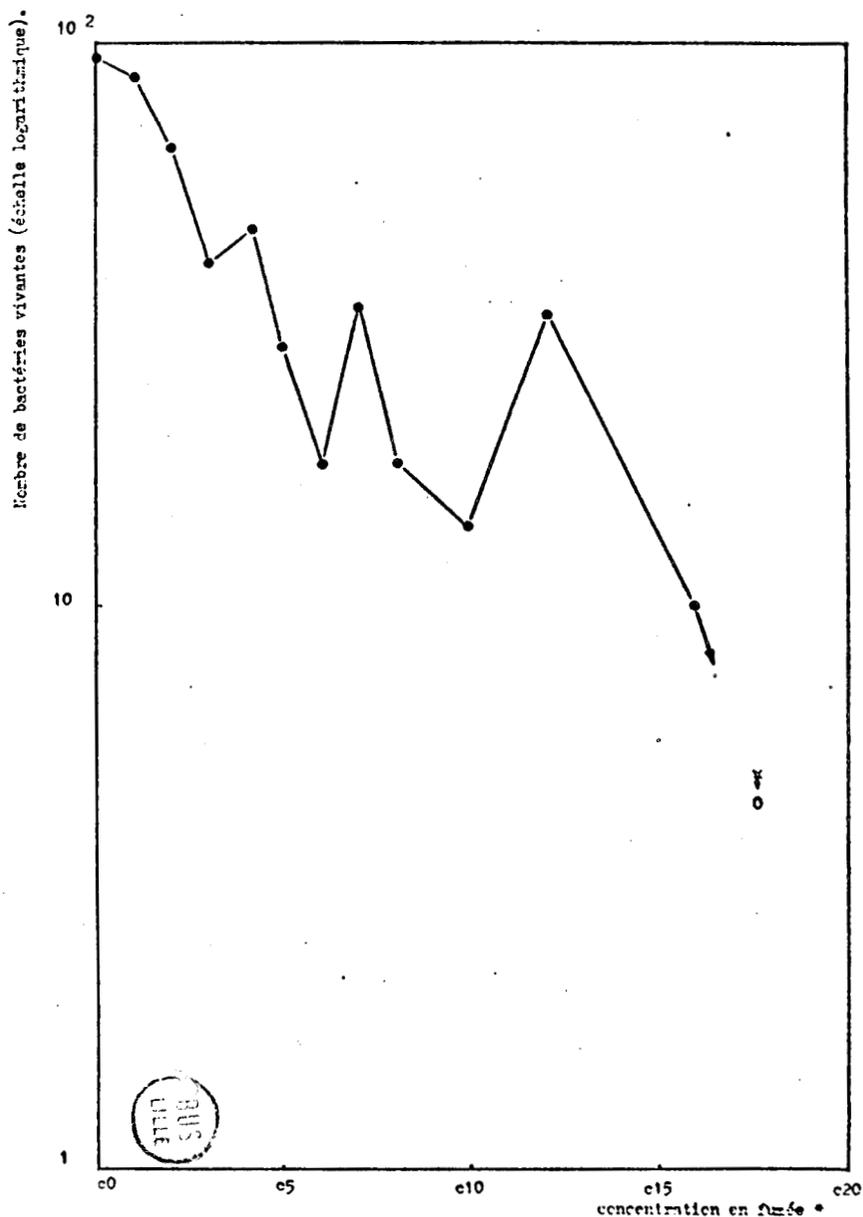


Figure 12 : Courbe de survie d'une population de *Staphylococcus aureus* en fonction de la concentration en fumée.

Les ensemencements ont été réalisés dans la gélose de Baird Parker et les dénombrements effectués après un contact de 48 heures.

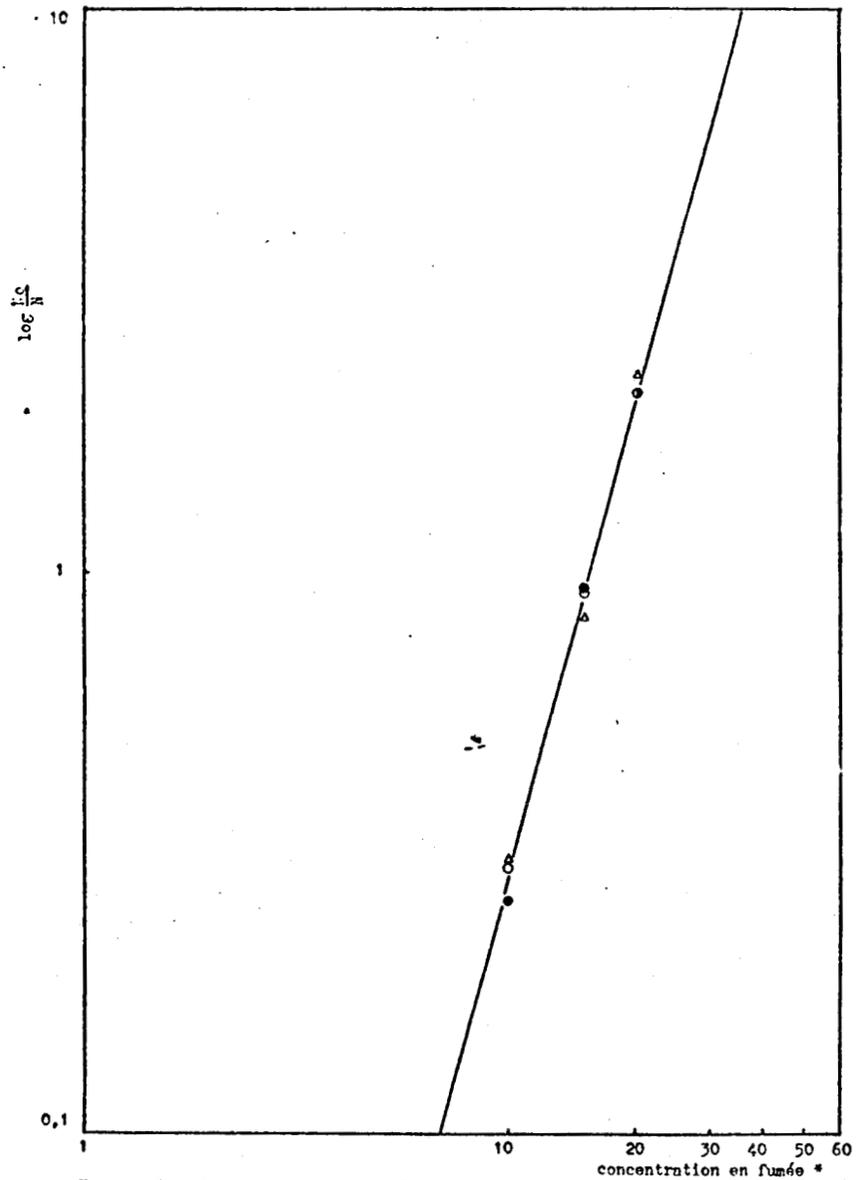


Figure 13 : Variations de la population des bactéries vivantes (*Escherichia coli*) en fonction de la concentration en fumée - (échelle bi-logarithmique).

N<sub>0</sub> : nombre de bactéries vivantes initialement présentes.  
N : nombre de bactéries vivantes après contact avec la fumée.

### 2.3. Détermination de l'action bactéricide ou bactériostatique de la fumée

Pour essayer d'analyser le mode d'action de la fumée, nous pouvons noter ici des constatations effectuées lors des dénombrements (III - 1.1.1.) et des identifications (III - 1.2.1.) :

#### - DENOMBREMENTS

Lors des dénombrements réalisés d'une part sur un filet de saumon prélevé immédiatement avant fumage, d'autre part sur le même filet après fumage, on constate que les bactéries isolées du saumon fumé ont un développement plus lent et qu'elles nécessitent généralement un temps d'incubation plus long.

#### - IDENTIFICATIONS

##### . Lactobacilles :

Sur le milieu de Rogosa, les bactéries provenant du saumon fumé ne donnent des colonies visibles qu'après plusieurs jours d'incubation, 4 jours ou parfois même 5 jours, alors que celles qui proviennent du saumon non fumé donnent des colonies en 48 heures.

Lors du passage sur milieu MRS complet, la multiplication se manifeste habituellement par un trouble après 24 heures d'incubation. Dans le cas présent, il faut attendre généralement 48 heures ou même davantage.

Sur les galeries d'identification, les caractères positifs doivent être relevés au bout de 3, 6, 24 et 48 heures ; or les premiers caractères positifs apparaissent ici après 24 ou même 48 heures. Il est

donc nécessaire pour effectuer des identifications dans des conditions satisfaisantes de passer auparavant plusieurs fois sur milieu MFS complet (3 ou 4 fois, jusqu'à ce qu'un trouble puisse être obtenu en 24 heures).

. Entérobactéries :

La même manifestation d'un temps de latence important s'observe dans les galeries d'identification des entérobactéries. Pour obtenir des résultats en 24 heures, c'est-à-dire dans des conditions normales, il est indispensable de cultiver ces bactéries dans un bouillon nutritif avant l'ensemencement.

2.3.1. Exposition de cultures pures d'Escherichia coli à l'action indirecte de la fumée

Le procédé permettant l'exposition à l'action indirecte de la fumée (II - 7.2.1.) est utilisé avec les modifications suivantes :

. 3 boîtes (au lieu d'1) sont exposées pour chacun des temps de séjour de la gélose dans le fumoir, après quoi on dépose comme dans les expériences précédentes des bactéries que l'on inclut dans le milieu MSB 1 gélosé ;

. les numérations sont effectuées après 24 et 48 heures d'incubation.

Concentration en fumée *	c0	c4	c8	c12	c16	c20
N. de bactéries vivantes (lecture après 24 h d'incubation)	153	0	0	0	0	0
	175	0	0	0	0	0
	187	0	0	0	0	0
Moyenne :	171	0	0	0	0	0
N. de bactéries vivantes (lecture après 48 h d'incubation)	153	181	65	34	0	0
	175	131	71	11	4	0
	187	143	79	13	0	0
Moyenne :	171	151	71	19	1	0

TABLEAU XXI : VARIATIONS DE LA POPULATION DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES 24 et 48 HEURES D'INCUBATION).

LES ENSEMENCEMENTS DES E.COLI ONT ETE EFFECTUES DANS LE MILIEU MSB 1 GELOSE.

Nous constatons dans ces expériences réalisées avec Escherichia coli qu'un certain nombre de bactéries soumises à la fumée peuvent donner des colonies de taille normale si on prolonge l'incubation, alors qu'elles ne donnent pas de colonies visibles après une durée normale d'incubation :

- 1° - 24 heures d'incubation : seules les bactéries qui n'ont pas été sou-  
+++++  
mises à l'action de la fumée se sont développées normalement en 24 heures ;

2° - 48 heures d'incubation : les bactéries soumises à l'action de la  
 ++++++  
 fumée ont nécessité une durée d'incubation de  
 48 heures pour donner des colonies visibles.  
 (Le nombre de bactéries vivantes diminue lorsque  
 la concentration en fumée augmente).

2.3.2. Expérience de détermination de l'action de la fumée

Des suspensions bactériennes (Escherichia coli) identiques  
 sont soumises à l'action directe de la fumée pendant des durées d'exposi-  
 tion différentes puisensemencées en boîtes de Petri ; des suspensions  
 analogues subissent le même traitement mais sont filtrées et lavées avant  
 d'êtreensemencées (II - 8) : des dénombrements sont effectués après incu-  
 bation pour permettre une comparaison.

Durée d'exposition (minutes)	0	2	4	6	8	10	15	20	25
N. de bactéries vivantes <u>série 1</u> : sans lavage	156	182	147	113	74	19	0	0	0
N. de bactéries vivantes									
<u>série 2</u> : avec									
boîte a						15	7	0	0
boîte b						11	2	0	0
lavage des bactéries									
T O T A L						26	9	0	0

TABEAU XXII : VARIATIONS DE LA POPULATION VIVANTE D'E. COLI DETERMINEE PAR  
 ENSEMENCEMENT DANS LE MILIEU MSB 1 GELOSE, EN FONCTION DE LA  
 DUREE D'EXPOSITION A L'ACTION DE LA FUMEE (SERIE 1 : SANS  
 TRAITEMENT INTERMEDIAIRE ; SERIE 2 : AVEC FILTRATION ET LAVAGE)

La série 1 a permis d'établir la cinétique de survie de la population d'E. coli soumise à l'action directe de la fumée : il n'apparaît aucune colonie lorsque la durée d'exposition est égale ou supérieure à 15 minutes.

Les résultats de la série 2 (avec lavage des bactéries) sont les suivants :

- . le nombre de colonies correspondant à une durée d'exposition de 10 minutes est supérieur au nombre obtenu dans la série 1 ;
- . une exposition de 15 minutes permet encore d'obtenir des colonies ;
- . aucune colonie n'apparaît si la durée d'exposition est égale ou supérieure à 20 minutes.

### 2.3.3. Commentaires

Les dénombrements et les identifications des bactéries issues du saumon fumé nous ont amenés à constater la nécessité d'une durée d'incubation supérieure à la normale (par comparaison avec des bactéries provenant de saumon non fumé).

Par ailleurs, lorsque des bactéries sont soumises à l'action de la fumée en boîtes de Petri, elles nécessitent pour se multiplier et donner des colonies visibles un allongement de la durée d'incubation (par comparaison avec des bactéries qui ne subissent pas ce traitement).

On est donc amené à admettre que l'action (indirecte) de la fumée, lorsque sa concentration ne dépasse pas certaines limites

[ c'est-à-dire dans notre expérience (III - 2.3.1.) lorsque la concentration est inférieure ou égale à  $10^{-6}$  ], peut se manifester par l'apparition d'un temps de latence important, sans que les germes soient détruits.

La dernière expérience réalisée nous a conduits à ces constatations :

. un certain nombre de bactéries qui ne se développent pas après une exposition de 10 minutes dans le fumoir se révèlent aptes à une croissance normale après un lavage à l'eau peptonée (sans lavage : 19 colonies ; après lavage : 26 colonies ; différence : 7) ;

. alors qu'aucune bactérie ne se multiplie après une exposition de 15 minutes suivie directement d'un ensemencement, quelques bactéries peuvent donner des colonies si l'ensemencement est précédé d'un lavage à l'eau peptonée.

Ainsi, après une exposition de 15 minutes à la fumée, la croissance et la multiplication des bactéries sont inhibées si l'ensemencement est effectué sans opération intermédiaire, mais les mêmes bactéries sont capables de se multiplier, dans certains cas, si elles sont lavées. Ceci prouve donc que la fumée a inhibé la croissance et la multiplication bactérienne mais que cette inhibition n'est pas irréversible, si toutefois la durée d'exposition (à l'action directe de la fumée) ne dépasse pas certaines limites [ c'est-à-dire dans notre expérience (III - 2.3.2.) lorsque cette durée est inférieure ou égale à 15 minutes ]. Il est ainsi démontré que l'action de la fumée est bactériostatique.

### 3. INFLUENCE DES SUBSTANCES BIOLOGIQUES SUR L'ACTION DE LA FUMÉE

#### 3.1. Influence du tissu musculaire

##### 3.1.1. Comparaison de l'action directe de la fumée sur des bactéries en suspension dans de l'eau salée et sur des bactéries en suspension dans un broyat de saumon

Dans ces expériences, les germes (Escherichia coli) sont soumis à l'action directe de la fumée, mais dans les conditions suivantes (II - 9.1) :

. Dans la série A, les bactéries exposées sont en suspension dans de l'eau salée,

. Dans la série B, elles sont incluses dans un broyat de saumon dilué au quart dans de l'eau salée.

Durée d'exposition (minutes)	0	5	10	15
N. de bactéries vivantes série A	198	148	32	0
N. de bactéries vivantes série B	195	182	162	127

TABLEAU XXIII : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES (DETERMINE DANS LE MILIEU MSB 1 GELOSE) EN FONCTION DE LA DUREE D'EXPOSITION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE (x = 0,3 ml) A L'ACTION DE LA FUMEE.  
Série A : suspension dans de l'eau salée,  
Série B : suspension dans un broyat de saumon.

Durée d'exposition (minutes)	0	10	20	30	40	50
N. de bactéries vivantes série A	1600	99	1	0	0	0
N. de bactéries vivantes série B	1600	373	33	28	1	0

TABLEAU XXIV : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES (DETERMINE DANS LE MILIEU MSB 1 GELOSE) EN FONCTION DE LA DUREE D'EXPOSITION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE (x = 0,1 ml) A L'ACTION DE LA FUMEE.  
(Cf. Fig. 14)  
Série A : suspension dans de l'eau salée,  
Série B : suspension dans un broyat de saumon.

Pour une durée d'exposition déterminée à l'action directe de la fumée, le nombre de bactéries survivant à ce traitement est plus élevé lorsque la suspension est effectuée dans le broyat de saumon (série B). (Cette manipulation a été réalisée en second lieu avec 0,1 ml de broyat car on obtient dans ces conditions un meilleur étalement qu'avec 0,3 ml).

3.1.2. Comparaison de l'action des composants de la fumée dissous dans une gélose blanche et de celle des composants dissous dans une gélose additionnée d'un broyat de saumon

Les bactéries (Escherichia coli) sont soumises à l'action indirecte de la fumée, mais les particularités de ces expériences sont les suivantes (II - 7.2) :

- Dans la série A la couche exposée à la fumée est une gélose pure,

- Dans la série B la couche exposée à la fumée est une gélose additionnée d'un broyat de saumon dilué au quart (x ml de broyat).

Milieu sélectif :

Concentration en fumée *	c0	c5	c10	c15	c20	c25	c30
N. de bactéries vivantes série A : N1	1100	965	930	914	861	90	0
N. de bactéries vivantes série B : N2	1100	1016	1040	978	948	420	39

TABLEAU XXV : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES (DETERMINE DANS LA GELOSE AU DESOXYCHOLATE) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE.

Série A : témoin

Série B : la couche inférieure de gélose est additionnée de 2 ml de broyat

Concentration en fumée *	c0	c5	c10	c15	c20	c25
N. de bactéries vivantes série A : N1	80	66	50	9	0	0
N. de bactéries vivantes série B : N2	80	79	70	41	1	0

TABLEAU XXVI : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES (DETERMINE DANS LA GELOSE AU DESOXYCHOLATE) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE.

Série A : témoin

Série B : la couche inférieure de gélose est additionnée de 3,5 ml de broyat.

Concentration en fumée *	c0	c5	c10	c15	c20
N. de bactéries vivantes série A : N1	130	103	65	0	0
N. de bactéries vivantes série B : N2	130	139	101	52	0

TABLEAU XXVII : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES (DETERMINE DANS LA GELOSE AU DESOXYCHOLATE) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE.

Série A : témoin

Série B : la couche inférieure de gélose est additionnée de 5 ml de broyat

Ces résultats amènent deux remarques :

1 - En comparant les nombres N1 (série A) et N2 (série B), on constate que le nombre de colonies se développant sur les boîtes des séries B est toujours supérieur à celui des boîtes correspondantes des séries A.

2 - Les rapports  $\frac{N2}{N1}$  ( $\frac{\text{Nombre de bactéries vivantes de la série B}}{\text{Nombre de bactéries vivantes de la série A}}$ ) ont été établis pour les concentrations en fumée qui permettent une comparaison chiffrée entre les trois expériences (c5 et c10) :

Quantité de broyat incluse (x)	Concentration en fumée *	c5	c10
2 ml		1,05	1,11
3,5 ml		1,19	1,40
5 ml		1,34	1,55

TABLEAU XXVIII : VARIATIONS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMÉE DU RAP-  
 PORT  $\frac{N2}{N1}$  DÉTERMINÉ POUR DIFFÉRENTES QUANTITÉS DE BROYAT (x)  
 INCLUSES DANS LA COUCHE INFÉRIEURE

N1 : Nombre de bactéries vivantes déterminé dans la série A (témoin)

N2 : Nombre de bactéries déterminé dans la série B (la couche inférieure de gélose est additionnée de x ml de broyat).

Ainsi, pour une concentration en fumée déterminée, le rapport

$\frac{N2}{N1}$  croît avec la quantité de broyat incluse dans la couche inférieure. Le saumon mélangé à la gélose semble donc responsable des différences entre N1 et N2. Son action vis-à-vis de la fumée est proportionnelle à la quantité de broyat incluse.



Milieu minimum :

Concentration en fumée *	c0	c15	c30	c45	c60	c75
N. de bactéries vivantes série A	1500	25	0	0	0	0
N. de bactéries vivantes série B <sub>1</sub>	1500	1500	456	0	0	0
N. de bactéries vivantes série B <sub>2</sub>	1500	1500	1170	750	16	0

TABLEAU XXIX : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES (DETERMINE DANS LE MILIEU MSB 1 GELOSE) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE. (Cf. Fig. 15)

Série A : témoin

Série B<sub>1</sub>: la couche inférieure est additionnée de 3,5 ml de broyat

Série B<sub>2</sub>: la couche inférieure est additionnée de 5 ml de broyat

Ces résultats nous conduisent à formuler les mêmes remarques que celles précédemment rapportées après les manipulations effectuées sur milieu sélectif.

3.1.3. Commentaires

Les premières manipulations (III - 3.1.1.) nous ont permis de démontrer que des bactéries en suspension dans un broyat de saumon subissent plus modérément l'action directe de la fumée que des bactéries en suspension dans de l'eau salée.



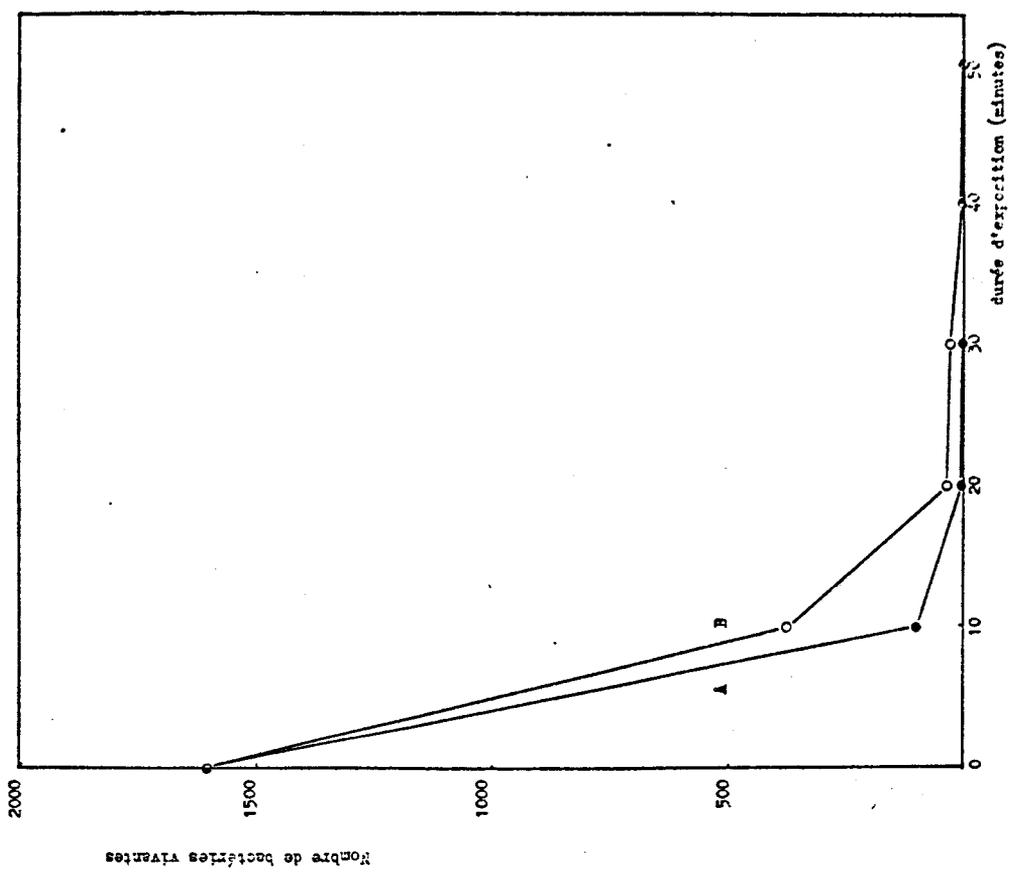


Figure 14 : Cinétique de survie de populations d'*Escherichia coli* soumises à l'action directe de la fumée  
 Série A : en suspension dans l'eau salée.  
 Série B : en suspension dans un broyat de saumon.

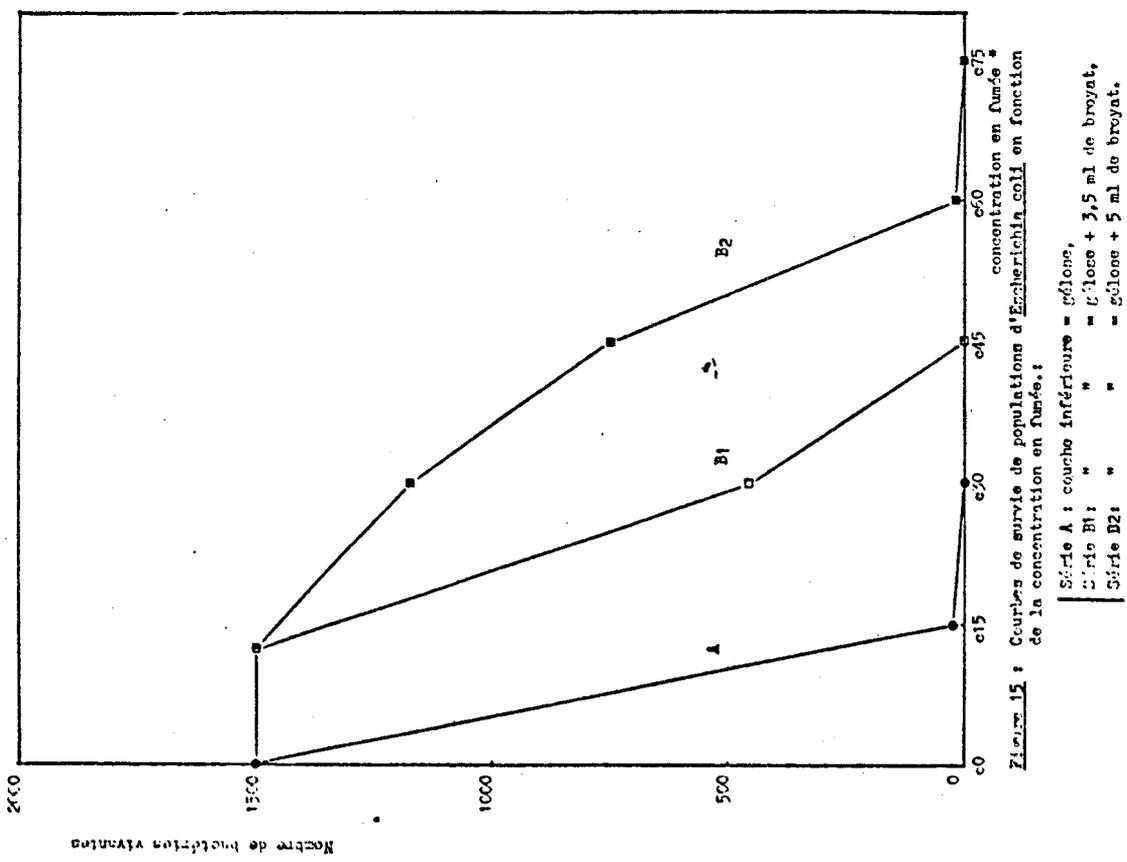


Figure 15 : Courbes de survie de populations d'*Escherichia coli* en fonction de la concentration en fumée.

Série A : couche inférieure = 60lène.  
 Série B1 : " " = 2'lène + 3,5 ml de broyat,  
 Série B2 : " " = 2'lène + 5 ml de broyat.

La technique employée dans les manipulations suivantes (III - 3.1.2.) nous permet d'avancer dans la compréhension du phénomène : puisque le nombre de bactéries se développant dans la série B est supérieur au nombre de bactéries de la série A, on peut penser qu'une partie des substances bactériostatiques se concentrant dans la couche inférieure de la série B n'est pas libérée et ne diffuse pas dans la couche contenant les bactéries. Ainsi la chair de saumon piègerait certaines substances actives de la fumée.

Il faut déterminer dans la composition du muscle du saumon les éléments susceptibles de réagir avec certains composants de la fumée. Nous testerons un certain nombre de composés constitutifs du muscle du poisson, mais aussi des composés issus de la dégradation bactérienne ou de l'autolyse. (Effectivement, les saumons destinés au fumage sont d'une qualité extrêmement variable et les espèces microbiennes présentes dans le muscle en plus ou moins grande quantité sont des éléments actifs de sa dégradation).

### 3.2. Influence de diverses substances pouvant être présentes dans le muscle

#### 3.2.1. Etude de l'influence de diverses substances sur l'action de la fumée

Dans cette série d'expériences, les bactéries (Escherichia coli) sont soumises à l'action indirecte de la fumée (II - 10) :

- dans la série A, les bactéries subissent l'action des éléments de la fumée concentrés dans la couche inférieure de gélose (gélose blanche),

- dans les autres séries (B et suivantes), l'action des substances empyreumatiques peut se trouver modifiée ou non par la substance incluse dans la couche inférieure (albumine, acide aminé, peptone, ammoniacque, créatine, putrescine, cadavérine, huile de saumon, glucose, chlorure de sodium).

### 3.2.1.1. Albumine :

Pour les différentes concentrations d'albumine de la couche inférieure de gélose, le pH présente une valeur de 6,6.

Concentration en albumine (mg/100 g)	Concentration en fumée *	c0	c5	c10	c15	c20
A : 0		792	401	42	7	0
B : 50		861	744	297	12	0
C : 150		872	786	553	134	0
D : 250		816	742	530	184	0
E : 500		870	792	612	259	61
F : 1 000		895	826	643	424	124

TABLEAU XXX : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

(Cf. Fig. 16) Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations d'albumine dans le milieu.



3.2.1.2. Acides aminés :

- Cette expérience réalisée avec 3 acides aminés différents est effectuée sans addition d'une solution tampon. Le pH de la couche inférieure de gélose présente les valeurs suivantes : A = 6 - B = 6 - C = 9,6 - D = 3,7.

Concentration en fumée * Concentration en acide aminé (mg/100 g)	∞	c10	c15	c20	c25	c30
A (témoin) : 0	1 440	23	0	0	0	0
B (alanine) : 50	1 512	446	113	1	0	0
C (lysine) : 50	1 463	772	196	55	2	0
D (acide glutamique) : 50	1 465	186	0	0	0	0

TABLEAU XXXI : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

(Cf. Fig. 17)

Les dénombrements ont été effectués pour différents acides aminés présents dans le milieu.

- La même expérience est effectuée en ajoutant une solution tampon (pH 6) dans la couche inférieure, les valeurs de pH obtenues sont alors comprises entre 5,9 et 6,1.

Concentration en fumée *		c0	c5	c10	c15	c20	c25	c30
Concentration en acide aminé (mg/100 g)								
A (témoin)	: 0	988	162	29	0	0	0	0
B (alanine)	: 50	980	404	124	70	0	0	0
C (lysine)	: 50	1004	654	162	93	42	9	0
D (acide glutamique)	: 50	948	686	72	26	0	0	0

TABLEAU XXXII : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

(Cf. Fig. 18)

Les dénombrements ont été effectués pour différents acides aminés présents dans le milieu tamponné.

- Une expérience analogue a été réalisée avec différentes concentrations d'alanine dans la gélose. La mesure du pH donne une valeur constante de 6,3 sans addition d'une solution tampon.

Concentration en fumée *		c0	c5	c10	c15	c20	c25
Concentration en alanine (mg/100 g)							
A :	0	302	247	69	27	0	0
B :	50	319	299	167	35	6	0
C :	150	303	306	174	41	12	0
D :	250	291	296	244	60	12	0

TABLEAU XXXIII : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

(Cf. Fig. 19)

Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations d'alanine dans le milieu.

- L'expérience précédente est répétée avec la lysine.

Après addition de la solution tampon (pH 6), les valeurs de pH obtenues dans la couche inférieure sont comprises entre 6 et 6,4.

Concentration en fumée *		c0	c5	c10	c15	c20	c25
Concentration en lysine (mg/100 g)							
A	: 0	590	483	281	18	0	0
B	: 50	582	561	342	111	0	0
C	: 100	602	580	531	120	0	0
D	: 150	595	585	540	149	12	0

TABLEAU XXXIV : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES)

(Cf. Fig. 20)

Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations de lysine dans le milieu tamponné.

3.2.1.3. Peptone :

Pour les différentes concentrations en peptone, le pH de la couche inférieure est de l'ordre de 6,6 (sans addition d'une solution tampon).

Concentration en fumée *		c0	c5	c10	c15	c20
Concentration en peptone (mg/100 g)						
A :	0	782	243	31	0	0
B :	50	770	355	100	18	0
C :	150	763	482	342	123	7
D :	250	770	603	437	138	0
E :	500	817	687	504	315	0
F :	1 000	820	771	611	396	266

TABLEAU XXXV : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

(Cf. Fig. 21)

Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations de peptone dans le milieu.

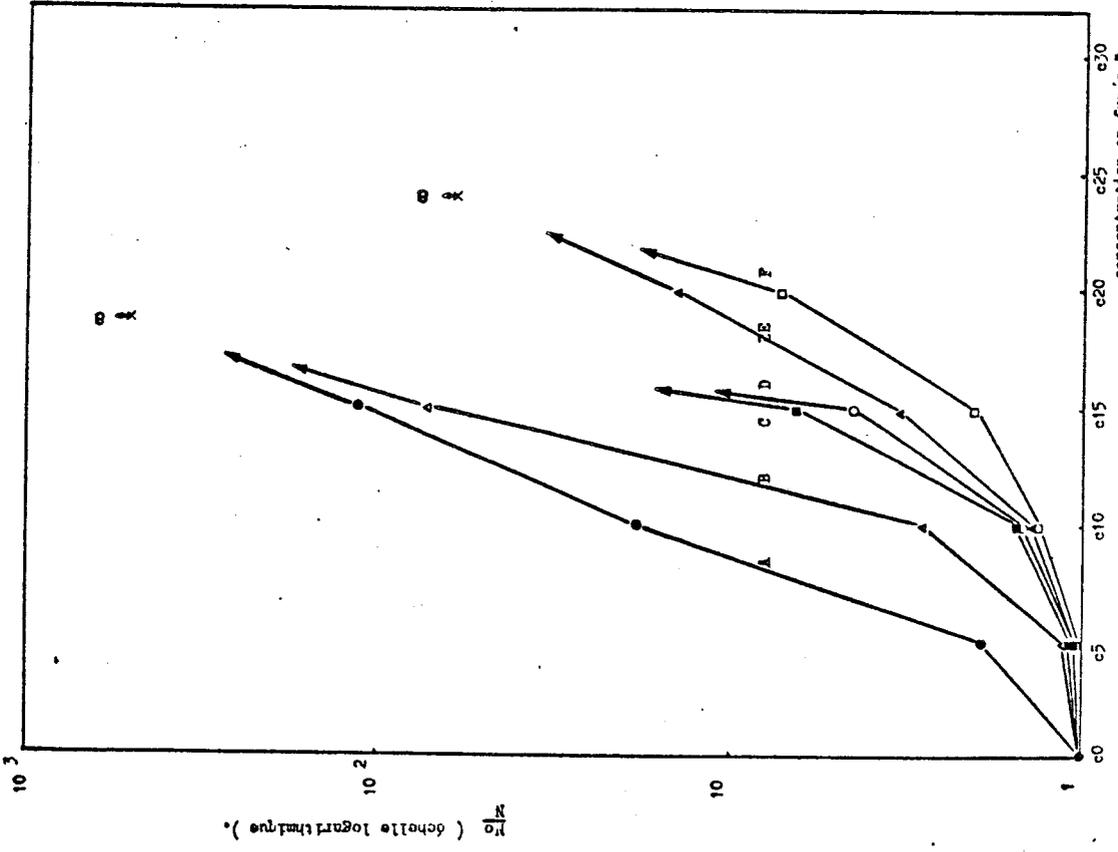


Figure 15 : Variations de la population de bactéries vivantes (*Bacterioides coli*) en fonction de la concentration en fume. \*  
 -No et nombre de bactéries vivantes initialement présentes.  
 -D : nombre de bactéries vivantes après une exposition de 48 heures dans le milieu.  
 -Les courbes ont été établies pour diverses concentrations d'albumine : A : C - B : 50 - C : 150 - D : 250 - E : 500 - F : 1000 mg/100 g.

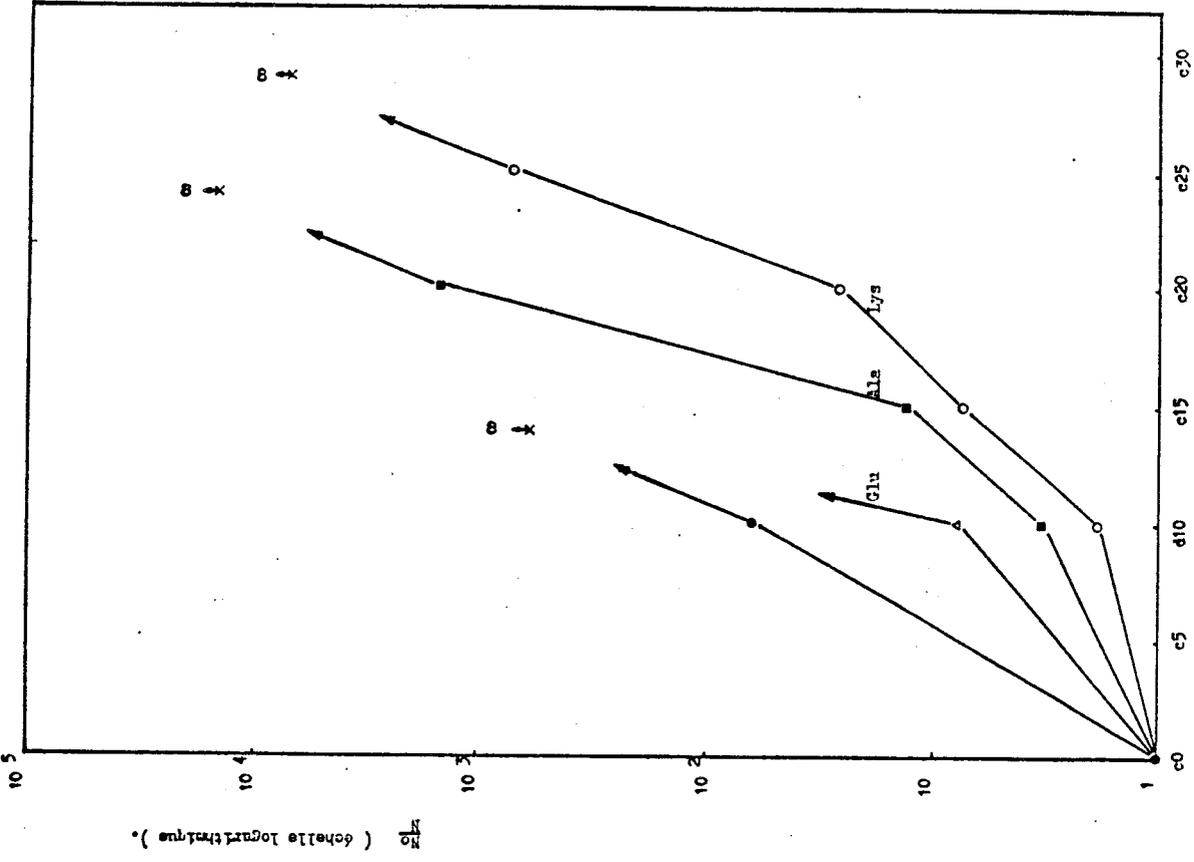


Figure 17 : Variations de la population de bactéries vivantes (*Bacterioides coli*) en fonction de la concentration en fume. \*  
 -Les courbes ont été établies pour différents acides aminés présents dans le milieu : A : Glu - B : Ala - C : Lys.  
 -C : 50 mg/100 g - D : 50 mg/100 g - E : 100 mg/100 g.

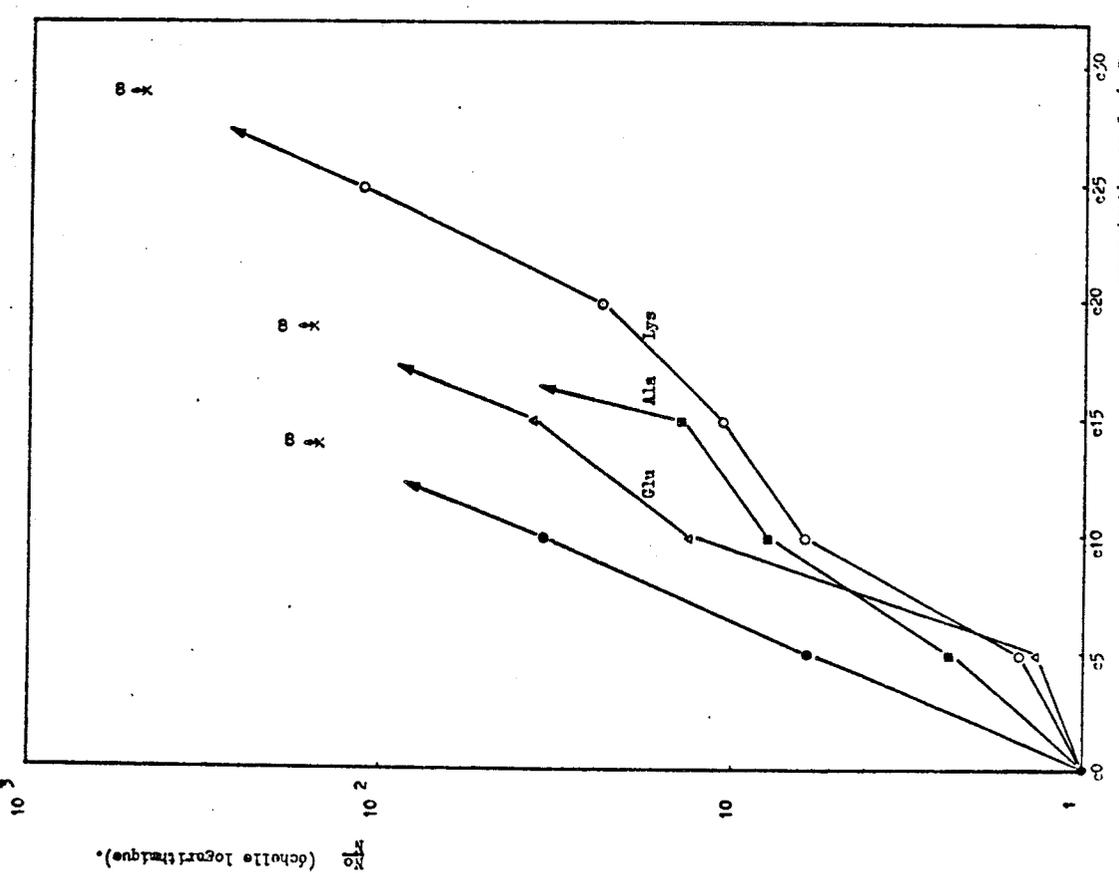


Figure 18 : Variations de la population de bactéries vivantes (*Escherichia coli*) en fonction de la concentration en fumée.  
 Les courbes ont été établies pour différents milieux minima après contact avec le milieu (contaminé d'une solution témoin pH 6) =  
 A : terrain - B : 50 mg alanine - C : 50 mg lysine - D : 50 mg acide glutamique / 100 g.

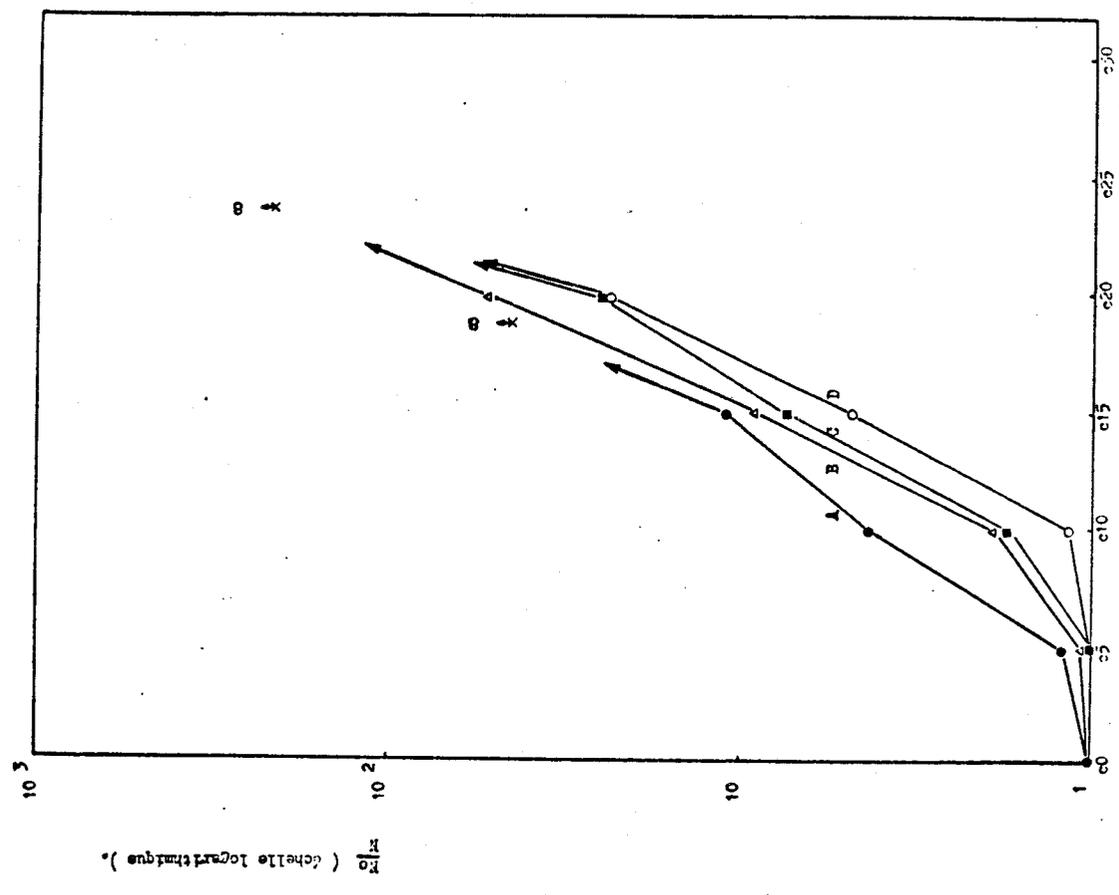
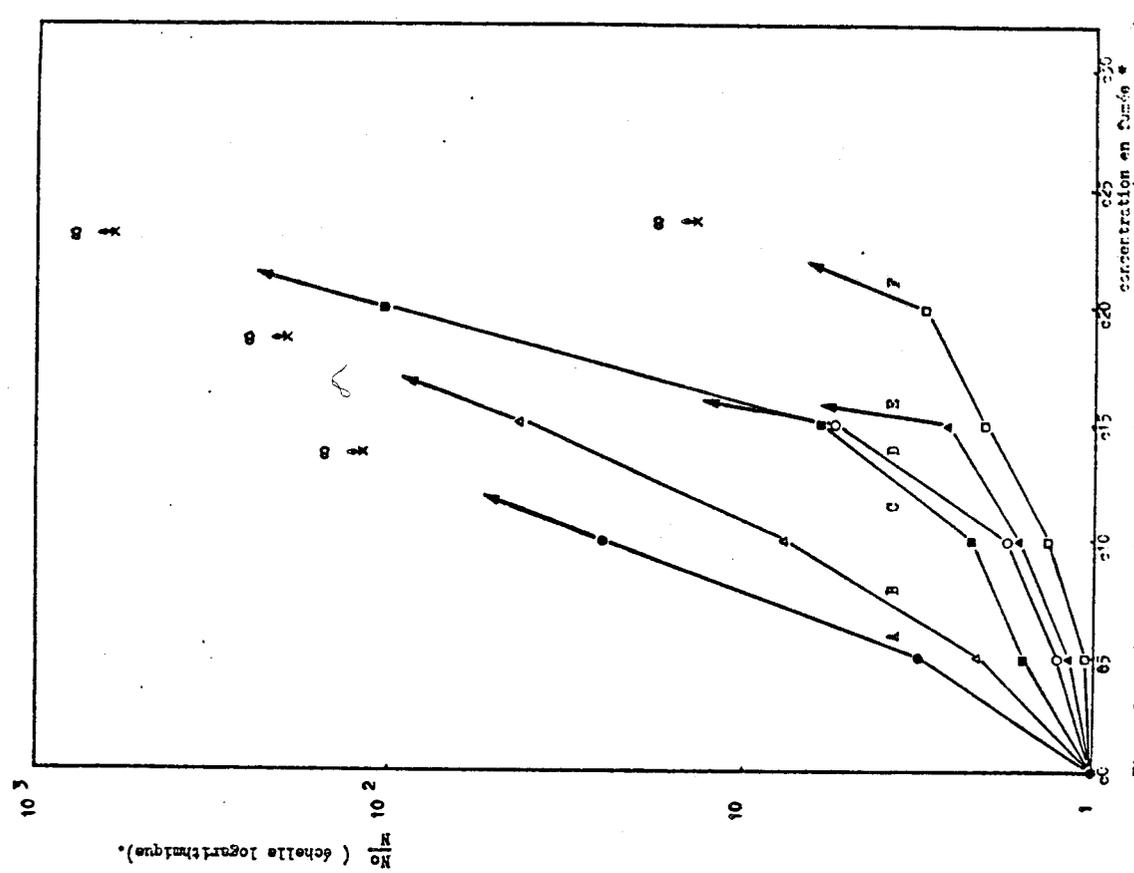
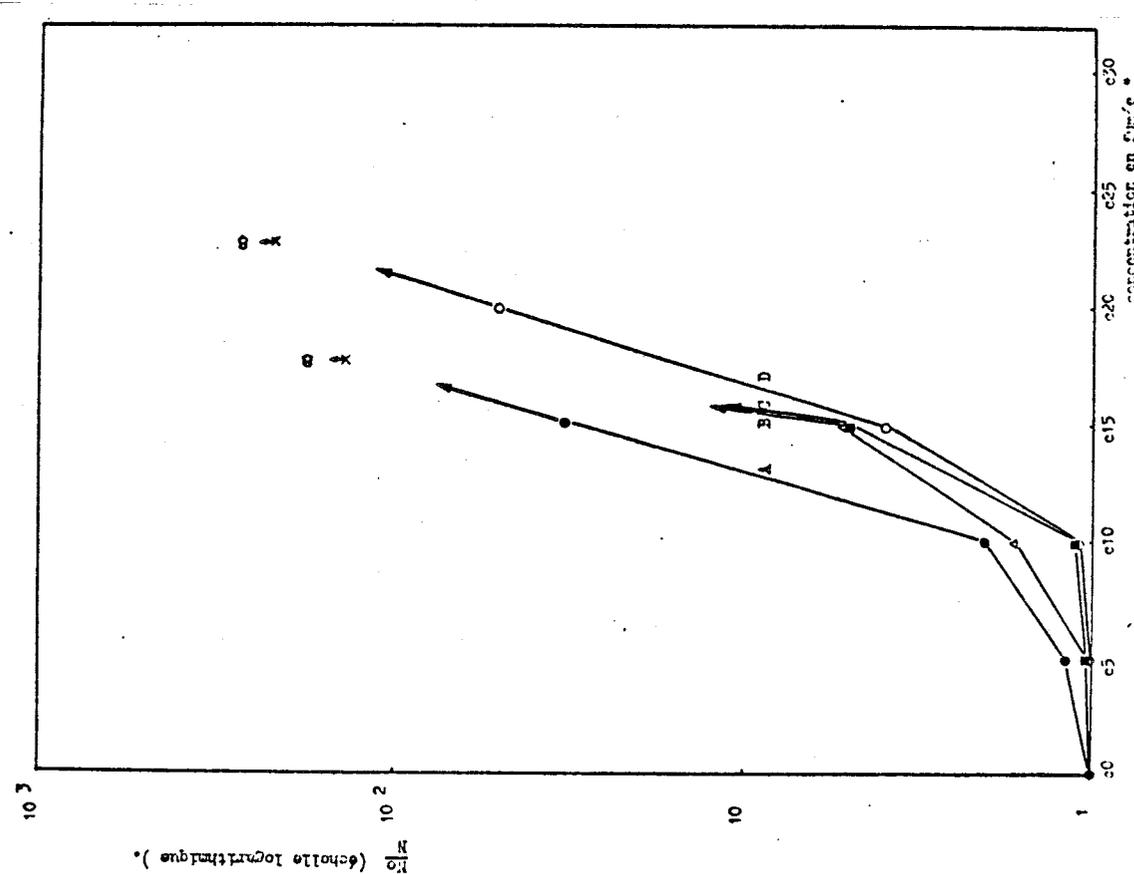


Figure 19 : Variations de la population de bactéries vivantes (*Escherichia coli*) en fonction de la concentration en fumée.  
 Les courbes ont été établies pour diverses concentrations d'alanine dans le milieu =  
 A : 0 - B : 50 - C : 150 - D : 250 mg/100 g.





3.2.1.4. Ammoniaque

Après addition du tampon, le pH de la couche inférieure présente une valeur de 6 pour chacune des concentrations en ammoniaque.

Concentration en fumée * (ml/100 g)	c0	c5	c10	c15	c20
A : 0	377	306	112	33	19
B : $10^{-3}$	355	299	88	6	0
C : $2 \cdot 10^{-3}$	304	300	233	36	18
D : $5 \cdot 10^{-3}$	361	344	258	182	29
E : $10^{-2}$	332	308	150	31	0
F : $2 \cdot 10^{-2}$	295	265	4	2	0

TABLEAU XXXVI : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).  
(Cf. Fig. 22) Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations d'ammoniaque dans le milieu tamponné.

3.2.1.5. Créatine :

Pour les différentes concentrations de la couche inférieure en créatine, on obtient un pH de 6 (sans addition d'une solution tampon).

Concentration en fumée *			c0	c5	c10	c15	c20
Concentration en créatine (mg/100 g)							
A	:	0	465	295	134	83	0
B	:	50	428	310	153	102	0
C	:	150	431	260	128	72	0
D	:	250	437	413	279	110	10
E	:	500	459	234	129	63	0
F	:	1 000	460	181	97	31	0

TABLEAU XXXVII : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

(Cf. Fig. 23)

Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations de créatine dans le milieu.



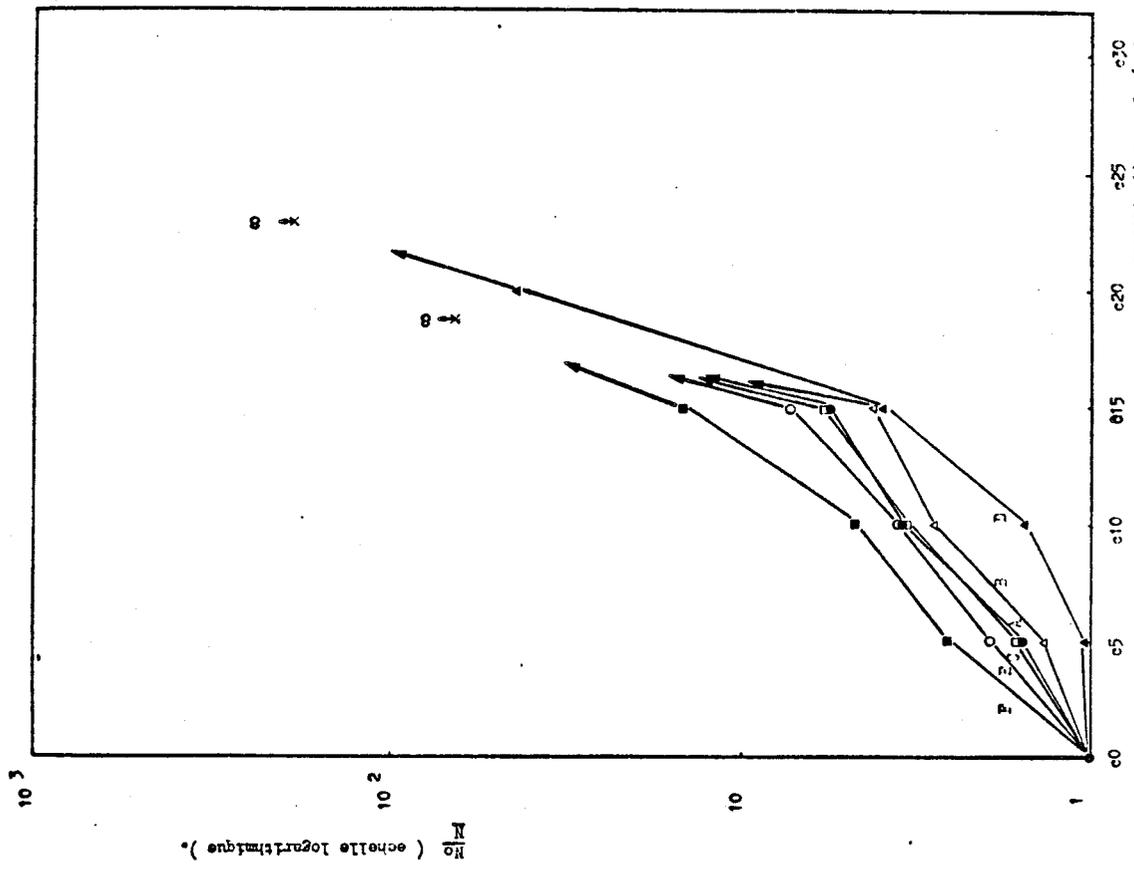


Figure 21 : Variations de la population de bactéries vivantes (*Escherichia coli*) en fonction de la concentration en fumée.  
 Les courbes ont été établies pour diverses concentrations de crûtes dans le milieu :  
 A : 0 - B : 50 - C : 150 - D : 250 - E : 500 - F : 1000 mg/100 g.

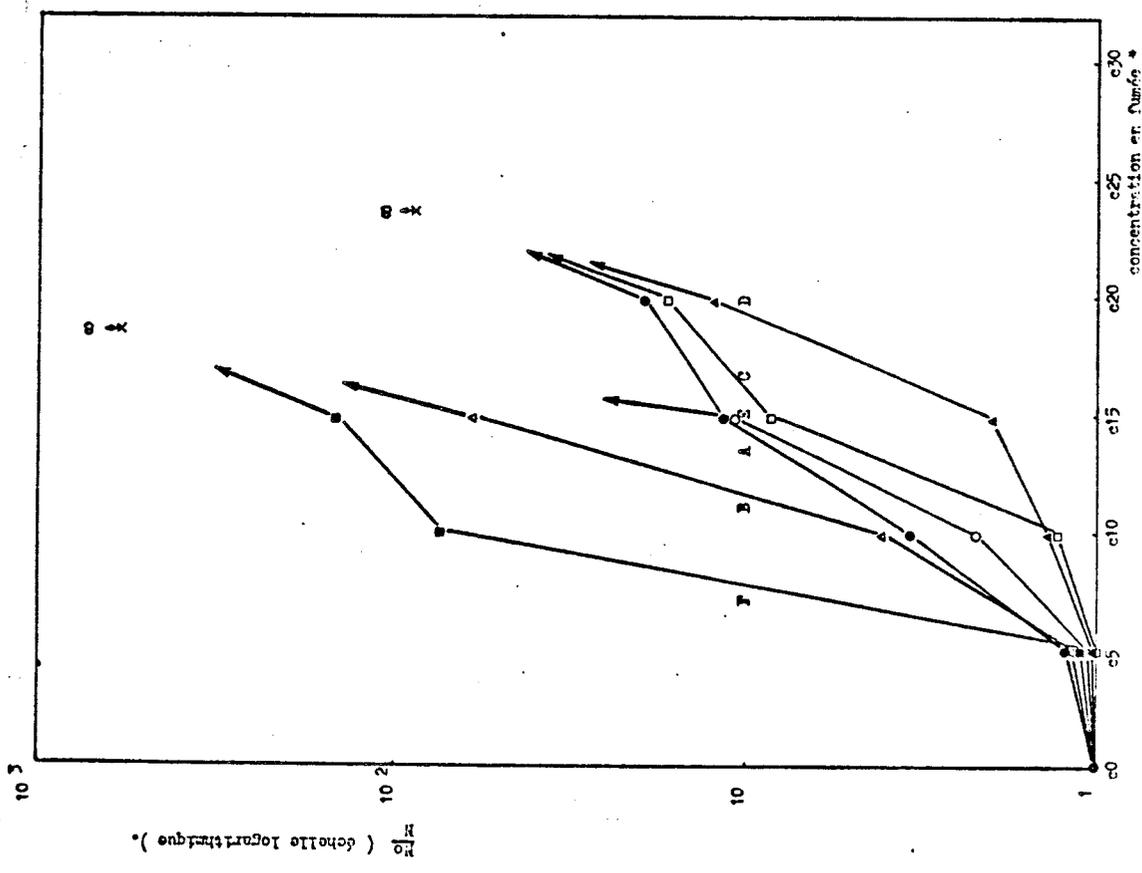


Figure 22 : Variations de la population de bactéries vivantes (*Escherichia coli*) en fonction de la concentration en fumée.  
 Les courbes ont été établies pour diverses concentrations de fumée dans le milieu :  
 A : 0 - B : 0,001 - C : 0,002 - D : 0,005 - E : 0,01 - F : 0,02 mg/100 g.



3.2.1.6. Putrescine :

Les mesures du pH dans la couche inférieure donnent après addition de la putrescine et de la solution tampon (pH 6) des valeurs comprises entre 6 et 6,3.

Concentration en fumée *		c0	c5	c10	c15	c20
Concentration en putrescine (mg/100 g)						
A	: 0	1 224	763	83	0	0
B	: 30	1 280	964	636	261	126
C	: 60	1 211	1 130	884	630	348
D	: 90	1 180	1 150	1 012	842	437
E	: 120	1 217	1 168	1 035	893	773
F	: 150	1 178	1 272	1 042	913	962

**TABLEAU XXXVIII** : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES)  
(Cf. Fig. 24)  
Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations de putrescine dans le milieu tamponné.



3.2.1.7. Cadavérine :

Les valeurs du pH obtenues après addition de la cadavérine et de la solution tampon dans la gélose sont comprises entre 6 et 6,2.

Concentration en fumée * Concentration en cadavérine (mg/100 g)	c0	c5	c10	c15	c20
A : 0	520	363	180	62	3
B : 30	521	495	392	122	58
C : 60	537	500	399	230	70
D : 90	556	512	441	271	72
E : 120	528	529	466	274	133
F : 150	533	533	474	288	276

TABLEAU XXXIX : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

(Cf. Fig. 25)

Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations de cadavérine dans le milieu tamponné.



10<sup>3</sup>  
10<sup>2</sup>  
10  
1

(échelle logarithmique).

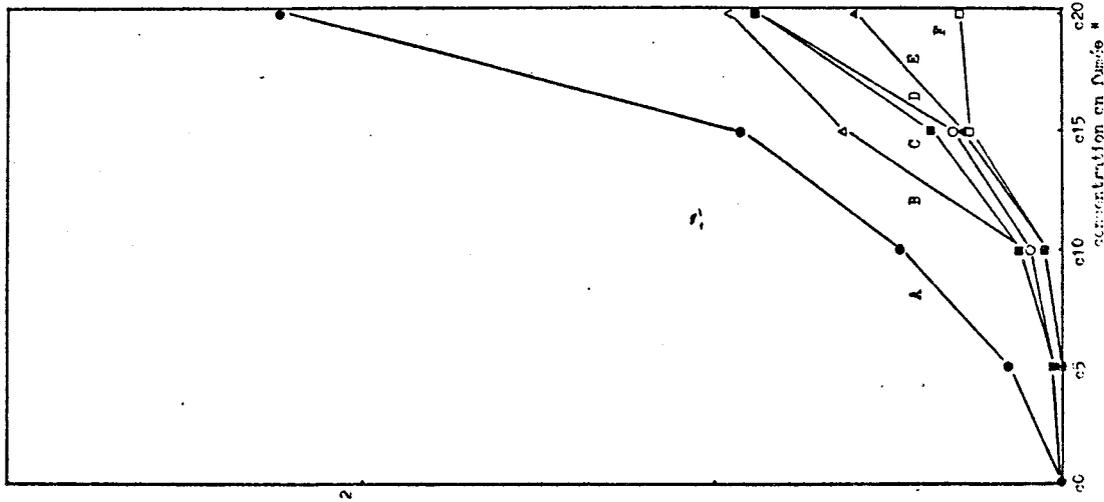


Figure 25 : Variations de la population de bactéries vivantes (*Escherichia coli*) en fonction de la concentration en fumée.  
 Les courbes ont été établies pour diverses concentrations de cadavre dans le milieu :  
 A : 0 - B : 30 - C : 60 - D : 90 - E : 120 - F : 150 mg/100 g.

10<sup>3</sup>  
10<sup>2</sup>  
10  
1

(échelle logarithmique).

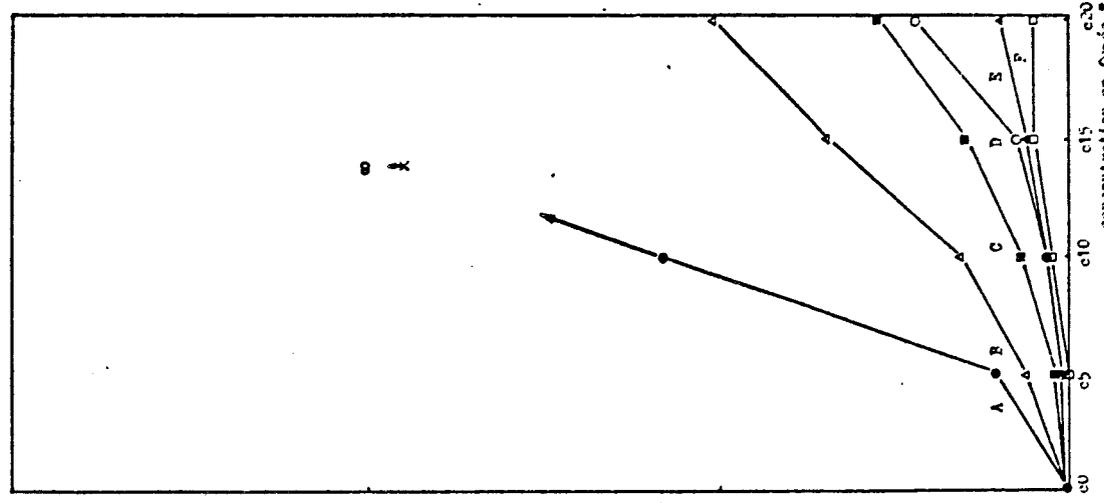


Figure 24 : Variations de la population de bactéries putrescentes (*Bacterioides coli*) en fonction de la concentration en fumée.  
 Les courbes ont été établies pour diverses concentrations de putrescence dans le milieu.  
 A : 0 - B : 30 - C : 60 - D : 90 - E : 120 - F : 150 mg/100 g.



3.2.1.8. Lipides :

Cette expérience, réalisée avec de l'huile de saumon, est importante en raison du taux élevé de lipides dans ce poisson.

Complément de technique :

Contrairement à toutes les substances testées jusqu'à présent, nous nous trouvons ici en présence d'une substance non miscible à la gélose. Pour pouvoir réaliser une émulsion, il est nécessaire d'ajouter de la lécithine. Il est donc indispensable, pour mettre en évidence la seule réactivité de l'huile vis-à-vis de la fumée, d'effectuer parallèlement une manipulation avec la lécithine :

A : couche inférieure : gélose blanche

B : couche inférieure : gélose blanche + lécithine (4 ml/100 ml gélose)

C : couche inférieure : gélose blanche + lécithine (4 ml/100 ml gélose)  
+ huile (2 ml/100 ml gélose)

Le pH obtenu dans la couche inférieure est de 6,3 quelque soit sa composition.

Composition de la couche inférieure	Concentration en fumée *				
	c0	c5	c10	c15	c20
A : gélose blanche	564	328	210	80	0
B : gélose + lécithine	582	320	206	72	0
C : gélose + lécithine + huile	555	341	182	68	0

TABLEAU XXXX : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

Les dénombrements ont été effectués pour différentes substances présentes dans le milieu : A = témoin, B = lécithine, C = lécithine + huile.

3.2.1.9. Glucose :

Le pH de la couche inférieure de gélose présente une valeur constante de 6,3 indépendante de la concentration en glucose.

Concentration en fumée *	∞	c5	c10	c15	c20
A : 0	113	85	32	0	0
B : 50	115	80	30	0	0
C : 500	101	79	39	0	0
D : 1 000	105	86	29	0	0

TABLEAU XXXXI : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations de glucose dans le milieu.



3.2.1.10. Chlorure de sodium :

Les variations de la concentration de la couche inférieure en NaCl n'affectent pas le pH qui reste égal à 6,3.

Concentration en NaCl (en g/100 g)	Concentration en fumée *	c0	c5	c10	c15	c20
A : 0		118	82	25	0	0
B : 2		104	61	14	0	0
C : 10		42	2	0	0	0

TABLEAU XXXXII : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).  
 Les dénombrements ont été effectués pour diverses concentrations de chlorure de sodium dans le milieu.



### 3.2.2. Etude comparative de diverses substances

Dans ces expériences, la technique utilisée est la même que dans les précédentes expériences (II - 10), mais 2 ou plusieurs substances sont testées au cours d'une même expérimentation dans le but de comparer leur influence relative sur l'action de la fumée.

#### 3.2.2.1. Glucose et glucosamine :

Après addition de la solution tampon, le pH de la couche inférieure présente une valeur de 6, indépendamment de sa composition.

Composi- tion de la couche inférieure	Concentration en fumée *	c0	c5	c10	c15	c20
A : gélose blanche	!	173	125	48	0	0
B : gélose + glucose (50 mg/100 g)	!	180	129	46	0	0
C : gélose + glucosamine (50 mg/100 g)	!	180	157	95	4	0

TABLEAU XXXXIII : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

(Cf. Fig. 26)

Les dénombrements ont été effectués pour différentes substances présentes dans le milieu tamponné : A = témoin, B = glucose, C = glucosamine.

3.2.2.2. Albumine, acides aminés, caséine, peptone et putrescine :

Ces différentes substances sont testées au cours d'une même expérimentation : on les inclut séparément dans la couche inférieure de gélose de différentes séries de boîtes de Petri à une concentration de 50 mg/100 g. L'addition de la solution tampon (pH 6) dans la couche inférieure permet d'obtenir pour toutes les substances un pH compris entre 6,2 et 6,3.

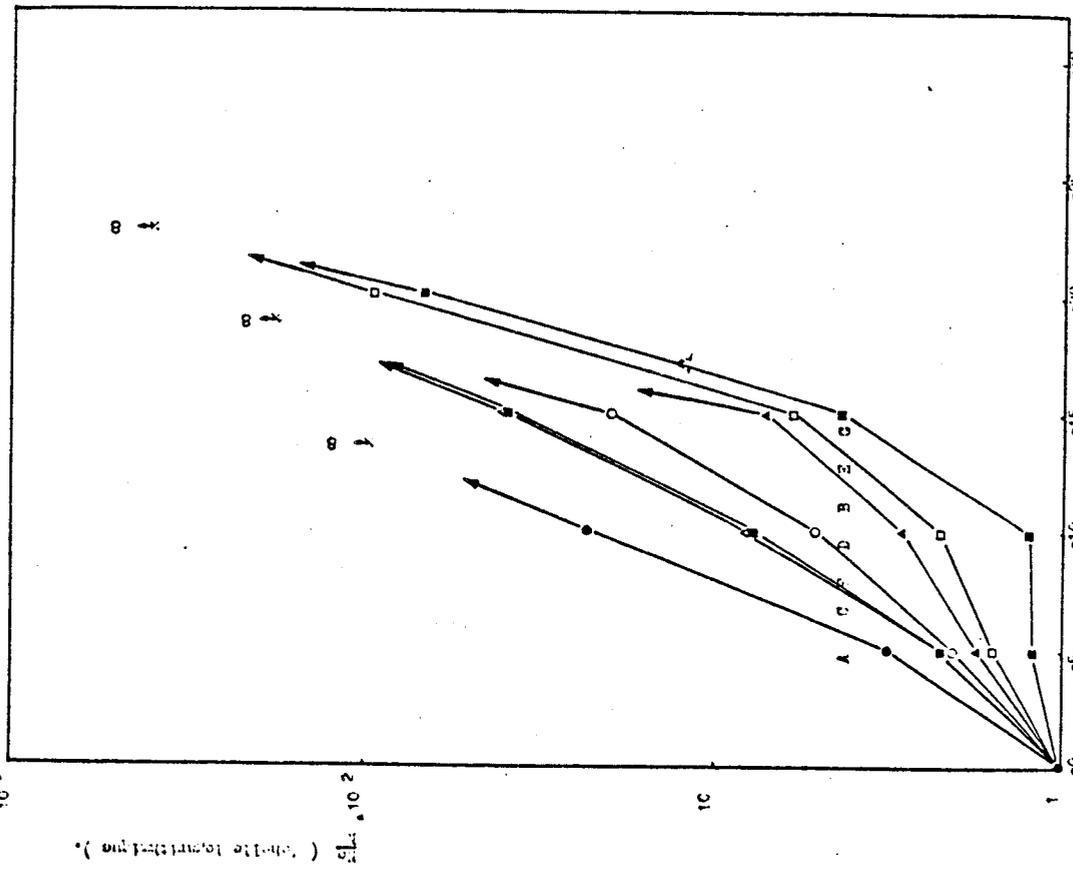
Composition de la couche inférieure	Concentration en fumée *				
	c0	c5	c10	c15	c20
A : gélose blanche	759	241	32	0	0
B : gélose + albumine	792	453	279	110	0
C : gélose + caséine	773	349	96	19	0
D : gélose + alanine	802	390	155	40	0
E : gélose + lysine	762	480	342	127	8
F : gélose + peptone	787	356	102	20	0
G : gélose + putrescine	760	618	527	178	11

TABLEAU XXXIV : VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FUMEE (APRES UN CONTACT DE 48 HEURES).

(Cf. Fig. 27)

Les dénombrements ont été effectués pour différentes substances présentes dans le milieu tamponné (à la concentration de 50 mg/100 g)

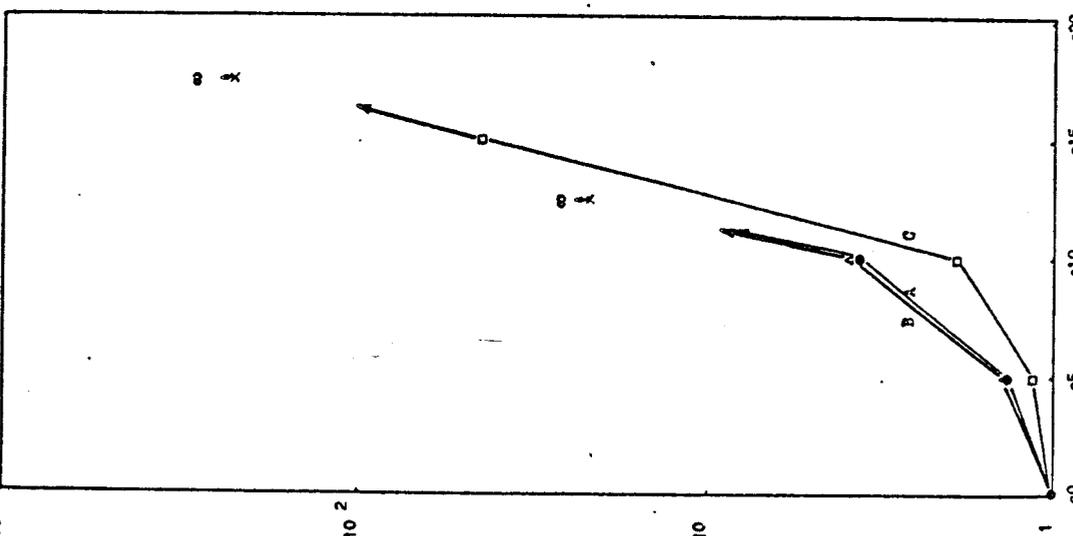
10<sup>3</sup>



(échelle logarithmique)

Figure 27 : Variations de la population de bactéries vivantes (*Bacteriobion cell*) en fonction de la concentration en fumée.  
 Les courbes ont été établies pour différentes substances présentes dans le milieu (à la concentration de 50 mg/100 G) :  
 A : Alanine - B : Alanine - C : Glucose - D : Alanine - E : Lysine - F : Lysine - G : Lysine.

10<sup>3</sup>



(échelle logarithmique)

Figure 26 : Variations de la population de bactéries vivantes (*Bacteriobion cell*) en fonction de la concentration en fumée.  
 Les courbes ont été établies pour différentes substances présentes dans le milieu :  
 A : 50 mg Glucose - B : 50 mg Glucose - C : 50 mg Glucose/100 G.



### 3.2.3. Commentaires

- Les expériences réalisées pour tester séparément l'influence de chacune des substances considérées sur l'action de la fumée (III - 3.2.1) nous conduisent à les regrouper en 3 classes :

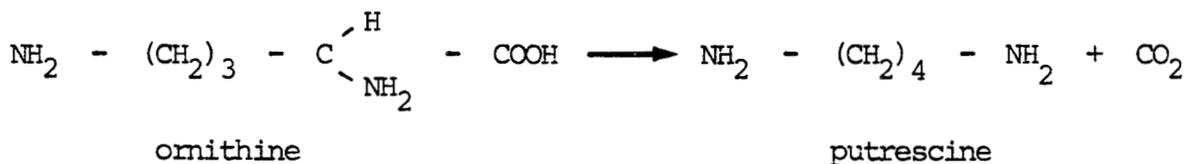
. Substances se comportant comme des inhibiteurs de l'action de la fumée :

Albumine : la teneur en albumine paraît normalement plus faible dans le muscle des poissons que dans ceux des mammifères (54).

Acides aminés : le taux des acides aminés libres dans le muscle de poisson varie suivant les individus et suivant la saison (54). Par ailleurs, le taux de chaque acide aminé augmente dès que la protéolyse s'amorce.

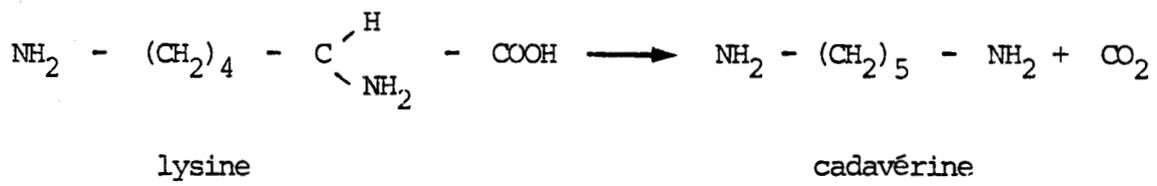
Peptone : ces composés, résultant de l'action d'enzymes protéolytiques sur des matières protéiques diverses, comprennent non seulement des acides aminés, mais aussi des chaînes peptidiques plus ou moins longues ainsi que des molécules diverses issues de cette hydrolyse enzymatique.

Putrescine : c'est un composé aminé que l'on trouve dans les produits issus de la dégradation des protéines. Elle résulte de la décarboxylation de l'omithine par de nombreuses bactéries :



La putrescine ne fait donc pas partie des composés constitutifs du muscle, elle apparaît comme la cadavérine lors de la dégradation de la matière vivante.

Cadavérine : elle provient de la décarboxylation de la lysine :



. Substances se comportant différemment en fonction de leur concentration (comme des inhibiteurs ou des activateurs de l'action de la fumée) :

Ammoniaque : c'est un constituant normal des muscles des poissons, mais son taux augmente rapidement après la mort sous l'effet de la dégradation bactérienne.

Créatine : la teneur en créatine chez le saumon serait de l'ordre de 500 à 600 mg pour 100 g (54).

. Substances sans effet sur l'action de la fumée :

Lipides : les lipides des poissons sont liquides à température ordinaire du fait de leur teneur élevée en acides gras très insaturés (ce qui a permis de prélever sans difficultés de l'huile de saumon).

Glucose : le taux de glucose est très variable dans les muscles des poissons. Le taux moyen de glycogène musculaire est de l'ordre de 1 g pour 100 g, mais la glycolyse est très active et dans les conditions usuelles de pêche qui impliquent une lutte prolongée et la mort par asphyxie, il est réduit presque à néant (54).

Chlorure de sodium : le poisson destiné au fumage est préalablement salé. La teneur en chlorure de sodium du saumon exposé à la fumée est de l'ordre de 2%.

- Nous remarquons que les substances se comportant comme des inhibiteurs de l'action de la fumée possèdent une ou plusieurs fonctions amines. La comparaison des influences relatives du glucose et de la glucosamine (III - 3.2.2.1.) met clairement en évidence le rôle de la fonction amine dans cette "inhibition" puisque le glucose n'a aucune influence sur l'action de la fumée alors que la glucosamine diminue son action.

- La comparaison de l'influence de différentes substances réduisant l'action bactériostatique de la fumée (III - 3.2.2.2.) a permis de les classer en fonction de leur influence inhibitrice (ordre décroissant) :

1 - putrescine

2 - lysine

3 - albumine

4 - alanine

5 - peptone

6 - caséine

IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

L'évolution de la flore bactérienne du saumon pendant le fumage a été étudiée dans le but de connaître l'efficacité du fumage à froid et de savoir si ce procédé tel qu'il est utilisé actuellement permet d'obtenir une stabilisation du produit traité. Il y a plus de 3 000 ans que la fumée est utilisée pour ses propriétés conservatrices, mais les denrées subissaient autrefois un fumage intense réalisant une véritable stérilisation, l'industrie alimentaire pratique désormais sur le saumon un fumage modéré dont le but essentiel est de conférer au produit des caractéristiques organoleptiques délicates. En l'état actuel des choses, le taux de fumage du saumon pose un problème théorique et pratique que nous nous sommes efforcés de résoudre.

La comparaison des dénombrements réalisés sur un même filet de saumon avant et après fumage (III - 1.1) met en évidence une action incontestable de la fumée sur la flore bactérienne aérobie, qu'il s'agisse de bactéries aérobies strictes (Pseudomonas, Micrococcus) ou d'aérobies-anaérobies facultatives (Enterobacteriaceae ; Staphylococcus ; Lactobacillaceae : Streptococcus, Lactobacillus), mais cette action est modérée puisque le taux moyen de réduction du nombre de bactéries est de l'ordre de 5.

Par contre, nous avons démontré que l'efficacité de la fumée est nettement plus grande lorsque les bactéries sont exposées à son action dans des boîtes de Petri, sans la protection du tissu musculaire (III - 2.1, III - 2.2). Il faut donc tenter d'expliquer cette disparité importante entre les résultats.

### Critique des techniques utilisées

Le premier élément d'explication qui est à considérer vient du fait que dans le procédé permettant l'action indirecte de la fumée, les bactéries sont en contact avec les substances empyreumatiques pendant toute l'incubation, alors que dans la technique utilisée pour dénombrer la flore bactérienne des filets de saumon après fumage (II - 6.1), les bactéries sont en contact pendant l'incubation avec des substances très diluées puisqu'on effectue auparavant un broyat dans de l'eau peptonée puis des dilutions. Nous avons démontré que la fumée a une action bactériostatique (III - 2.3), c'est-à-dire que les enzymes ne sont pas totalement détruits et que d'autre part, si la multiplication des microorganismes est inhibée, ceux-ci ne sont pas tous tués. Par le fumage, la denrée se trouve stabilisée, mais dans les dénombrements effectués sur le saumon après fumage, il y a dilution de l'agent bactériostatique et un certain nombre de bactéries incapables de se multiplier dans le produit pourraient donc à nouveau proliférer.

Toutefois, ceci ne peut concerner qu'un faible pourcentage de microorganismes ; effectivement, dans les expériences d'exposition à l'action directe de la fumée, les bactéries ne sont pas en contact avec la fumée pendant l'incubation et la technique employée entraîne une dilution des substances empyreumatiques pouvant imprégner les bactéries : or, dans ces conditions, l'action de la fumée est pourtant remarquablement efficace. Par conséquent, on ne peut en aucun cas expliquer par les différences de techniques utilisées la discordance observée entre l'action de la fumée sur des bactéries exposées dans un filet de saumon et son action sur des bactéries exposées dans une boîte de Petri.

Influence du tissu musculaire sur l'action bactériostatique de la fumée

Nous proposons l'hypothèse que le tissu musculaire du saumon protège de l'action de la fumée les microorganismes qu'il contient.

D'après nos résultats expérimentaux (III - 3.1.1), il nous est permis d'affirmer que les bactéries en suspension dans un broyat de saumon subissent plus modérément l'action directe de la fumée que celles en suspension dans de l'eau salée. Ceci confirme donc l'hypothèse que le muscle de saumon protège ses bactéries.

Par ailleurs, les résultats des manipulations où des bactéries sont soumises à l'action indirecte de la fumée (III - 3.1.2) démontrent que le nombre de bactéries capables de se multiplier est plus élevé lorsque la couche inférieure de gélose (exposée à la fumée) est additionnée d'un broyat de saumon : il est évident que dans ce cas, certaines substances actives de la fumée ne diffusent pas de la couche inférieure contenant le broyat dans la couche supérieure contenant les bactéries. Dans les conditions de cette expérience le broyat de saumon ne pouvant opposer de barrière physique à l'action de la fumée, on peut donc envisager des interactions chimiques entre les composants de la fumée et le broyat. Notre but est désormais de déterminer les réactions qui, s'effectuant entre certaines substances empyreumatiques et le substrat (tissu musculaire du saumon), inhibent partiellement l'action de la fumée.

Constituants du tissu musculaire pouvant intervenir dans les interactions :  
fumée - saumon

Pour étudier leur réactivité vis-à-vis de la fumée, un certain nombre de constituants du tissu musculaire ont été testés : protéines, peptides, acides aminés, créatine, ammoniacque, huile de saumon, glucose. Puisque le fumage n'est pas pratiqué immédiatement après la pêche et que la matière biologique après la mort de l'animal se dégrade progressivement sous l'action conjuguée des enzymes et des bactéries, nous avons testé également des produits de dégradation : putrescine, cadavérine. Par ailleurs, comme un salage précède toujours le fumage, nous avons envisagé aussi une réactivité éventuelle du chlorure de sodium avec la fumée.

Les résultats obtenus nous ont permis de regrouper ces substances (III - 3.2.3) en fonction de leur influence sur l'action de la fumée, mises à part l'ammoniacque et la créatine dont le rôle n'a pu être déterminé clairement : les lipides, le glucose et le chlorure de sodium sont sans effet sur l'action bactériostatique de la fumée, par contre l'albumine, la caséine, les acides aminés, la peptone, la putrescine, la cadavérine et la glucosamine inhibent son action. Puisque ces dernières substances possèdent toutes une ou plusieurs fonctions amines et que la fonction amine différencie les molécules de glucose et de glucosamine, on peut suggérer l'existence d'une corrélation entre la présence de fonctions amines libres et la réduction de l'activité bactériostatique de la fumée et on peut supposer que les fonctions amines libres sont capables de réagir avec des substances empyreumatiques douées d'une activité bactériostatique et de les rendre ainsi inactives.

### Dépôt et pénétration de la fumée

La composition de la fumée a été exposée en début d'ouvrage (I - 2).

La quantité de fumée déposée sur le saumon est une fonction complexe de la composition et de la concentration de celle-ci, des conditions environnantes et de la nature de la surface (9). Les expériences réalisées par FOSTER et Coll. (19) démontrent que le "dépôt" de la fumée sur le poisson est le résultat d'une absorption de vapeur : dans ce phénomène, l'eau de surface et l'eau interstitielle du poisson agissent comme principal absorbant. Lorsqu'à la suite d'une absorption par les surfaces humides, la phase gazeuse de la fumée (phase dispersante constituée par les vapeurs) est réduite, la phase "particule" (phase dispersée) lui abandonne une partie de ses composants (20) : le taux d'absorption des constituants volatils de la fumée par les surfaces humides est donc en rapport avec la concentration massique des particules de la fumée (c'est-à-dire avec la densité optique de la fumée que l'on peut mesurer expérimentalement). La cinétique de l'absorption de la fumée par les filets de poissons a été étudiée par CHAN et Coll. (6) : la vitesse d'absorption, très grande au début, décroît graduellement ; ce phénomène serait dû à la dessiccation du poisson (14), le dépôt des constituants de la fumée étant ralenti sur les surfaces sèches.

On sait depuis longtemps qu'une partie importante des composants de la fumée déposés sur le poisson se concentre dans la couche superficielle. Des travaux russes relatés par YUDISTKAYA (69) aboutissent à la distinction de 2 catégories de substances : les premières, ayant une tendance à la polymérisation, se déposent à la surface du poisson pour y former une membrane artificielle de 10 à 20 microns d'épaisseur et elles brunissent

la partie la plus externe ; les secondes pénètrent dans le tissu musculaire, mais la concentration la plus élevée est décelée dans la zone externe à une profondeur de 300 à 350 microns du bord interne de la peau. Bien que ces études aient été effectuées sur des poissons fumés entiers, il reste toutefois acquis, si nous transposons ces observations au cas des filets de saumon, que, malgré leur diffusion, la concentration en substances empyreumatiques est moindre en profondeur.

#### Composants de la fumée doués d'une action sur les bactéries

Le rôle de la fumée dans la conservation s'exerce par voie physique et chimique.

Le dépôt d'une mince pellicule de composés polymérisés sur le poisson forme une barrière s'opposant à la pénétration des germes (11). L'action tannante de l'aldéhyde formique s'opposant à la dégradation habituelle des protéines bloque la croissance des microorganismes de décomposition pour qui les produits de dégradation sont essentiels.

Mais c'est surtout par l'action antiseptique et antioxydante de ses composants que la fumée a un rôle conservateur. Des recherches effectuées en 1929 (23) étaient déjà orientées sur les propriétés bactéricides de la fumée. Les propriétés antioxydantes ont fait l'objet de travaux ultérieurs (2, 19) : les lipides des poissons contiennent une proportion importante d'acides gras très insaturés et possèdent toujours des acides gras libres : ces caractéristiques les rendent très oxydables ; la fumée de bois a la propriété de retarder le rancissement, extraordinairement rapide dans les huiles de poissons. Quant aux propriétés bactéricides, nous avons évoqué précédemment (I - 3) une controverse au sujet des substances

responsables de l'action antiseptique et il importe d'approfondir cette observation : les opinions concernant les effets antibactériens des constituants de la fumée divergent considérablement parce que des différences dans les conditions d'expériences rendent impossible de vraies comparaisons.

SHEWAN (51) constate en 1949 que le poisson fumé contient beaucoup de composés chimiques possédant des propriétés bactéricides ou bactériostatiques et que la teneur de la fumée en acides, en abaissant le pH de la chair de poisson, rend les microorganismes plus sensibles à l'action bactéricide et bactériostatique de la fumée elle-même. Les mesures que nous avons effectuées sur des filets de saumon nous ont effectivement permis de constater à la suite du fumage un abaissement du pH de 6,1 à 5,8.

SHEWAN démontre aussi que le fumage à froid du poisson entraîne une destruction importante de sa charge bactérienne, et des recherches ultérieures (52) l'amènent à penser que sur le plan microbiologique les constituants de la fumée les plus actifs sont les composés phénoliques et non le formaldéhyde comme on le pensait auparavant. En 1967, NIELSEN et PEDERSEN (43) étudiant l'effet inhibiteur des constituants de la fumée sur Clostridium botulinum (types B et E) dans du saumon fumé à froid l'attribuent au formaldéhyde et non aux phénols ; des travaux publiés la même année par TILGNER (61) accordent par contre l'activité bactéricide principale à des dérivés méthylés d'hydroxyphénols. En 1969, ZAITSEV et Coll. (70) mettent un terme à cette polémique en affirmant que l'effet bactéricide de la fumée dépend non seulement du formaldéhyde, mais aussi du phénol, des acides organiques et d'autres composés. L'influence des différents composants n'a pas été suffisamment démontrée pour qu'une teneur déterminée en l'un deux, en formol ou en phénol par exemple, soit retenue comme critère de qualité : il n'a pas été

possible d'établir un parallèle entre un quelconque composant de la fumée et la qualité microbiologique (55). La détermination de la teneur en phénols du saumon donne toutefois des indications d'ordre quantitatif sur le fumage, indépendamment de la qualité bactériologique qui en résulte.

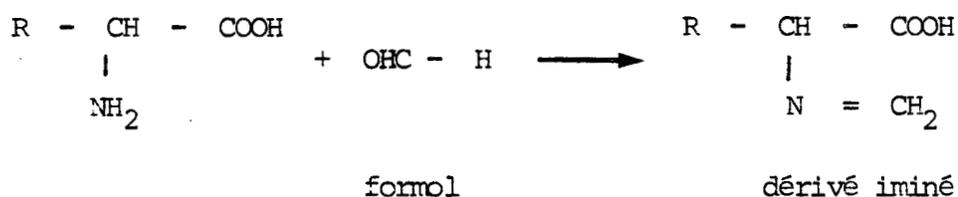
En 1974, KERSKEN (28) étudie l'influence de la fumée sur les moisissures, les conclusions de ses recherches rejoignent les précédentes concernant les bactéries : l'action fongistatique de la fumée provient essentiellement du formaldéhyde, qu'il considère comme le plus efficace, et du phénol. Il met en évidence à la surface de la denrée fumée une diminution rapide de l'effet fongistatique due à la volatilité des substances actives et à leur diffusion dans les couches profondes, et il suppose qu'une partie des substances actives de la fumée peut réagir avec les protéines du produit. Si nous transposons les résultats de ces recherches qui concernent le développement des moisissures pour étudier le développement des bactéries dans le produit fumé, le dernier élément d'explication, à savoir d'éventuelles réactions "protéines - substances actives", peut être retenu pour expliquer les limites de l'action bactériostatique de la fumée dans un produit et rejoint l'hypothèse que nous avons formulée précédemment.

Nous pouvons désormais mieux comprendre les réactions qui s'effectuent entre certains constituants du saumon et certaines substances actives de la fumée puisque nous avons déterminé les constituants du tissu musculaire susceptibles de réagir et que les travaux évoqués ci-dessus nous indiquent quels sont parmi les composants de la fumée les plus actifs sur le plan bactériostatique.

### Réactions s'effectuant dans le saumon fumé

On a longtemps considéré que l'aldéhyde formique était l'élément essentiel assurant la conservation des produits fumés, et son rôle reste indéniable même s'il a été démontré que les substances actives de la fumée sont nombreuses et qu'il ne faut pas négliger l'importance du phénol et de ses dérivés. Les actions antiseptiques du formol et du phénol ont été étudiées par RAHN (47, 48) : à une concentration de 0,7 % les deux substances tuent Escherichia coli en 100 minutes environ. JORDAN et JACOBS (27) reprenant la formule de WATSON (III - 2.2.3) ont déterminé l'exposant n (caractéristique du bactéricide) : 1 pour le formol et 6 pour le phénol.

Il est permis de penser que dans nos expériences l'aldéhyde formique de la fumée réagit avec des fonctions amines appartenant à diverses substances : protéines, peptides, acides aminés et amines provenant de leur dégradation. La réaction de condensation "aldéhyde - acide aminé" est une réaction bien connue :



Une réaction équivalente pourrait s'effectuer entre l'aldéhyde formique et les fonctions amines libres des protéines, des peptides et de divers composés aminés :



Ainsi, la réduction de l'action bactériostatique de la fumée dans le tissu musculaire du saumon peut être due à des réactions de condensation entre les fonctions amines libres de divers constituants du poisson et la fonction aldéhyde du formol, celui-ci perdant alors ses propriétés.

Influence de l'altération du poisson sur l'action bactériostatique de la fumée

Dans nos travaux, nous avons pu classer quelques substances inhibant l'action bactériostatique de la fumée par ordre d'influence décroissante : la putrescine, la lysine, l'albumine, l'alanine, la peptone et la caséine (III - 3.2.3). Comme la dégradation des protéines suit ce processus : protéines  $\longrightarrow$  peptides  $\longrightarrow$  acides aminés  $\longrightarrow$  amines de dégradation, nous constatons, en considérant les substances que nous avons étudiées, que la protéolyse entraîne le remplacement des molécules existantes par des molécules douées d'une plus grande influence inhibitrice sur l'action de la fumée :

caséine  $\longrightarrow$  peptone  $\longrightarrow$  acide aminé  $\longrightarrow$  putrescine.

Il y a une trentaine d'années qu'on a reconnu expérimentalement à l'albumine sérique la propriété de détoxifier les milieux de culture (15). La comparaison de l'influence d'autres substances possédant des fonctions amines nous a amenés à établir une corrélation entre l'augmentation du nombre de fonctions amines libres, résultant de la dégradation des chaînes protéiques, et la diminution de l'activité bactériostatique de la fumée. Ceci signifie que la fumée sera d'autant moins efficace sur les bactéries que le saumon sera plus altéré.

Il s'ensuit que dans un poisson présentant une contamination bactérienne importante la dégradation sera plus avancée et que l'action bactériostatique de la fumée en sera d'autant plus réduite. A l'inverse la fumée se montrera plus efficace si le contenu bactérien est minime. Il est donc vain d'espérer améliorer par le fumage une denrée altérée, mais l'action de la fumée sur les bactéries n'est pas négligeable dans un produit de qualité contenant une flore bactérienne réduite.

### Bilan de la qualité bactériologique du saumon fumé

L'énorme différence d'efficacité qui a été constatée entre l'action bactériostatique de la fumée qui s'exerce sur des bactéries isolées et celle qui s'exerce sur les bactéries dans le saumon peut donc s'expliquer ainsi : le poisson protège ses bactéries de l'action de la fumée et les constituants en cause semblent être essentiellement les protéines, les peptides, les amino-acides et divers composés aminés.

Il apparaît par ailleurs que, compte-tenu du fumage modéré qui est pratiqué sur le saumon et compte-tenu de la diminution de concentration des substances actives de la fumée à la suite de réactions avec le substrat, les substances bactériostatiques peuvent n'être présentes qu'en très faibles quantités dans le tissu musculaire. Or, par l'étude des moyens de désinfection, on sait que de faibles doses d'un agent bactéricide ou bactériostatique peuvent stimuler la croissance bactérienne (35). Il serait injustifié d'accorder trop d'importance à cette observation, elle contribue toutefois à soutenir nos propres suggestions : le produit destiné au fumage doit être de qualité sinon l'action bactériostatique de la fumée y est inopérante et nous pouvons donc ajouter que dans certains cas un effet opposé pourrait même se manifester.

Il importe de replacer l'action de la fumée dans le contexte général du traitement du poisson : avant d'être fumés, les filets de saumon sont salés et séchés (ANNEXE 2). Le sel provoque une exosmose en captant une partie de l'eau de constitution de la chair musculaire, et une certaine quantité pénètre à l'intérieur des tissus. Cette déshydratation diminue la disponibilité de l'eau pour la croissance des germes, le sel sélectionne

donc les flores en fonction de l'activité de l'eau ( $a_w$ ). Ainsi le salage inhibe la multiplication des germes pathogènes et toxigènes, et de la majeure partie des bactéries intervenant dans l'altération, et elle favorise celle des halophiles (32). Les travaux de LISTON et Coll. (37) puis ceux de WECKEL et Coll. (67) ont permis de déterminer la contribution du sel à la qualité du poisson fumé : il raffermi la chair, empêche la décoloration et donne du goût, mais il n'inhibe pas la croissance bactérienne et n'empêche pas l'altération aux concentrations choisies pour satisfaire les consommateurs. Un rapport de la FAO sur le fumage du poisson (1970) établissait que la concentration de 2 à 3 % de sel retenue pour la plupart des produits modernes n'a qu'un effet minime sur les bactéries. Des travaux anciens (16) avaient déjà pu montrer que tant que la concentration en NaCl demeure voisine de 2 à 5 %, l'eau reste liée aux constituants protéiques.

Le saumon salé subit un "séchage", ce traitement est l'un des plus anciens procédés de préservation des aliments (7) : du fait de la faible activité de l'eau qui en résulte, les microorganismes ne peuvent pas proliférer, et la plupart des réactions chimiques et enzymatiques de dégradation sont ralenties.

Des recherches effectuées en 1973 (55) ont amené leurs auteurs à admettre que si les effets du sel, de la fumée et d'autres facteurs sur la conservation du saumon fumé à froid sont à l'heure actuelle assez mal connus, la combinaison du salage, du séchage et du fumage se révèle généralement efficace en retardant l'altération. Les produits fumés ne sont stables que s'ils sont suffisamment déshydratés, ou si la quantité de sel est suffisante pour abaisser l'activité de l'eau à un niveau qui ne permette pas d'activité microbologique (6).

Des travaux effectués sur le saumon fumé (34) et sur le mulet fumé (29) ont conduit à une conclusion commune : le plus grand soin doit être apporté au traitement du produit ainsi qu'à son stockage, surtout s'il est peu salé et peu fumé. La présentation du saumon fumé en bandes prétranchées reconstituées nécessite de nombreuses manipulations, chaque tranche est manipulée plus de 10 fois avant d'être commercialisée, cette pratique devrait faire l'objet d'une hygiène extrêmement rigoureuse. Par ailleurs, il ne faut pas négliger les sources de contaminations importantes que représentent les étapes de décongélation et de tranchage (10).

Le fumage entraîne une réduction sensible de la flore bactérienne si le saumon est peu contaminé. En pratique, l'action bactériostatique de la fumée dans le poisson est limitée, mais elle est d'autant moins négligeable qu'elle se combine aux effets du salage et du séchage. La stabilisation réalisée ne permettra une conservation prolongée que si la qualité de la matière première est irréprochable et si le traitement est effectué dans les conditions d'hygiène les plus strictes ; il s'avère indispensable de trouver un procédé de sélection rapide des poissons destinés au fumage pour que le saumon fumé, qui est un produit de luxe, soit un produit de haute qualité.

B I B L I O G R A P H I E

- (1) BAIRD-PARKER A.C.  
An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci.  
J. Appl. Bact., 1962, 25, 12-19.
- (2) BANKS A.  
The development of rancidity in cold-storage herrings : the influence of some antioxidants.  
J. Sci. Fd Agr., 1952, 3, 250.
- (3) BRATZLER C.J., SPOONER M.E., WEATHERSPOON J.B. and MAXEY J.A.  
Smoke flavor as related to phenol, carbonyl and acid content of Bologna.  
J. Fd Sci., 1969, 34, 146.
- (4) BROWN V.I. et LOWBURY E.J.L.  
Methods for Pseudomonas aeruginosa. Use of an improved cetrinide agar medium and other culture.  
J. Clin. Path., 1965, 18, 752-756.
- (5) BUTTIAUX R., BEERENS H. et TACQUET A.  
Manuel de techniques bactériologiques.  
Flammarion (ed.), 1974, 4e ed., Paris.
- (6) CHAN W.S., TOLEDO R.T. et DENG J.  
Effect of smokehouse temperature, humidity and air flow on smoke penetration into fish muscle.  
J. Fd Sci., 1975, 40, (2), 240-243.
- (7) CHEFTEL J.C., CHEFTEL H. et BESANCON P.  
Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments.  
Entr. Mod. (ed.), 1976, Vol. 2, Paris.
- (8) CHICK H.J.  
Laws of disinfection.  
J. Hyg., 1908, 8, 92-158.

- (9) CUTTING C.L.  
Smoking.  
In G. Borgstrom (ed.), Fish and Food, Academic Press, Inc., New-York,  
1965, 3, 55-105.
- (10) DEMPSTER J.F., REID S.N. and CODY O.  
Sources of contamination of cooked, ready to eat cured and uncured meats.  
J. Hyg., 1973, 71, 815-823.
- (11) DIERS H.  
Le hareng fumé.  
Thèse de Doctorat Vétérinaire, Alfort, 1974.
- (12) DIEUZEIDE R.  
Le fumage du poisson.  
Bull. Stat. Exper. Aquicul. Pêche Castiglione (Alger), 1935, n° 44.
- (13) DIEUZEIDE R. et NOVELLA M.  
Essai sur la technique de fumage du poisson.  
Bull. Stat. Exper. Aquicul. Pêche Castiglione (Alger), 1951, n° 169.
- (14) DRAUDT H.W.  
The meat smoking process, a review.  
Food Technol., 1963, 17, 85-90.
- (15) DUBOS R.J. et DAVIS B.D.  
Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media.  
J. Exper. Med., 1946, 83, 409.
- (16) DYER W.J.  
The salting of codfish.  
Fish Res. Bd. Can., Prog. Dept. Atl. St., 1942, 32, 6-8.

- (17) EDWARDS P.R. and EWING W.H.  
Identification of Enterobacteriaceae.  
Burgess Publ. Co., Minneapolis (USA), 1962.
- (18) FIDDLER W., DOERR R.C. and WASSERMAN A.E.  
Composition of an ether-soluble fraction of a liquid smoke solution.  
J. Agr. Food Chem., 1970, 18, 310-312.
- (19) FOSTER W.W. and SIMPSON T.H.  
Studies of the smoking process for foods : the importance of vapors.  
J. Sci. Food Agr., 1961, 5, 363-374.
- (20) FOSTER W.W. and SIMPSON T.H.  
Studies of the smoking process for foods : the role of smoke particles.  
J. Sci. Food Agr., 1961, 9, 635-644.
- (21) GILBERT J. and KNOWLES M.E.  
The chemistry of smoked foods : a review.  
Food Technol., 1975, 10, 245-261.
- (22) GOOS A.W.  
Wood Chemistry.  
Reinhold (ed.), New-York, 1952, Vol. 2, 2nd ed., 826.
- (23) HESS E.A.  
The bactericidal action of smoke.  
Contrib. Can. Biol. and Fisheries (N.S.), 1929, 4, 29.
- (24) ISENBERG H.D. and SIEGEL M.  
In vitro action of carbenicillin against bacteria isolated from  
clinical material.  
Appl. Microbiol., 1970, 20, 433-436.

- (25) JAYNE-WILLIAMS D.J.  
Report of a discussion on the effect of the diluent on the recovery of bacteria.  
J. Appl. Bact., 1963, 26, 398.
- (26) JEANDEL R.  
Le fumage des denrées alimentaires.  
Thèse de Doctorat Vétérinaire, Alfort, 1944.
- (27) JORDAN R.C. and JACOBS S.E.  
Studies in dynamic of disinfection ; reaction between phenol and Bacterium coli.  
J. Hyg., 1945, 44, 210-220.
- (28) KERSKEN H.  
Recherche sur l'influence du fumage sur les moisissures.  
Fleish Wirtschaft, 1974, 54, 8, 1341-1344 et 1346.
- (29) KOBURGER J.A. and MENDENHALL T.  
Smoked mullet quality : an assesment.  
J. Milk Fd Technol., 1973, 4, 194-195.
- (30) KURKO V.I. and SCHMIDT T.A.  
Chemistry of smoking.  
Proc. Europ. Meeting of Meat Res. Workers, 1969, 15, 1167.
- (31) LABAN P., FAVRE C., RAMET F. and LARPENT J.P.  
Lactobacilli isolated from French saucisson (Taxonomic Study).  
Zbl. Bakt. Hyg., 1978, I. Abt. Orig. B-166 : 105-111.
- (32) LECLERC H., BUTTIAUX R., GUILLAUME J., WATTRE P.  
Microbiologie appliquée.  
Doin (ed.), Paris, 1977, 2nd ed.

- V
- (33) LE COOPER D.  
A satisfactory small smoke house.  
Atlantic Fisheries Exper. Station, Note n° 51 in Progress Reports  
of Biol. Board of Canada, 1937, 19.
- (34) LEE J.S. and PFEIFER D.K.  
Aerobic microbial flora of smoked salmon.  
J. Milk Fd Technol., 1973, 36, 143-145.
- (35) LEISTNER L.  
Desinfektion oder Stimulierung ?  
Fleishwirtschaft, 1957, 9, 1, 13-17.
- (36) LENGES J.  
Dosage du 3,4-Benzopyrène dans les produits de viandes et de poissons  
fumés.  
Rev. ferment. ind. alim., 1976, 131, (1).
- (37) LISTON J. and SHEWAN J.M.  
Bacteria brought into brines of fish.  
In B.P Eddy (ed.), Proc. 2nd Int. Symp. Fd Microbiol. Her Majesty's  
Stationary Office, London, 1976, 35-43.
- (38) LUCISANO A., DE BATTISTIS P. et MARZADORI F.  
Recherche du Benzopyrène dans les aliments fumés.  
Veter. Ital., Fac. Med. Vet., Univ. Studi Napoli, 1973, Vol 24,  
5, 232-237.
- (39) LUKS D. et LENGES J.  
Quelques aspects analytiques et pratiques de la contamination de pro-  
duits fumés par des composants cancérigènes.  
Rev. ferment. ind. alim., 1973, 3, 111-114.
- (40) MAN J.C., ROGOSA M. and SHARPE M.E.  
A medium for the cultivation of Lactobacilli.  
J. Appl. Bact., 1960, 23, 130-135.

- (41) MOSSEL D.A.A., KOOPMANN M.J. et JONGERIUS E.  
Enumeration of Bacillus cereus in foods.  
Appl. Microbiol., 1967, 15, 650-653.
- (42) NICOLLE J.P.  
Technologie du fumage : application au saumon.  
Inst. Sc. Techn. Pêches Marit., 1977.
- (43) NIELSEN S.F. and PEDERSEN H.O.  
Studies on the occurrence and germination of C. botulinum on  
smoked salmon.  
In M. Ingram and T.A. Roberts (ed.), Botulism 1966, Proc. 5th Int. Symp.  
Fd Microbiol., Chapman and Hall, London, 1967, 66-72.
- (44) PAULE R.  
Contribution à l'étude biochimique du genre Lactobacillus par une  
méthode normalisée.  
Thèse Doctorat Pharmacie, Lyon, 1971.
- (45) PFLUG I.J. and HOLCOMB R.G.  
Principles of thermal destruction of microorganisms.  
In : Disinfection, Sterilization and Preservation, Seymour S. Block  
(ed.), Philadelphia, 1977, 2nd ed.
- (46) PLICHON B., LUCQUIN M. et GUILLAUME J.B.  
Vérification expérimentale des cinétiques de croissance bactérienne  
obtenues par simulation sur ordinateur.  
Ann. Inst. Past. Lille, 1971, 22, 37-43.
- (47) RAHN O.  
Logarithmic order of death in bacteria.  
Biodynamica, 1943, 4, 81-129.
- (48) RAHN O.  
Death of bacteria by chemical agents.  
Biodynamica, 1945, 5, 1-116.

- (49) ROGOSA M., MITCHELL J.A. and WISEMAN R.F.  
A selective medium for the isolation and enceneration for oral and fecal Lactobaxilli.  
J. Bact., 1951, 62, 132-133.
- (50) RUSZ J., KOPALOVA M. et PELIKANNOVA K.  
Influence de certains facteurs sur la teneur en 3,4-Benzopyrène des fumées.  
Prum. Potravin, 1971, 22, 106-108.
- (51) SHEWAN J.M.  
The biological stability of smoked and salted fish.  
Chemistry and Industry, 1949, 501-505.
- (52) SHEWAN J.M.  
The microbiology of sea-water fish.  
In G. Borgstrom (ed.), Fish and Food, Academic Press, Inc., New-York, 1961, Vol. 1, 487-560.
- (53) SIMON S., RYPINSKI A.A., TAUBER F.W., PENCYLA R.M. et WESTERBERG D.O.  
Effect of cellulose casing on absorption of polycyclic hydrocarbons in wood smoke by absorbents.  
J. Agr. Fd Chem., 1969, 17, 1128-1134.
- (54) SOUDAN F.  
Conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques.  
Baillièrè et Fils (ed.), Paris, 1965.
- (55) SOUTHCOTT B.A. and RAZZELL W.E.  
Clostridium botulinum control in cold-smoked salmon : a review.  
J. Fish Res. Board Can., 1973, 30, 631-641.
- (56) SPANYAR P. et KEVAL E.  
Fumage des aliments. III : Mécanisme du fumage.  
Z. Lebensm. Unters. u. forsch, 1960, 112, 353-471.

- (57) SPANYAR P. et SZEREDY I.  
Fumage des aliments. IV : Acides de la fumée et des produits fumés.  
Z. Lebensm. Unters. u. Forsch, 1962, 118, 293.
- (58) STEINIG J., MEYER V.  
Teneur en 3,4-Benzopyrène dans des poissons fumés.  
Sci. Technol. Alim. 1976, 9, 215-217.
- (59) SZEPUŁA W., OLANCZUK-NEYMAN K., DAUN H. et GRABOWSKA J.  
Influence des différentes sortes de bois sur les propriétés  
bactériostatiques de la fumée de bois.  
Zesz. nauk. Politech. gdansk. chem., 1970, 152, 65-72.
- (60) TILGNER D.J., MILNER K., PROMINSKI J. et DARNOWSKA G.  
Advances in the engineering of the smoke curing process.  
Yugoslav Inst. Meat. Technol., Belgrade, 1962, 37.
- (61) TILGNER D.J.  
Effets du fumage et substances actives dans la fumée.  
Die Fleischwirtschaft, 1967, 47, 4.
- (62) TILGNER D.J.  
Thoughts about qualitative requirements of wood smoke flavourings.  
Symp. Papers, Warszawa, 1976, 113-120.
- (63) TILGNER D.J.  
The phenomena of quality in the smoke curing process.  
Pure and Appl. Chem., 1977, 49, 1629-1638.
- (64) TOTH L. et BLASS W.  
Einfluss der Rauchertechnologie.  
Fleischwirtschaft, 1972, 52, 1121, 1171, 1419.

- (65) WASSERMAN A.E. and TALLEY F.  
A sample bias the evaluation of smoked frankfurters by the triangle test.  
J. Food Sci., 1969, 34, 99-100.
- (66) WATSON H.E.  
Variations of the rate of disinfection with change in the concentration  
of the disinfectant.  
J. Hyg., 1908, 8, 536-542.
- (67) WECKEL K.G. and WOSJE D.  
Brine salting of Great Lakes chub for smoking.  
University of Wisconsin, College of Agriculture, Madison Res. Rep.,  
1966, 24.
- (68) X.  
Standard methods for the examination of dairy products.  
A.P.H.A., New-York, 1967, 12th ed., 232-233.
- (69) YUDISTKAYA A.I.  
Histological and histochemical investigation of tissues of smoked fish.  
Rybnoe Khoziaistvo, 1959, 35, (2), 65-69.
- (70) ZAITSEV V.I., KIZEVETTER L., LAGUNOV T., MAKAROVA L. and PODSEVALOV V.  
Fish curing and processing.  
MIR Publishers, Moscow, 1969.
- (71) ZIEMBA Z.  
Smoked foods.  
Roczn. Technol. Chem. Zywn., 1969, 15, 139 et 153.

A N N E X E 1

## TECHNOLOGIE DU FUMAGE DU SAUMON

---

Il existe deux techniques essentielles pour fumer le poisson : le fumage à chaud et le fumage à froid. Dans le fumage à chaud la température des fumées venant au contact de la denrée est supérieure à 60° C, dans le fumage à froid cette même température demeure inférieure à 30° C (elle est généralement de l'ordre de 20° C) et le produit fumé n'est pas cuit, contrairement à ce qui a lieu dans le fumage à chaud. La technique la plus employée, tout au moins en France, est celle du fumage à froid. Elle donne un produit dont la durée de conservation est habituellement plus longue que celle du poisson fumé à chaud.

### MATIÈRE PREMIÈRE

L'industrie du fumage en France utilise environ 10 000 tonnes de saumon chaque année. Pour obtenir un saumon fumé de bonne qualité, la chair doit être relativement grasse, 15 % de graisse environ dans le muscle. (On sait que la teneur en graisse des saumons varie suivant la saison : elle peut atteindre 20 %, notamment chez l'imature, alors qu'elle tombe au-dessous de 1 % pendant le jeûne qui précède la fraie ainsi que dans les semaines qui suivent).

### DECONGELATION

L'industrie emploie généralement du saumon congelé, éviscéré, parfois étêté. Il est placé à l'air ambiant à 18° C où il se

décongèle lentement, en 12 heures environ ; une meilleure technique de décongélation peut être utilisée, qui consiste à asperger le poisson d'eau à une température inférieure à 10° C. L'abdomen est ensuite gratté, lavé puis rincé abondamment à l'eau courante.

FILETAGE

La technique de mise en filets exige une grande dextérité, le coup de couteau qui va de la région antérieure à la queue doit être sûr afin de ne pas détériorer la surface du filet, il faut par ailleurs dans un but évident d'économie laisser le moins de chair possible sur l'arête dorsale. Lorsque le filet est découpé, les arêtes ventrales sont ôtées. Les filets ainsi obtenus sont appelés "bandes".

SALAGE

Initialement, le salage avait pour but essentiel de rendre le milieu défavorable aux microorganismes et les concentrations de sel étaient très élevées. Désormais le sel est ajouté en quantité juste suffisante pour obtenir le goût recherché, celui-ci variant quelque peu d'un marché à l'autre. Le salage peut être pratiqué de deux façons :

- salage à sec : les filets de saumon sont recouverts de sel sec dans des bacs. Cette opération s'effectue à température ambiante et dure environ une heure par kilog de saumon.

- salage en saumure : les filets sont immergés dans une saumure suivant des temps qui varient en fonction de la concentration de la solution, en fonction de la taille des filets et en fonction de la température.

### BAUDRUCHAGE

De la "baudruche" de boeuf est déposée sur le filet côté chair. L'application de cette pellicule d'origine animale présente plusieurs avantages : elle empêche l'écartement des myotomes lors du fumage et permet ainsi d'obtenir des filets présentant une surface lisse, elle facilite la découpe et confère au produit fini une brillance attirante.

Avant son utilisation la "peau" est lavée plusieurs fois à l'eau claire ou dans un premier temps lavée avec une eau légèrement javellisée puis rincée.

### SECHAGE

Les filets sont disposés à plat côté peau sur des grilles. Le séchage est souvent pratiqué dans le fumoir la nuit pour mettre à profit le courant d'air résultant du tirage de la cheminée, à température ambiante (pendant environ 10 heures). Il est éminemment souhaitable de choisir une température plus basse et d'accélérer l'opération en l'effectuant dans une enceinte ventilée.

### FUMAGE

Les filets de saumon sont exposés à plat à l'action de la fumée dans une cellule du fumoir. La température de la fumée, qui provient d'une combustion ménagée de sciure de hêtre, ne doit pas en principe dépasser 18° C. (Les spécialistes estiment qu'à une température inférieure, il

est difficile d'obtenir un fumage satisfaisant, par ailleurs il est évident qu'une température plus élevée est préjudiciable à la qualité bactériologique du saumon). La durée du fumage dépend de nombreux facteurs et notamment du degré hygrométrique de l'air, elle varie entre 8 et 14 heures ; la fin de cette opération est déterminée par les fumeurs, cette appréciation du fumage exige une grande compétence et reste en partie subjective.

#### CONGELATION SUPERFICIELLE

L'importance croissante de la vente au détail a conduit les fournisseurs à présenter les filets prétranchés. Le saumon fumé, plus ferme qu'à l'état cru, ne permet toutefois pas un découpage en tranches rapide et présentable. Ainsi, les bandes de saumon destinées au tranchage sont placées dans un compartiment froid à  $- 30^{\circ}$  C pour durcir les chairs.

#### DERNIERES OPERATIONS

. Parage : le parage permet de donner une forme régulière au filet qui est ensuite débarrassé de sa peau.

. Tranchage : la bande partiellement congelée est découpée par une machine.

. Reconstitution : le filet découpé en tranches est ensuite reconstitué sur la peau qui sert de support, et les tranches sont séparées par une feuille de cellophane.

. Conditionnement : le saumon reconstitué est conditionné sous vide dans un sachet imperméable aux liquides et aux gaz.

. Etiquetage et pesage : cette étape est entièrement automatique.

. Stockage : pour faire face à une demande massive à certaines périodes de l'année, une partie des bandes de saumon conditionnées sous vide sont recongelées à coeur en attendant leur expédition.

Cet exposé rapide de la méthodologie du fumage du saumon a pour seul but de situer le fumage proprement dit parmi les autres opérations, et de faciliter ainsi la lecture de cet ouvrage. Une étude complète des différentes techniques employées a été réalisée par NICOLLE (42).

A N N E X E 2

NUMBRE DE GERMES/g	FLORE TOTALE	BACILLES PYOCYANIQUES	ENTEROBACTERIES	COLIFORMES	COLIFORMES FECAUX	STREPTOCOQUES FECAUX	LACTOBACILLES	BACTERIES ISOLEES SUR BAIRD-PARKER
AVANT FUMAGE	57 000 53 000 21 000 50 000 55 000 122 000 115 000	20 150 80 60 0 0 20	5 000 6 100 6 200 3 400 6 400 3 300 2 600	810 1 260 360 500 1 050 650 640	10 0 0 20 0 10 0	1 600 1 800 1 200 1 800 2 700 1 200 600	15 200 2 800 5 760 3 000 2 100 1 530 680	1 200 1 100 1 000 600 800 500 900
Moyennes	67 571,43	47,14	4 714,28	752,85	5,71	1 557,14	4 438,57	871,42
APRES FUMAGE	135 000 42 000 20 000 66 000 9 000 10 000 27 000	0 40 30 10 0 0 0	3 600 1 200 1 000 900 1 400 1 600 1 800	700 300 800 100 230 140 400	0 0 20 20 0 0 0	2 400 1 500 1 800 1 100 1 200 2 200 300	1 660 540 1 310 800 1 150 800 640	200 200 0 100 300 1 100 0
Moyennes	44 142,86	11,42	1 642,85	381,42	5,71	1 500,00	985,71	271,42
RAPPORT : Nbre Avant Fumage Nbre Apres Fumage	1,53	4,12	2,86	1,97	1,00	1,03	4,50	3,21

TABLEAU I : RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS EFFECTUÉS SUR UN MÊME FILET DE SAUMON AVANT ET APRÈS FUMAGE (ÉCHANTILLON I -  $n_1 = n_2 = 7$ )



NOMBRE DE GERMES/g	FLORE TOTALE			BACILLES PYOCYANIQUES			ENTEROBACTERIES			COLIFORMES		
AVANT FUMAGE	199 000	100 000	26 000	1 400	2 400	1 600	1 880	2 680	2 000	480	1 000	710
	59 000	16 000	169 000	1 500	2 000	1 500	2 100	960	3 360	320	250	2 400
	87 000	64 000	41 000	2 800	2 900	1 800	1 600	1 000	1 240	280	1 190	450
	81 000	72 000	76 000	500	5 000	1 700	2 280	1 080	2 200	390	950	780
	58 000	55 000	73 000	1 400	2 600	1 000	1 900	1 510	1 870	450	0	680
	61 000	155 000	68 000	500	1 300	0	2 560	2 080	2 800	720	690	470
	52 000	63 000	46 000	1 800	5 400	2 800	1 850	3 020	1 400	550	2 720	1 580
90 000	118 000	42 000	2 400	1 800	2 400	1 820	2 240	960	430	1 560	350	
<u>Moyennes</u>	77 958,33			2 020,83			1 932,91			808,33		
APRES FUMAGE	189 000	113 000	23 000	200	400	900	470	190	340	470	190	540
	53 000	4 000	14 000	800	300	300	1 500	550	550	1 500	550	550
	44 000	85 000	6 000	700	700	300	1 080	370	580	1 080	370	580
	123 000	60 000	4 000	500	700	600	280	1 750	1 100	280	750	1 100
	40 000	158 000	11 000	400	400	700	1 540	1 700	440	1 540	700	440
	44 000	13 000	12 000	300	300	200	740	1 200	1 100	740	1 200	1 100
	13 000	22 000	5 000	700	0	800	590	1 380	360	590	1 380	360
26 000	5 000	2 000	700	0	500	750	1 960	210	750	1 960	210	
<u>Moyennes</u>	44 541,66			475,00			863,75			788,75		
RAPPORT : Nbre Avant Fumage Nbre Après Fumage	1,75			4,25			2,23			1,02		

TABLEAU 2 (A) : RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS ÉFFECTUÉS SUR UN MÊME FILET DE SALMON AVANT ET APRÈS FUMAGE (ÉCHANTILLON 2 -  $n_1 = n_2 = 24$ )



NOMBRE DE CERES/g	COLIFORMES FECAUX			STREPTOCOQUES FECAUX			LACTOBACILLES			BACTERIES ISOLEES SUR BAIRD-PARKER		
AVANT FORAGE	520	230	180	2 900	1 400	6 200	8 720	7 210	6 990	2 900	2 100	4 800
	550	10	1 720	2 300	1 200	1 300	9 860	9 640	2 890	2 600	700	6 900
	400	360	150	2 100	2 600	2 100	2 670	5 360	4 340	9 000	8 100	5 100
	130	130	280	1 600	1 200	7 000	5 580	9 810	6 110	3 700	5 600	9 300
	100	50	130	1 000	7 000	1 100	4 120	3 430	5 590	3 600	5 000	16 600
	330	510	550	1 700	5 500	1 100	10 030	7 190	7 900	2 700	8 000	6 900
	180	1 350	0	2 400	2 300	2 000	3 210	4 880	4 170	4 700	9 000	2 000
	190	870	70	2 300	800	2 400	6 110	8 610	8 940	6 500	4 500	3 000
<u>Moyennes</u>	374,58			2 562,50			6 390,00			5 554,16		
APRES FORAGE	0	0	140	1 600	0	2 300	1 620	1 300	1 290	1 300	0	100
	360	10	40	3 500	0	1 100	740	1 680	1 560	1 100	700	100
	630	160	0	3 600	0	1 200	1 080	1 240	1 770	400	100	0
	0	300	0	1 400	100	100	700	820	2 450	800	0	300
	0	0	20	3 300	2 800	300	2 100	1 620	1 880	200	0	500
	0	0	250	200	3 200	2 100	3 500	1 180	1 610	300	600	1 200
	0	0	30	300	2 600	100	1 520	2 220	1 220	500	100	300
	0	110	0	0	2 800	800	1 410	1 420	1 320	100	300	200
<u>Moyennes</u>	85,41			1 331,66			1 552,08			383,33		
RAPPORT : <u>Nombre Avant Forage</u> <u>Nombre Après Forage</u>	4,38			1,84			4,11			14,48		

TABLEAU 2 (B) : SUITE DU TABLEAU 2 (A)



NUMBRE DE GERMES /g	FLORE TOTALE	BACILLES PYOCYANIQUES	ENTEROBACTERIES	COLIFORMES	STREPTOCOQUES FECAUX	BACTERIES ISOLEES SUR BAIRD-PARKER	GERMES SE DEVELOP- PANT EN ANAEROBICISE
AVANT FUMAGE	280 000	16 000	8 800	1 080	19 400	12 300	34 000
	320 000	17 000	13 400	3 160	14 200	14 700	24 000
	200 000	8 000	4 800	1 120	5 700	4 600	18 000
	120 000	10 800	9 200	4 100	14 400	2 200	22 000
	45 000	10 000	2 300	960	3 500	4 900	12 000
	360 000	11 000	5 400	1 640	4 600	6 000	24 000
<u>Moyennes</u>	220 833,33	12 133,33	7 316,66	2 010,00	10 300,00	7 450,00	22 333,33
APRES FUMAGE	40 000	2 000	2 600	1 900	3 300	2 000	28 000
	120 000	2 000	6 200	3 040	9 300	8 000	46 000
	100 000	-	1 700	820	7 900	1 800	34 000
	48 000	1 000	8 500	6 100	4 200	0	34 000
	180 000	-	1 600	520	3 300	600	88 000
	120 000	3 000	6 500	1 960	4 200	500	68 000
<u>Moyennes</u>	101 333,33	2 000,00	4 516,66	2 390,00	5 366,66	2 150,00	49 666,66
RAPPORT : <u>Nombre Avant Fumage</u> <u>Nombre Après Fumage</u>	2,17	6,06	1,61	0,84	1,91	3,46	0,44

TABLEAU 3 : RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS EFFECTUÉS SUR UN MÊME FILET DE SAUMON AVANT ET APRÈS FUMAGE (ÉCHANTILLON 3 -  $n_1 = n_2 = 6$ )



NOYÈRE DE CERTES /g	FLORE TOTALE	BACILLES PYOCYANIQUES	ENTEROBACTERIIS	COLIFORMES	COLIFORMES FECAUX	STREPTOCOQUES FECAUX	LACTOBACILLES	BACTERIES ISOLES SUR PAIND-PARKER	CERTES SE DETERMINANT EN ANALYSE
AVANT FURAGE	320 000	7 000	1 900	380	60	900	9 000	11 900	11 000
	174 000	7 700	3 400	150	100	2 800	2 700	8 300	12 000
	260 000	6 500	5 000	580	90	2 400	9 000	10 600	11 000
Moyennes	251 333,33	7 066,66	3 433,33	370,00	83,33	2 033,33	6 900,00	10 266,66	11 333,33
	83 000	1 000	4 600	240	0	100	500	500	12 000
APRES FURAGE	46 000	1 000	5 200	560	0	1 300	1 100	1 300	8 000
	60 000	1 200	4 000	380	70	600	1 000	3 400	10 500
Moyennes	63 000,00	1 066,66	4 600,00	393,33	23,33	666,66	866,66	1 733,33	10 166,66
RAPPORT									
Moy Avant Furage	3,98	6,62	0,74	0,94	3,57	3,05	7,96	5,92	1,11
Moyre Apres Furage									

TASLEAU 4 : RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS EFFECTUÉS SUR UN MÊME FILET DE SAUMON AVANT ET APRÈS FURAGE (ÉCHANTILLON 4 - n<sub>1</sub> = n<sub>2</sub> = 3)

AVANT FURAGE	82 000	1 000	1 100	440	0	400	1 400	500	600
	40 000	300	600	280	10	700	500	600	400
	62 000	200	100	400	120	1 100	2 100	1 500	500
	14 000	100	600	140	10	300	1 000	100	400
Moyennes	49 500,00	400,00	600,00	315,00	35,00	625,00	1 250,00	675,00	475,00
	28 000	0	1 200	320	0	600	1 800	600	1 200
APRES FURAGE	8 000	100	500	340	0	800	100	0	1 500
	40 000	300	900	460	30	900	1 000	300	800
Moyennes	25 333,33	133,33	866,66	373,33	10,00	766,66	966,66	300,00	1 166,66
RAPPORT									
Moyre Avant Furage	1,95	3,00	0,69	0,84	3,50	0,81	1,29	2,25	0,40
Moyre Apres Furage									

TASLEAU 5 : RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS EFFECTUÉS SUR UN MÊME FILET DE SAUMON AVANT ET APRÈS FURAGE (ÉCHANTILLON 5 - n<sub>1</sub> = 4 - n<sub>2</sub> = 3)



NOMBRE DE GERMES /g	FLORE TOTALE		ENTEROBACTERIES		LACTOBACILLES		GERMES SE DEVELOPPANT EN ANAEROBIOSE		LEVURES		MOISSISSURES	
AVANT FUMAGE	49 000	250 000	800	600	1 500	400	10 000	3 000	4 200	14 700	0	60
	170 000	350 000	1 300	800	1 800	500	1 000	3 000	17 300	13 000	30	60
	90 000	80 000	600	300	1 400	800	2 000	1 000	12 000	4 400	0	30
	35 000	70 000	0	600	600	0	4 000	0	3 600	700	30	0
	72 000	170 000	600	1 000	100	1 000	0	3 000	4 900	5 300	10	40
	118 000	170 000	100	500	600	1 300	5 000	0	13 200	19 800	70	60
	78 000	125 000	300	0	100	2 800	0	4 000	3 400	12 900	20	30
	73 000	67 000	900	600	100	1 800	1 000	3 000	10 600	11 000	20	50
	40 000	114 000	400	100	0	600	2 000	5 000	9 400	12 900	60	50
<u>Moyennes</u>	117 833,33		527,77		855,55		2 611,11		9 627,77		34,44	
APRES FUMAGE	250 000	7 000	200	0	100	0	4 000	3 000	8 700	1 500	10	10
	5 000	70 000	0	0	0	100	0	3 000	2 400	10 600	0	0
	21 000	4 000	200	0	100	0	6 000	0	5 500	2 300	10	0
	17 000	130 000	0	200	0	300	0	8 000	2 700	13 000	0	10
	5 000	110 000	0	100	0	300	0	19 000	2 600	12 800	10	10
	27 000	7 000	100	0	0	100	1 000	57 000	2 300	2 700	0	10
	23 000	300 000	300	100	0	100	2 000	10 000	6 100	7 300	10	20
	200 000	6 000	200	0	0	0	2 000	0	7 100	400	0	0
	126 000	1 000	100	0	0	0	13 000	0	3 600	0	0	0
<u>Moyennes</u>	72 722,22		83,33		61,11		7 111,11		5 088,88		5,55	
RAPPORT <u>Nombre Avant Fumage</u> <u>Nombre Après Fumage</u>	1,62		6,33		14,00		0,36		1,89		6,20	



TABLEAU 6 : RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS EFFECTUÉS SUR UN MÊME FILET DE SAUMON AVANT ET APRÈS FUMAGE (ÉCHANTILLON 6 -  $n_1 = n_2 = 18$ )

NOMBRE DE CERES /g	FLORE TOTALE		ENTEROBACTERIES		LEVURES		MOISSISSURES	
AVANT FUMAGE	12 000	110 000	90	1 050	1 800	700	10	10
	18 000	29 000	80	1 030	900	600	40	0
	2 000	32 000	0	700	700	1 300	30	10
	7 000	34 000	33 320	110	0	1 900	10	0
	26 000	6 000	2 620	50	500	800	10	20
	15 000	15 000	930	30	1 100	1 000	30	60
	23 000	4 000	430	10	900	0	10	10
	34 000	4 000	820	0	1 900	300	40	0
Moyennes	23 187,50		704,37		900,00		18,12	
APRES FUMAGE	12 000	6 000	360	180	100	0	0	0
	8 000	83 000	210	1 170	200	1 000	0	0
	0	12 000	460	270	0	500	0	10
	46 000	8 000	20	300	0	600	0	50
	5 000	13 000	480	930	20	600	0	10
	8 000	2 000	580	850	200	20	0	0
	1 000	0	400	170	20	0	0	0
	3 000	12 000	230	10	200	0	10	0
Moyennes	13 687,50		413,75		216,25		5,00	
RAPPORT :	1,69		1,77		4,16		3,20	
Nbre Avant Fumage								
Nbre Après Fumage								

TABEAU 7 : RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS EFFECTUÉS SUR UN MÊME FILET DE SAUFRON AVANT ET APRÈS FUMAGE (ÉCHANTILLON 7 -  $n_1 = n_2 = 16$ )

